

MICHELINE LUIZA DE SOUZA LOPES

**DETOXICAÇÃO E ANÁLISE DA QUALIDADE PROTEICA DO FARELO DO
PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L864d
2013

Lopes, Micheline Luiza de Souza, 1973-

Detoxicação e análise da qualidade proteica do farelo do
pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) / Micheline Luiza de Souza
Lopes. - Viçosa, MG, 2013.

x, 63 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marco Túlio Coelho da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.56-63.

1. Pinhão-manso. 2. *Jatropha curcas* - Análise. 3. Proteínas
- Qualidade. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.07

MICHELINE LUIZA DE SOUZA LOPES

**DETOXICAÇÃO E ANÁLISE DA QUALIDADE PROTEICA DO FARELO DO
PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de agosto de 2013.

Prof. Laércio dos Anjos Benjamin

Prof. Roberto Santos Barbiéri

Prof. José Benício Paes Chaves

(coorientador)

Profa. Maria do Carmo G. Peluzio

(coorientadora)

Prof. Marco Túlio Coelho Silva

(orientador)

AGRADECIMENTOS

Às minhas filhas, Deborah e Helena, que me deram apoio e carinho para chegar ao final dessa jornada e a todos os meus familiares que contribuíram para que esta conquista fosse concretizada.

Ao meu orientador, Professor Marco Túlio Coelho Silva, pelos ensinamentos, pela atenção e orientação dedicada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos.

As minhas colegas de laboratório, Cristiane e Marcelle, e à estagiária Fernanda pela parceria e dedicação.

À Lizzy Alcântara, membro do Laboratório de Desenvolvimento e Simulação de Processos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV, por realizar as análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Aos meus coorientadores, professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio e José Benício Paes Chaves pelo auxílio e orientação.

Ao Prof. Laércio dos Anjos Benjamin e à Profa. Hércia Stampini D. Martino, pela atenção e fundamental colaboração na parte experimental.

À Universidade Federal de Viçosa por oportunizar esta conquista, especialmente ao Departamento de Tecnologia de Alimentos.

Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo geral.....	3
1.2 Objetivos específicos.....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.) e seu cultivo.....	4
2.2 Composição do grão do pinhão-manso.....	5
2.3 Fatores antinutricionais do grão do pinhão-manso.....	11
2.4 Desalergenização - detoxicação	14
2.5 Métodos de extração de óleos e gorduras.....	16
2.6 Avaliação da qualidade proteica.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Matéria prima.....	19
3.2 Preparo das tortas e cotilédones desengordurados	19
3.2.1 Torta Fusermann desengordurada com hexano.....	19
3.2.2 Torta Fusermann desengordurada com etanol.....	19
3.2.3 Cotilédones desengordurados.....	20
3.2.4 Tratamento térmico.....	20
3.3 Análises físico-químicas da matéria prima e farelos.....	20
3.3.1 Composição dos grãos: proporção de cascas e cotilédone	20
3.3.2 Composição dos grãos e cotilédones: determinação da umidade, lipídios ou extrato etéreo, proteína bruta (nitrogênio total) e cinzas.....	20
3.3.3 Determinações de matéria seca, cinzas, nitrogênio total, proteína bruta, lipídios, fibra e minerais.....	21
3.3.4 Composição em aminoácidos e escore químico.....	22

3.3.5 Determinação dos ésteres de forbol.....	22
3.4 Ensaios biológicos.....	23
3.4.1 Avaliação da qualidade nutricional da proteína (primeiro ensaio - cotilédones desengordurados com hexano, com e sem tratamento térmico).....	23
3.4.2 Avaliação da qualidade nutricional da proteína (segundo ensaio - tortas e cotilédones desengordurados com etanol, com e sem tratamento térmico).....	26
3.4.3 Determinação de digestibilidade verdadeira, PER (quociente de eficiência proteica), NPR (razão proteica líquida), escore químico e digestibilidade verdadeira corrigida pelo escore químico (PDCAAS).....	29
3.4.4 Avaliação da toxicidade subcrônica.....	30
3.5 Delineamento experimental e análise estatística.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Análises físico-químicas da matéria prima e farelos.....	32
4.1.1 Composição dos grãos do pinhão-manso	32
4.1.2 Composição em aminoácidos.....	35
4.1.3 Determinação de éster de forbol.....	37
4.2 Ensaios biológicos.....	39
4.2.1 Primeiro ensaio biológico (com cotilédones de pinhão-manso desengordurados com hexano com e sem tratamento térmico).....	39
4.2.2 Segundo ensaio biológico (tortas e cotilédones desengordurados com etanol, com e sem tratamento térmico).....	40
4.2.3 Toxicidade subcrônica (segundo ensaio).....	47
4.2.3.1 Peso relativo do fígado.....	47
4.2.3.2 Análises bioquímicas – enzimas hepáticas.....	49
4.2.3.3 Índices hematológicos.....	50
4.2.3.4 Histomorfometria do fígado.....	52
5. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Composição média do fruto do pinhão-manso (diversos lotes).....	7
TABELA 2	Valores médios e desvios padrão da composição em ácidos graxos de grãos de pinhão-manso.....	8
TABELA 3	Composição em aminoácidos da proteína do farelo desengordurado de quatro variedades de <i>Jatropha curcas</i> originárias do México e valores de aminoácidos essenciais sugeridos pela FAO/WHO 1991 (g 16 g ⁻¹ N).....	9
TABELA 4	Características tecnológicas e químicas de grãos de 18 variedades de pinhão manso.....	10
TABELA 5	Características tecnológicas e químicas de grãos de quatro variedades de pinhão manso.....	11
TABELA 6	Concentração de éster de forbol e de lectina de quatro variedades de <i>Jatropha curcas</i> originárias da Nicarágua após diversos tratamentos.....	14
TABELA 7	Concentrações mínimas e máximas dos fatores antinutricionais de quatro variedades de <i>Jatropha curcas</i> originárias do México.....	15
TABELA 8	Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico de qualidade proteica (g.100 ⁻¹ g).....	24
TABELA 9	Composição das dietas experimentais baseada na dieta AIN-93G (REEVES et al., 1993), modificada de modo a fornecer 9 a 10% de proteína.....	27
TABELA 10	Teores de matéria seca, cinzas, nitrogênio total, proteína bruta, lipídios e fibras em percentual sobre a matéria seca (% m/m).....	32
TABELA 11	Teores de minerais dos grãos do pinhão-manso (%m/m e ppm).....	33

TABELA 12	Valores médios e desvios padrão da composição centesimal dos farelos desengordurados com etanol e hexano.....	34
TABELA 13	Comparação da composição em aminoácidos (g.16g N ⁻¹) de amostras de cotilédones inteiros, desengordurados com etanol ou hexano, da ração ideal para ratos e para crianças de 2 a 5 anos.....	36
TABELA 14	Escore químico do pinhão-manso mg aa .g de proteína ⁻¹ ...	37
TABELA 15	Concentrações de éster de forbol de diferentes amostras de pinhão-manso obtidas por HPLC.....	38
TABELA 16	Variação de peso dos animais (média ± desvio padrão) em relação ao peso inicial (em %)......	39
TABELA 17	Valores de digestibilidade verdadeira (média ± desvio padrão) das dietas experimentais.....	43
TABELA 18	Valores médios e desvios padrão do quociente de eficiência proteica (PER) e quociente de eficiência proteica relativo (RPER%) das dietas experimentais.....	44
TABELA 19	Valores médios e desvios padrão da razão proteica líquida (NPR) e razão proteica líquida relativa (NPRR%) das dietas experimentais.....	45
TABELA 20	Escore químico e PDCAAS da dieta preparada com cotilédones desengordurados com etanol (CDE).....	46
TABELA 21	Peso médio relativo do fígado dos ratos em relação às dietas ingeridas.....	48
TABELA 22	Valores médios e desvios padrão de enzimas hepáticas dosadas do plasma de ratos em jejum médio de 12 horas.....	49
TABELA 23	Valores médios e desvios padrão dos valores de HEM, HMG, HMT, VCM, HCM e CHCM dos animais alimentados com as diferentes dietas experimentais.....	51

TABELA 24 Quantificação morfométrica dos componentes do parênquima hepático dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	52
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	(A) Planta jovem de <i>Jatropha curcas</i> L. com flores e vagens em desenvolvimento. (B) Inflorescência contendo flores estaminadas masculinas (M) e flores pistiladas femininas (F) de <i>Jatropha curcas</i> L.. (C) Seção transversal de vagem de <i>Jatropha curcas</i> L contendo três sementes. (D) Sementes maduras de <i>Jatropha curcas</i> L.....	6
Figura 2	(A) Anel de tiglane (B) 12-hidroxi, -16-deoxiforbol.....	12
Figura 3	Peso médio dos animais e dieta ingerida durante os 14 dias (primeira e segunda semana) de experimento.....	41
Figura 4	Relação entre as Médias de dietas ingeridas e ganho de peso dos animais na primeira e segunda semanas (14 dias) de experimento (Quociente de Eficiência Alimentar) ..	42
Figura 5	Análise histológica do fígado do grupo controle (A) e dos grupos tratados com dieta CDE (B), CDEA (C), TDE (D) e TDEA (E). Barra = 100 µm.....	54

RESUMO

LOPES, Micheline Luiza de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2013. **Detoxicação e análise da qualidade proteica do farelo do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. Orientador: Marco Túlio Coelho Silva. Coorientadores: José Benício Paes Chaves e Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Jatropha curcas L. também conhecida como pinhão-manso é uma planta cujas sementes possuem óleo com potencial para emprego na produção de biocombustível. Estudos realizados demonstraram que as unidades de extração de óleo não são economicamente viáveis, se não houver o aproveitamento do resíduo da extração (torta ou farelo). Em razão da presença de componentes tóxicos, como os ésteres de forbol e curcina nos farelos de pinhão-manso, e da falta de tecnologias viáveis para sua eliminação, estes farelos não são utilizados na alimentação animal. Assim, têm sido usados exclusivamente como fertilizantes, o que reduz a competitividade da cadeia produtiva das culturas de pinhão-manso em relação a outras oleaginosas. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a detoxicação e a qualidade proteica de torta e de cotilédones de pinhão-manso desengordurados com hexano ou etanol, através da inclusão em dieta para ratos. Observou-se que o uso de etanol para desengordurar as tortas e cotilédones das amostras de pinhão-manso diminuiu a concentração de substâncias tóxicas para valores aceitáveis para os animais (éster de forbol < 0,2 mg.g⁻¹ de amostra). O tratamento térmico, autoclavagem do material úmido, provavelmente inativou a maioria dos fatores antinutricionais, pois as dietas tratadas desse modo tiveram digestibilidade da ordem de 97%, semelhantes à da dieta padrão de caseína. Entretanto, digestibilidade corrigida pelo escore químico caiu para valores da ordem de 35% devido à baixa concentração de alguns aminoácidos essenciais como fenilalanina e tirosina, metionina e cistina e lisina. Desse modo os valores de PER e NPR das dietas preparadas com tortas e cotilédones de pinhão- manso foram muito baixos, indicando, no mínimo, a necessidade de suplementação desses aminoácidos em rações preparadas com derivados do pinhão-manso.

ABSTRACT

LOPES, Micheline Luiza de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, august, 2013. **Detoxification and analysis of protein quality from physic nuts meal (*Jatropha curcas* L).** Adviser: Marco Túlio Coelho Silva. Co-advisers: José Benício Paes Chaves and Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Jatropha curcas L. also known as physic nuts is a plant whose seeds have an oil with potential use in the biofuel production. Studies performed show that the extraction units are not economically viable unless the extraction residues (cakes and meal) are used. Due to the presence of toxic components like phorbol esters and curcumin in the meal of *Jatropha curcas* and the lack of viable technologies for their elimination, these kernel meals are not used in animal food, being used exclusively as fertilizers which reduces the competitiveness of the *Jatropha curcas* cultivation compared to other oilseeds. The objective of this research was to evaluate the protein quality of the cakes and kernel of *Jatropha curcas* degreased with hexane or ethanol through the inclusion in rat diet. It has been observed that the use of ethanol to degrease the cakes and kernels has decreased the concentration of toxic substances to levels acceptable to the animals (phorbol esters $< 0,2 \text{ mg.g}^{-1}$ of sample). The thermal treatment, autoclaving of moist material, has probably inactivated the majority of antinutritional factors, thus diets treated this way had digestibility of 97%, similar to the pattern diet of casein. However, the digestibility corrected by Chemical Score dropped to values of 35% due to the low concentration of some essential aminoacids like phenylalanine and tyrosine, methionine and cystine and lysine. This way the values of PER, NPR of the diets prepared with detoxicated cakes and kernels of *Jatropha curcas* were very low, indicating at least, the need for supplementation of these aminoacids in meals prepared with byproducts of *Jatropha curcas*.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da temperatura global causada pela queima de combustíveis fósseis, que representam 90% da energia mundial, além do aumento do preço dos óleos minerais são a principal causa da procura por fontes renováveis de energia. Uma dessas fontes pode ser a produção de biodiesel por meio da esterificação de óleos vegetais (MAKKAR et al., 2009).

A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, com base na lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, instituiu o Programa Brasileiro de Biodiesel e fixou a partir de 2008, um percentual mínimo obrigatório de 2% de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado, em qualquer parte do território nacional. Isto representou uma demanda de 800 milhões de litros anuais do biocombustível. É importante salientar que, para 2013, foi estabelecido o percentual de 5% de adição de biodiesel (BRASIL, 2005). Nesse sentido, a pesquisa de novas oleaginosas para a obtenção de óleo para a produção de biodiesel torna-se imprescindível para atender a essas demandas.

No Brasil, existem várias plantas oleaginosas cujas sementes possuem óleo com potencial para emprego na produção de biocombustível. A *Jatropha curcas* L. conhecida como pinhão-mansão pode ser uma opção (TEIXEIRA, 1987).

O interessante desta oleaginosa (*Jatropha curcas* L.) é que ela existe de forma espontânea em áreas de solos pouco férteis e de clima desfavorável à maioria das culturas alimentares tradicionais (MELO et al., 2006) e seu cultivo tem baixo custo (FREIRE et al. 2010).

Entretanto, a obtenção do óleo vegetal para a produção de biodiesel pode gerar grande quantidade de resíduos, que são a torta (resíduo da prensagem, geralmente com 7 - 10% de óleo residual) e o farelo (resíduo da extração com solvente com menos de 1 % de óleo residual). Estes resíduos podem ser usados na alimentação de animais ou até mesmo de seres humanos comparados com a soja. Mas, para isto, necessita-se avaliar a segurança alimentar deste resíduo para consumo, pois se sabe que tortas ou farelos de oleaginosas como a mamona e o pinhão-mansão têm componentes tóxicos ou

alergênicos, como a ricina na mamona e a curcina e o éster de forbol no pinhão-manso. Por isto, estes resíduos são utilizados atualmente apenas como adubos. Estudos demonstraram que as unidades de extração de óleo não são economicamente viáveis se não houver o aproveitamento do resíduo da extração (torta ou farelo). Em razão da presença de componentes tóxicos, como os ésteres de forbol e curcina nos farelos de pinhão-manso e da falta de tecnologias viáveis para sua eliminação, estes farelos não são utilizados na alimentação animal, sendo usados exclusivamente como fertilizante, o que reduz a competitividade da cadeia produtiva das culturas de pinhão-manso em relação a outras oleaginosas.

A detoxicação dessas oleaginosas possibilitaria a sua utilização na alimentação de animais (SEVERINO, 2005; ABDALLA et al., 2008), visto que a torta de pinhão-manso contém aproximadamente 28% de proteína bruta em base seca segundo estudos de Makkar et al. (1998) e Souza et al. (2009), o que agregaria valor comercial a esses resíduos e tornaria economicamente viável a sua exploração.

O cultivo desta espécie para a produção industrial de biodiesel e a adequada utilização dos resíduos provenientes da extração do óleo, tem grande potencial de geração de empregos, promovendo, dessa forma, a inclusão social, especialmente quando se considera o amplo potencial produtivo da agricultura familiar, sobretudo no semiárido brasileiro e na região Norte.

O uso de solvente eficaz para a extração do óleo do grão de pinhão-manso e que, ao mesmo tempo seja capaz de detoxicar o farelo, é uma alternativa tecnológica que pode agregar valor à cadeia produtiva do pinhão-manso usado na produção de biocombustível.

1.1 Objetivo geral

Detoxicar e avaliar a qualidade proteica da torta e de cotilédones de pinhão-manso.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar a composição físico-química dos grãos de pinhão-manso e da torta prensada parcialmente desengordurada.
- Determinar a composição físico-química das tortas e cotilédones desengordurados com hexano e etanol.
- Avaliar a qualidade proteica e os efeitos de toxicidade das tortas e cotilédones desengordurados com hexano e etanol com e sem tratamento térmico.
- Avaliar a toxicidade subcrônica.
- Avaliar o tecido hepático dos animais experimentais.
- Avaliar os índices hematológicos dos animais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e seu cultivo

A *Jatropha curcas* L., espécie conhecida por pinhão-manso, pertence à família Euforbiácea. O nome *Jatropha* deriva do grego *iatros* (médico) e *trophé* (alimentos) que remete a utilizações medicinais (HELLER, 1996). Considerada nativa da América Central e do Sul, está presente em toda a América Central, além da África e da Ásia (BECKER, et al., 2008).

O pinhão-manso é uma espécie resistente à seca, amplamente cultivada nos trópicos como cerca viva, sendo um arbusto de crescimento rápido, cuja altura é de 2 a 3 metros, mas pode alcançar até 5 metros. Várias partes da planta são usadas na medicina tradicional. No entanto, as sementes, são tóxicas para os seres humanos e muitos animais. Quantidades consideráveis de grãos de pinhão-manso foram produzidas em Cabo Verde durante a primeira metade do século XX, representando uma contribuição importante para a economia do país, com os grãos sendo exportados para Lisboa e Marselha para extração de óleo e produção de sabão (HELLER, 1996).

No Brasil, o pinhão-manso ocorre praticamente em todas as regiões, sempre de forma dispersa, adaptando-se às diversas condições edafoclimáticas (ALVES et al, 2008). O fruto, formado por um pericarpo ou casca dura e lenhosa, apresenta característica trilocular com uma semente em cada cavidade. Nos estádios iniciais o fruto é verde, passando a amarelo. Quando em estágio de maturação, o fruto tem cor que varia de castanho a preto (PEIXOTO, 1973).

O pinhão-manso é uma planta perene, com capacidade produtiva acima de 50 anos e sua colheita se estende por cerca de seis meses. Pode ser cultivada sem utilização de maquinário, o que a torna ótima opção para estimular a agricultura familiar. Segundo estimativas, a produção de 2000 a 3500 litros de óleo por hectare pode garantir renda média anual entre R\$ 3000,00 a R\$ 4500,00 (ALMEIDA, 2007).

LAVIOLA; DIAS (2008) afirmaram que dependendo do espaçamento, a produtividade poderia passar dos 6000 kg. ha⁻¹ de sementes, produzindo mais

de 2000 kg. ha⁻¹ de óleo. Com o melhoramento genético e o aprimoramento do sistema de produção, o pinhão-manso poderia produzir acima de 4000 kg. ha⁻¹ de óleo.

Segundo Arruda et al. (2004) o cultivo de pinhão-manso no semiárido nordestino, que possui solos pouco férteis e arenosos, pode ser interessante alternativa para produção de óleo para fins energéticos usando mão-de-obra familiar, pois é uma cultura viável para pequenas propriedades rurais, sendo mais uma fonte de renda e emprego para a região. Seu cultivo tem baixo custo e alta produtividade.

Os aspectos agronômicos do cultivo do pinhão-manso foram pesquisados apenas nos últimos trinta anos (SATURNINO et al., 2005). Desde janeiro de 2008 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa n.4, autorizou a inscrição da espécie *Jatropha curcas* L. no Registro Nacional de Cultivares (RNC). Isto só foi possível devido a estudos recentes sobre o desempenho agronômico da cultura e sobre o desempenho das sementes (PINTO et al., 2009).

2.2 Composição do grão do pinhão-manso

O epicarpo e a casca compõem a maior parte do fruto (Figura 1). Com a retirada desses dois componentes, sobra o albúmen (os cotilédones ou amêndoas) que chega a conter 60 % de óleo. A composição média do fruto do pinhão-manso analisada em diversos lotes de sementes oriundas de Riacho da Cruz, município de Januária, está apresentada na Tabela 1.

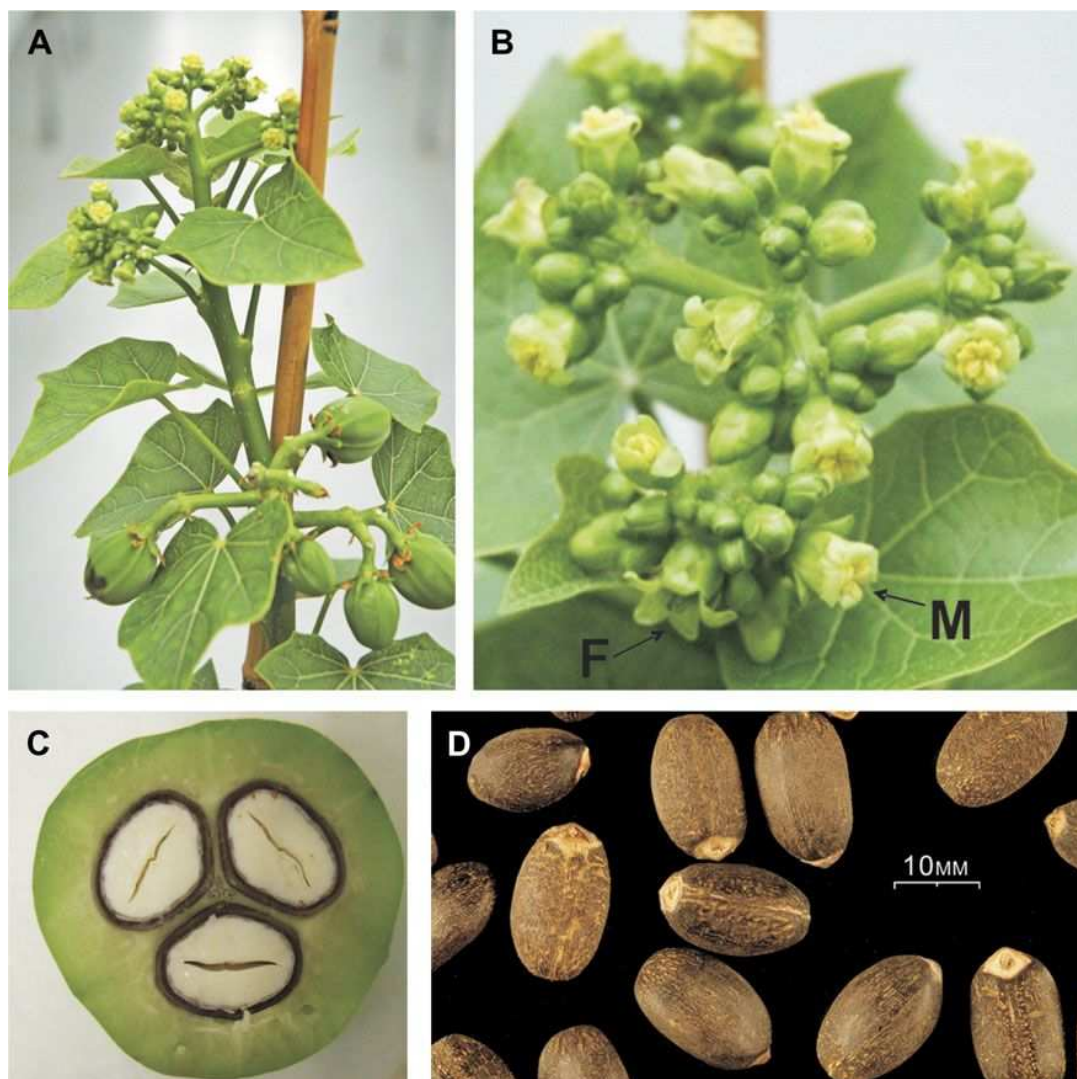


Figura 1: (A) Planta jovem de *Jatropha curcas* L. com flores e vagens em desenvolvimento. (B) Inflorescência contendo flores estaminadas masculinas (M) e flores pistiladas femininas (F) de *Jatropha curcas* L.. (C) Seção transversal de vagem de *Jatropha curcas* L. contendo três sementes. (D) Sementes maduras de *Jatropha curcas* L..

Fonte: KING et al. (2009).

Teixeira (1987) avaliando o teor e a composição do óleo de *Jatropha curcas* cultivado no estado de São Paulo, obteve teor final médio de óleo, $34 \pm 1,4\%$. Este valor foi detectado a partir do momento em que os frutos de pinhão-manso passaram a apresentar os primeiros sinais de maturação. Segundo este autor, essa informação é de interesse para definir quando coletar os frutos, pois a coleta de frutos maduros somente dificulta e onera essa prática.

Tabela 1: Composição média do fruto do pinhão-manso (diversos lotes).

Partes	Peso de 100 unidades (g)	Umidade (%)	Teor de óleo base seca (%)
Fruto inteiro	86,7 a 100	11,0	28,1
Epicarpo	22,7 a 26,2	14,8	-----
Semente	64,0 a 73,8	9,5	38,1
Casca	24,1 a 27,8	16,2	-----
Albúmen	39,9 a 46,0	5,6	60,8

Fonte: CETEC, citado em www.pinhaomanso.com.br.

Em estudos de Arruda e colaboradores (2004), o teor de óleo dos grãos apresentou variabilidade entre 25 a 40%. Já Freitas e colaboradores (2011), ao utilizarem métodos indiretos de análise, quantificaram teores de óleo entre 16,0 e 45,6%.

Pelo exposto, é importante salientar o elevado conteúdo de óleo encontrado em pinhão-manso. Seus altos índices de produtividade de óleo colocam-no entre as principais oleaginosas potencialmente utilizáveis para a produção de biocombustíveis.

Quanto à composição desse óleo em ácidos graxos, foram encontrados em média valores de $15 \pm 0,5\%$ para o ácido palmítico, $3 \pm 0,4\%$ para o ácido esteárico, $30 \pm 1,6\%$ para o ácido oléico e $52 \pm 2\%$ para o ácido linoléico. O teor de ácidos graxos variou pouco, verificando-se tendência de elevação do teor de ácido oléico (24 a 29%) com a diminuição do teor de ácido linoléico (59 a 52%). Segundo ADEBOWALE; ADEDIRE (2006) em relação ao conteúdo em óleo, os cotilédones de pinhão-manso apresentaram o conteúdo acima de 66,4% tendo como lipídio dominante o triacilglicerol, com ácido linoléico em maior quantidade.

Em outro estudo, em análises preliminares de pinhão-manso feitas no ITAL, (Instituto de Tecnologia de Alimentos- Campinas, S.P.) pode-se verificar que as amostras apresentaram em sua composição principalmente os ácidos: oléico (C18:1) (32 – 44%); linoléico (C18:2) (34 – 49%) e palmítico (C16:0) (12 - 14%) (MARQUES; FERRARI 2008).

Casarini; Ferrari; Marques (2009), analisaram 27 amostras de sementes de pinhão-mansão e determinaram o rendimento em óleo nas sementes que variou de 11,3% a 39,7%. A composição em ácidos graxos é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Valores médios e desvios padrão da composição em ácidos graxos de grãos de pinhão-mansão.

Ácido Graxo	Teor %
Palmítico (C16:0)	13,2 (0,58)
Palmitoléico (C16:1 ω 7)	0,8 (0,08)
Margárico (C17:0)	0,1 (0,00)
Esteárico (C18:0)	6,6 (0,87)
Oléico (C18:1 ω 9)	44,8 (5,69)
Linoléico (C18:2 ω 6)	33,8 (6,60)
Araquídico (C20:0)	0,2 (0,04)
Alfa linolênico (C18:3 ω 3 α)	0,2 (0,04)
Σ Saturados	20,27 (1,2)
Σ Monoinsaturados	45,62 (5,6)
Σ Poliinsaturado	34,04 (6,6)

Fonte: CASARINI; FERRARI; MARQUES (2009).

A composição em aminoácidos da proteína do farelo desengordurado de quatro variedades de pinhão-mansão de diferentes regiões agroclimáticas originárias do México está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Composição em aminoácidos da proteína do farelo desengordurado de quatro variedades de *Jatropha curcas* originárias do México e valores de aminoácidos essenciais sugeridos pela FAO/WHO 1991 (g 16 g⁻¹ N).

Aminoácido	Mínimo	Máximo	FAO/WHO*
Essenciais			
Cistina	1,6	1,8	2,5 ^a
Metionina	1,4	1,6	
Valina	3,8	4,4	3,5
Isoleucina	3,0	3,9	2,8
Leucina	5,9	6,6	6,6
Tirosina	2,5	3,4	6,3 ^b
Fenilalanina	3,8	4,2	
Histidina	2,7	2,9	1,9
Lisina	3,5	3,6	5,8
Treonina	3,2	3,3	3,4
Triptofano	ND	ND	1,1
Não essenciais			
ácido aspártico	11,4	12,2	
Prolina	3,86	4,21	
Serina	4,59	4,91	
ácido glutâmico	14,7	16,7	
Glicina	4,16	4,40	
Alanina	4,26	4,51	
Arginina	10,4	11,8	

*FAO/WHO 1991: referência sugerida para crianças de 2-5 anos.

^acistina + metionina. ^btirosina + fenilalanina.

Fonte: MARTINEZ-HERRERA et al. (2006), modificado.

De acordo com os valores recomendados pela FAO/WHO (1991) podemos observar que os aminoácidos sulfurados cistina e metionina, a histidina e a lisina estão abaixo da necessidade para crianças de 2 a 5 anos de idade.

Como o ser humano não sintetiza em quantidade suficiente os aminoácidos essenciais relacionados na tabela 3, faz-se necessária a ingestão dos

alimentos que contem estes aminoácidos em quantidade que supra a necessidade humana.

Makkar et al. (1997) estudando as características de 18 variedades de pinhão-manso originárias de várias regiões do mundo, como Costa Rica e Índia por exemplo, encontraram os valores apresentados na Tabela 4, enquanto Martinez-Herrera et al. (2006) estudaram a composição de quatro variedades de pinhão-manso originárias do México. Estas características estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 4: Características tecnológicas e químicas de grãos de 18 variedades de pinhão-manso.

Característica	Mínimo	Máximo
peso médio da semente (g)	0,49	0,86
% cotilédone	54	66
% casca	34	46
composição do cotilédone		
característica (%)	Mínimo	Máximo
proteína Bruta	22	31
lipídeos	43	59
fibra alimentar(detergente neutro)	3,5	6,1
cinzas	3,4	5,0

Fonte: MAKKAR et al.(1997), modificado.

Tabela 5: Características tecnológicas e químicas de grãos de quatro variedades de pinhão-mansó.

Característica	Mínimo	Máximo
peso médio da semente (g)	0,44	0,72
Peso médio do cotilédone (g)	0,31	0,49
Peso médio da casca (g)	0,13	0,23
composição do cotilédone		
característica (%)	Mínimo	Máximo
Cotilédone	68,1	70,1
Casca	29,9	31,9
proteína Bruta	31,1	34,5
lipídeos	55,3	57,7
fibra (detergente neutro)	3,9	4,5
Cinzas	3,8	5,1

Fonte: MARTINEZ-HERRERA et al.(2006), modificado.

Comparando os valores apresentados nas duas tabelas (4 e 5), observamos que os dados apresentados por Martinez-Herrera et al.(2006) são valores bem maiores que as apresentadas por Makkar et al. (1997), possivelmente os métodos atuais de extração das substâncias foram mais eficientes que as utilizadas na década de 90.

2.3 Fatores antinutricionais do grão do pinhão-mansó

Os fatores antinutricionais designam compostos ou classes de compostos presentes nos alimentos de origem vegetal, e podem reduzir o valor nutritivo desses alimentos (GRIFFITHS; BIRCH; HILLMAN, 1998).

Estes compostos podem reduzir a biodisponibilidade de minerais (oxalatos, fitatos), a digestibilidade de proteínas (taninos), inibir a enzima citocromo oxidase (cianeto), e as enzimas proteolíticas (inibidores de proteases), e ainda formar compostos carcinogênicos (nitritos) (BENEVIDES et al., 2011).

Entre os compostos tóxicos isolados das sementes de pinhão-mansó são citados: PD-glicosídeos de sitosterol (Bose et al., 1961), a curcuma, pertencente ao gênero das lectinas (Siegel 1983; Mourgue et al., 1961; Stirpe et al. 1976), e alguns flavonóides (Mourgue et al. 1961). A torta possui também alta atividade

de inibidores de tripsina que podem ser reduzidos por meio de tratamento térmico (ADERIBIGBE et al. 1997). A presença de uma proteína tóxica, a curcina, é capaz de inibir a síntese de proteínas em estudos *in vitro* (KUMAR; SHARMA, 2008).

Outro agente tóxico presente em alta concentração é o grupo dos ésteres de forbol. Estes ésteres são resistentes ao tratamento térmico, mesmo a temperaturas elevadas, não sendo inativados nem por tratamento a 160 °C por 30 minutos (MAKKAR et al., 1997). Somente por meio de tratamentos químicos é possível reduzir a sua concentração na torta.

Os ésteres de forbol, considerados os principais responsáveis pela extrema toxicidade apresentada pelos grãos de pinhão-manso, são moléculas derivadas de diterpenos tetracíclicos derivados do tigliane, (Figura 2) com atividade promotora de tumor. Sua ação é semelhante à do diacilglicerol, que ativa a proteína quinase C (PKC) regulando sinais de vias transdutoras e outras atividades metabólicas celulares (GOEL, et al., 2007). A ingestão acidental por humanos provoca tonturas, vômitos e diarreia, e, em condições extremas, tem-se registro de casos com óbitos (KUMAR; SHARMA, 2008).

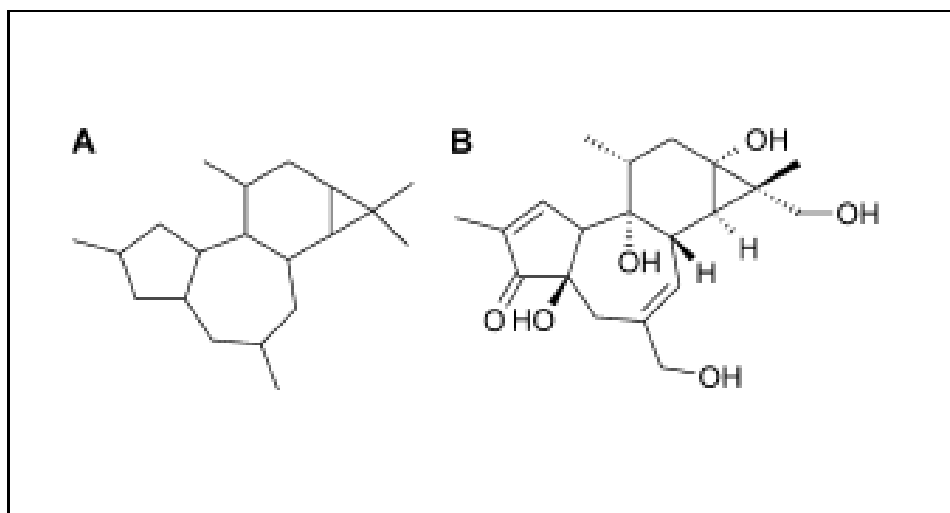


Figura 2: (A) Anel de tigliane (B) 12-hidroxi, -16-deoxiforbol.

Fonte: HAAS, et al.(2002).

Adam (1974), Liberalino et al. (1988) e El-Badawi et al. (1995), observaram alta mortalidade ou condições patológicas severas em

experimentos com animais, alimentados com dietas contendo 0,5% ou mais de sementes ou partes da semente de pinhão-manso. Estes e outros trabalhos mostram as limitações do pinhão-manso como alimento ou fonte de alimentação para animais.

Makkar et al. (1997) analisando 18 variedades de pinhão-manso originárias de várias regiões do mundo encontraram valores de atividade de inibidor de tripsina variando de 18,4 a 27,5 mg de tripsina inibida por grama de farelo desengordurado. Para a atividade coagulante da lectina, foram encontrados valores de 51,3 a 204,0 (inverso da concentração mínima em mg.mL^{-1} que produzia a aglutinação de uma quantidade padrão de eritrócitos). Além disso, foram encontrados valores variando de 6,2 a 10,1 % para fitatos e de 1,82 a 3,4 % para saponinas. Para os ésteres de forbol, foram encontrados valores variando de 0,87 a 3,3 mg.g^{-1} como a soma das concentrações de três isômeros, sendo o phorbol-12-miristato, 13-acetato o principal isômero.

Makkar et al. (1998) comparando variedades tóxicas com uma variedade não tóxica (originária do México) encontraram valores de atividade de inibidor de tripsina variando de 18,4 a 26,5 mg de tripsina inibida por grama de farelo desengordurado. O maior valor foi encontrado na variedade não tóxica. Para a atividade coagulante da lectina, foram encontrados valores de 51,3 a 102,0 (inverso da concentração mínima em mg.mL^{-1} que produzia a aglutinação de uma quantidade padrão de eritrócitos). O menor valor foi encontrado na variedade não tóxica. Para os ésteres de forbol, foram encontrados valores variando de 0,11 a 2,7 mg.g^{-1} como a soma das concentrações de três isômeros, sendo o phorbol-12-miristato-13-acetato o principal isômero. A variedade não tóxica foi a que apresentou a menor concentração de ésteres de forbol.

Segundo Makkar, Francis e Becker (2008), o que leva ao impedimento da utilização da torta do pinhão-manso como fonte nutritiva para a produção de ração animal é o grande reservatório de compostos antinutricionais, como os ésteres de forbol, inibidores de tripsina, lectinas e fitatos. Em um concentrado de proteínas produzido a partir da torta de pinhão-manso foram encontradas quantidades consideráveis de todas as substâncias citadas acima.

2.4 Desalergenização - detoxicação

As Tabelas 6 e 7 apresentam as concentrações dos fatores antinutricionais após aplicação de diversos tratamentos em amostras de pinhão-manso originárias do México e da Nicarágua. Nestas tabelas, o tratamento 1 é simplesmente o farelo desengordurado (semente moída e desengordurada com hexano / éter de petróleo).

Nos tratamentos 2 e 6 da tabela 6 o farelo desengordurado foi tratado com metanol ou água e nos tratamentos 3 e 4 da tabela 7, o farelo desengordurado foi tratado com etanol. A concentração de éster de forbol nestes casos foi muito baixa, pois o éster de forbol é solúvel em metanol e água e etanol. Os outros tratamentos (autoclave, NaOH, HClO e outros tratamento químicos) não eliminaram os ésteres de forbol, embora tenham algum efeito sobre os demais fatores antinutricionais.

Tabela 6: Concentração de éster de forbol e de lectina de quatro variedades de *Jatropha curcas* originárias da Nicarágua após diversos tratamentos

Tratamentos	Éster de forbol (mg. g ⁻¹)	Lectina (*)
1	1,78	102
2	0,09	ND
3	1,78	1,17
4	0,13 - 0,46	ND
5	0,18	ND
6	ND	ND

Fonte: AREGHEORE; BECKER ; MAKKAR (2003), modificado.

*inverso da concentração mínima em mg/mL que produzia a aglutinação de uma quantidade padrão de eritrócitos.

ND = não detectado.

¹Controle sem tratamento.

²Desengordurado, tostado e extraído com metanol.

³Desengordurado e tostado, adicionado de água até 66% de umidade e autoclavado a 121 °C/30 min, liofilizado e moído.

⁴NaOH + HClO (várias concentrações), autoclavado a 121 °C/30 min, liofilizado e moído.

⁵NaOH, autoclavado a 121 °C/30 min, liofilizado e moído. Extração com metanol, liofilizado e moído.

⁶NaOH, autoclavado a 121 °C/30 min, liofilizado e moído. Extração com água, liofilizado e moído.

Aregheore, Makkar e Becker (1998) observaram inativação total de lectinas provenientes de farinha extraída de sementes de *Jatropha curcas* L., quando utilizaram tratamento térmico com calor úmido (66% de umidade, 121 °C por 30 minutos) e manutenção da atividade de lectinas com calor seco (130 e 160 °C por 20, 40 e 60 minutos) em variedades tóxicas e não tóxicas.

Tabela 7: Concentrações mínimas e máximas dos fatores antinutricionais de quatro variedades de *Jatropha curcas* originárias do México

	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5
Inibidor de tripsina (mg/g)	33,1-36,4	0,53-0,68	30,6-36,0	0,57-0,61	33,2-37,8
Ácido fítico (%)	8,54-9,27	8,92-9,88	10,1-10,7	11,3-12,0	6,04-8,12
Fenóis totais (g/100g)	0,15-0,24	0,29-0,38	0,14-0,19	0,27-0,32	0,17-0,23
Saponinas (g/100g)	2,14-2,85	1,96-3,0	1,4-1,51	1,07-1,29	1,30-1,76
Lectina (*)	0,35-1,46	5,89-12,2	0,38-1,52	11,8-23,2	6,75-6,82
Éster de forbol (mg/g)	ND-3,85	ND-0,95	ND-0,16	ND-0,08	ND-3,16

Fonte: MARTINEZ-HERRERA et al. (2006), modificado.

ND = não detectado.

*inverso da concentração mínima em mg/mL que produzia a aglutinação de quantidade padrão de eritrócitos.

¹ Amostras desengorduradas.

² Desengordurada, tratada com NaHCO₃, autoclavado 121 °C/20 min, liofilizado e moído.

³ Desengordurada, extraída com etanol 90%, liofilizada e moída.

⁴ Desengordurada, extraída com etanol, liofilizada e moída, tratada com NaHCO₃, autoclavado 121 °C/20 min, liofilizado e moído.

⁵ Desengordurada, tratada com NaHCO₃, liofilizada, moída e irradiada com bomba de cobalto.

2.5 Métodos de extração de óleos e gorduras

Óleos e gorduras são extraídos de fontes animais ou vegetais. O processo mais primitivo para a obtenção desses produtos consiste no aquecimento e hidratação da matéria-prima para a coagulação de proteínas e carboidratos, o que provoca a separação do óleo ou gordura fundida. O processo ainda é usado na produção artesanal em pequenas comunidades e para a extração de óleos e gorduras de origem animal (MORETTO; FEET; 1998).

O segundo processo é o de extração por prensagem, que consiste em espremer a matéria-prima para separar o óleo ou gordura. Atualmente a prensagem é usada para a extração de matérias-primas com altos teores de óleos. O processo não é muito eficiente e sempre deixa certa quantidade de óleo residual (8 a 15%) nas "tortas" (MORETTO; FEET; 1998).

O processo mais moderno é o da extração por solvente. A matéria-prima a ser extraída é moída e misturada com um solvente. O óleo se dissolve no solvente e a mistura de óleo e solvente (miscela) é separada do resíduo (farelo) por filtração ou decantação. Com a repetição do processo pode-se chegar a teores de óleo residuais da ordem de 0,5% no material que sobra da extração (farelo) (SWERN, 1979).

No final do processo, a mistura de solvente e óleo é destilada para a separação do óleo e a recuperação do solvente que é reutilizado para novas extrações (WAN, 1991). Também o farelo é aquecido para retirada e recuperação do solvente e para a inativação de fatores antinutricionais.

Na indústria, a extração do óleo de sementes oleaginosas com teores de óleo maiores que 30% é feita pelos dois processos, em duas etapas. Na primeira etapa, a maior parte do óleo é extraída por prensagem, deixando um teor de óleo residual na torta da ordem de 8 a 15%. Na segunda etapa, a extração é feita com solventes, sendo o hexano o solvente padrão para este processo (SWERN, 1979, HOFFMAN, 1989).

Embora o hexano seja o solvente padrão para a extração de óleos, por razões de custo, disponibilidade, toxidez e principalmente segurança, o hexano é altamente explosivo. Portanto, vários outros solventes foram avaliados para a

extração de óleos vegetais (ELDRIDGE et al., 1963). Em todos os períodos de alta do preço do petróleo, o etanol é citado como um solvente alternativo para a extração de óleos vegetais (SILVA E TURATTI, 1991). Em 1940, na Manchuria, devido à falta de hexano, os japoneses usaram etanol em uma instalação industrial para extrair óleo de soja (OKAMOTO, 1947). RAO et al. (1955), RAO; ARNOLD (1956) estudaram a utilização de etanol para a extração do óleo de sementes como algodão, soja, milho, colza, girassol, gergelim, palma, linho, amendoim entre outras. Embora o éster de forbol seja solúvel em alcoóis como o metanol e o etanol (GOEL et al, 2007), não foram encontradas referências sobre a utilização do etanol para a extração de óleo de pinhão-mansão.

Segundo Van Cleef (2008), coprodutos da agricultura e da agroindústria têm potencial para uso na alimentação de animais. O principal coproduto usado atualmente é o farelo de soja, que é empregado na fabricação de rações e até na alimentação de seres humanos (ERICKSON, 1995). A extração de óleos de sementes oleaginosas é mais rentável quando o resíduo da extração é usado como alimento para animais ou humanos. Porém, em alguns casos, como a mamona, pinhão-mansão e até soja, o resíduo deve ser tratado para melhoria do valor nutritivo (SMITH et al., 1988).

2.6 Avaliação da qualidade proteica

A qualidade da proteína é uma medida da biodisponibilidade da proteína e sua avaliação como forma de determinar a capacidade que as proteínas alimentares e as dietas têm de satisfazer as exigências metabólicas de aminoácidos e nitrogênio não-essencial, para fins de síntese proteica (PIRES, et al., 2006; SOLAE, 2009).

O valor nutritivo da proteína depende da composição, digestibilidade, biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais, ausência de toxicidade e ou de propriedades antinutricionais (SGARBIERI, 1996).

Sendo assim, para determinar a qualidade proteica, deve-se calcular a digestibilidade verdadeira, o escore químico de aminoácidos e a digestibilidade proteica corrigida pelo escore químico (PDCAAS).

A digestibilidade verdadeira é calculada através de ensaios biológicos para saber a relação entre a proteína que foi ingerida, hidrolisada pelas enzimas digestivas e absorvida pelo organismo na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado e a proteína excretada (MONTEIRO et al., 2004). A digestibilidade verdadeira é calculada por meio de nitrogênio proveniente do próprio animal e que é excretado nas fezes junto com a proteína ingerida na dieta. O nitrogênio de origem endógena do animal é determinado nas fezes de um grupo igual de animais submetidos a uma dieta aprroteica por igual período de experimento (SGARBIERI, 1996).

O escore químico de aminoácidos é definido como a relação entre o conteúdo do primeiro aminoácido limitante na proteína, em mg/g, e o conteúdo desse aminoácido em uma proteína de referência em mg/g. O padrão de referência para seres humanos é uma proteína que supre a necessidade de aminoácidos essenciais para crianças entre 2 e 5 anos de idade (FAO WHO, 1991).

Aminoácido limitante é aquele que aparece na proteína estudada em concentrações inferiores às encontradas em uma proteína de referência ou requeridas pelo organismo receptor. O Aminoácido limitante irá diminuir o valor nutritivo da proteína prejudicando a capacidade do organismo de sintetizar suas próprias proteínas em nível de tecidos e células (SGARBIERI, 1996).

O PDCAAS é definido pela digestibilidade verdadeira multiplicada pelo escore químico de aminoácidos (fator de correção da digestibilidade). (FAO WHO, 1991).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria prima

Foram utilizados 800 kg de grãos de *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansão) adquiridas em Janeiro de 2010, na Fazenda Primavera (Viçosa/MG), e 200 kg de torta parcialmente desengordurada fornecida pela empresa Fusermann Biodiesel (Refinaria Nacional de Petróleo Vegetal LTDA - Barbacena/MG) em julho de 2010. Segundo informação do fornecedor, para a produção da torta, grãos de pinhão-mansão com casca foram moídos em moinho de martelo, cozidos a 110 °C por 30 minutos e prensados em prensa contínua tipo “*expeller*” até o teor de óleo residual da ordem de 7 a 9 %.

3.2 Preparo das tortas e cotilédones desengordurados

3.2.1 Torta Fusermann desengordurada com hexano

Extração com hexano (marca Vetec) em extrator Soxhlet por 12 horas (AOAC, 1990).

3.2.2 Torta Fusermann desengordurada com etanol

A torta desengordurada com etanol (marca Pring) foi preparada na planta piloto de extração de óleos por solvente do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, MG. O extrator consta de cinco tanques com capacidade de 20 litros cada, nos quais foram colocados sacos de tecido grosso contendo porções de 5 a 6 kg de torta de pinhão-mansão e 10 litros de etanol 96% (m/m). O solvente circula em um circuito fechado com trocador de calor para manter a temperatura em 65 °C.

Cada batelada foi extraída cinco vezes num sistema em contracorrente. A miscela resultante da quinta extração de um tanque, com etanol puro, foi usada para a primeira extração do tanque seguinte. A miscela resultante desta

extração foi usada para a segunda extração do próximo tanque e assim por diante. A seguir o farelo foi dessolventizado por aquecimento em tacho com camisa de vapor até a evaporação do etanol residual.

3.2.3 Cotelédones desengordurados

As sementes foram quebradas em moinho de café e as cascas separadas manualmente dos cotelédones. Os cotelédones foram triturados em aparelho liquidificador até granulometria suficiente para passar em peneira mesh 1,16 mm. Em seguida foram extraídos com etanol (18 horas) ou com hexano (12 horas) em extrator Soxhlet. Os farelos extraídos com hexano foram dessolventizados em temperatura ambiente (20 a 30 °C). Os farelos extraídos com etanol foram dessolventizados também em temperatura ambiente por 24 horas e depois por uma hora na estufa a 105 °C.

3.2.4 Tratamento térmico

Parte dos cotelédones desengordurados com hexano foi tratada em autoclave a 120 °C, durante 30 minutos para a inativação dos fatores antinutricionais. Parte dos cotelédones desengordurados com etanol foi umedecida com água até 30% de umidade e tratada em autoclave a 120 °C, durante 40 minutos para a inativação dos fatores antinutricionais.

3.3 Análises físico-químicas da matéria prima e farelos

3.3.1 Composição dos grãos: proporção de cascas e cotelédone

Por separação manual e pesagem das partes em balança analítica.

3.3.2 Composição dos grãos e cotelédones: determinação da umidade, lipídios ou extrato etéreo, proteína bruta (nitrogênio total) e cinzas

Foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), da Universidade Federal de

Viçosa (UFV), Viçosa-MG, conforme metodologia adotada pelo Instituto Adolfo Lutz (2005).

3.3.3 Determinações de matéria seca, cinzas, nitrogênio total, proteína bruta, lipídios, fibra e minerais

Foram executadas no Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da UFV.

a) Determinação de Matéria Seca – Pré-secagem utilizando estufa com circulação forçada de ar a 55 °C por 16 a 24 horas para retirar um pouco da umidade.

b) Matéria Seca total – Secagem definitiva utilizando estufa com circulação forçada de ar a 100 °C por 24 horas ou 105 °C por 16 horas.

c) Determinação de Cinzas – Aquecimento das amostras até 600 °C, seguindo recomendações da Association of Analytical Communities (A.O.A.C.), 1990.

d) Determinação de nitrogênio total e proteína bruta - pelo método semimicro Kjeldhal, segundo a AOAC, 1998. No cálculo de conversão do nitrogênio em proteína total, utilizou-se o fator de conversão 6,25.

e) Determinação de extrato etéreo – As análises foram feitas (AOAC, 1990) no extrator Soxhlet usando éter de petróleo como solvente em temperatura de 35 °C por 24 horas aproximadamente.

f) Determinação de fibras – As análises foram feitas segundo Métodos Físico Químicos para Análise de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz (2005).

g) Determinação de minerais - realizada segundo Silva e Queiroz (2002), por espectrofotometria de absorção atômica nas soluções minerais preparadas a partir do resíduo da determinação de cinzas.

3.3.4 Composição em aminoácidos e escore químico

As análises foram feitas pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) Campinas, S.P. As análises de triptofano foram determinadas segundo técnicas descritas por SPIES, J.R (1967). As análises de aminoácidos totais foram determinadas segundo técnicas descritas por HAGEN, S.R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J, (1989) e WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C., (1986). Os resultados desta análise foram usados para os cálculos de escore químico (CS) e de digestibilidade proteica corrigida pelo escore químico (PDCAAS) (FAO/WHO, 1991; SGARBIERI, 1996).

3.3.5 Determinação dos ésteres de forbol

A determinação dos ésteres de forbol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) seguindo metodologia proposta por Makkar et al. (1997) modificada conforme se segue: 10,0 gramas de amostra foram extraídos com metanol (4 x 10 mL). Em seguida, os extratos foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com metanol.

Os extratos obtidos foram analisados por HPLC em um sistema (SHIMADZU, LC-10AD VP, Japão) conectado a um detector de feixe de fotodiodo (SHIMADZU, UV-Visível, Japão) e integrador-processador (SHIMADZU, SCL-10A VP, Japão) com duas bombas e injeção automática, utilizando uma coluna empacotada (apHera™ C18 Polymer, Supelco) com octadecilsilicone de 125 x 4 mm e tamanho de partícula 5 µm. Fase móvel: acetonitrila e água (80: 20). Como padrão utilizou-se 12-miristato 13-acetato de forbol sintético 99 % (Sigma - Aldrich, USA). Os resultados foram expressos em mg.g⁻¹ de amostra.

3.4 Ensaios biológicos

Foram realizados dois ensaios biológicos. O primeiro ensaio, usando cotilédones desengordurados com hexano, com e sem tratamento térmico, foi realizado no Laboratório de Experimentação Animal, da Faculdade de Minas (FAMINAS – Muriaé, M.G.). O segundo ensaio, usando tortas e cotilédones desengordurados com etanol, com e sem tratamento térmico, foi realizado no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

3.4.1 Avaliação da qualidade nutricional da proteína (primeiro ensaio - cotilédones desengordurados com hexano, com e sem tratamento térmico)

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Minas (FAMINAS – Muriaé, M.G.) sob o parecer 110709/0001.

Para avaliação da qualidade nutricional das proteínas dos cotilédones desengordurados com hexano, com e sem tratamento térmico, foram preparadas as seguintes dietas:

1. Uma dieta aprotéica.
2. Uma dieta padrão à base de caseína (proteína-referência).
3. Uma dieta contendo como fonte proteica os cotilédones desengordurados com hexano sem tratamento térmico (CDH).
4. Uma dieta contendo como fonte proteica os cotilédones desengordurados com hexano autoclavados a 120 °C, durante 30 minutos (CDHA).

A composição das dietas experimentais baseou-se na dieta AIN-93G (REEVES et al., 1993), modificada de modo a fornecer 9 a 10% de proteína, conforme Tabela 8. O teor de proteína das amostras foi determinado em triplicata, pelo método semimicro Kjeldahl (AOAC, 1997), multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator de conversão 6,25.

Tabela 8: Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico de qualidade proteica (g.100g⁻¹)

Componentes	Aproteica	Caseína	CDH	CDHA
Caseína	-	12,08	-	-
Amido dextrinizado	13,2	13,2	13,2	13,2
CDH	-	-	25,64	-
CDHA	-	-	-	24,01
Sacarose	10,0	10,0	10,0	10,0
Óleo de soja	7,0	7,0	7,0	5,4
Fibra	5,0	5,0	5,0	5,0
Mistura mineral	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura vitamínica	1,0	1,0	1,0	1,0
L-Cistina	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho	59,75	47,67	34,11	40,0

CDH - Cotilédones desengordurados com hexano sem tratamento térmico.

CDHA - Cotilédones desengordurados com hexano autoclavados a 120 °C, durante 30 minutos.

Os ingredientes para o preparo das dietas foram pesados separadamente em balança de precisão Olemann BN12-1200 e misturados em uma batedeira, sendo adicionados em ordem crescente de quantidade. As dietas foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenadas sob refrigeração (5 °C) até a sua utilização.

Foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*), da linhagem Wistar, recém-desmamados, com 30 dias de

idade, pesando em média 100,1 g, fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, MG.

Os ratos foram divididos em grupos de seis animais, de forma sistemática, sendo que a média de peso não ultrapassasse 10 gramas. Os animais foram distribuídos em gaiolas de aço individuais, devidamente identificadas, recebendo água e alimento à vontade. O peso corporal foi registrado semanalmente durante o período experimental para o cálculo do PER, NPR e digestibilidade.

No primeiro dia, foram pesadas 100 g de dieta para cada animal dos grupos experimentais, anotando-se o peso do comedouro mais o peso da dieta. Então os ratos foram alimentados com esta dieta durante os sete primeiros dias.

No oitavo dia, os comedouros com o resto das dietas foram pesados para avaliação do consumo alimentar, foram retirados os jornais utilizados abaixo das gaiolas e pesados os restos de dieta contidos nos mesmos, sendo que as fezes foram descartadas. Neste mesmo dia, os animais foram pesados e seus pesos anotados e as dietas foram substituídas por 15 g de dieta marcada com corante índigo-carmim na proporção de 200 mg/100 g de dieta, com o intuito de se realizar a avaliação da digestibilidade.

3.4.2 Avaliação da qualidade nutricional da proteína (segundo ensaio - tortas e cotilédones desengordurados com etanol, com e sem tratamento térmico)

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (Projeto 63/2011).

Para avaliação da qualidade nutricional das proteínas das tortas e dos cotilédones desengordurados com etanol, com e sem tratamento térmico, foram preparadas as seguintes dietas:

1. Uma dieta aprotéica.
2. Uma dieta padrão à base de caseína (proteína-referência).
3. Uma dieta tendo como fonte proteica cotilédones desengordurados com etanol sem tratamento térmico (CDE).
4. Uma dieta tendo como fonte proteica cotilédones desengordurados com etanol autoclavados a 120 °C, durante 40 minutos (CDEA).
5. Uma dieta tendo como fonte proteica torta desengordurada com etanol sem tratamento térmico (TDE).
6. Uma dieta tendo como fonte proteica torta Fusermann desengordurada com etanol autoclavada a 120 °C, durante 40 minutos (TDEA).

A composição das dietas experimentais baseou-se na dieta AIN-93G (REEVES et al., 1993), modificada de modo a fornecer 9 a 10% de proteína, conforme tabela 9. O teor de proteína das amostras foi determinado em triplicata, pelo método semimicro Kjeldahl (AOAC, 1997), multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator de conversão 6,25.

Tabela 9: Composição das dietas experimentais baseada na dieta AIN-93G (REEVES et al., 1993), modificada de modo a fornecer 9 a 10% de proteína.

Ingredientes (g/100g)	Dietas					
	Aproteica	Caseína	CDE	CDEA	TDE	TDEA
Caseína	-	9 a 10	-	-	-	-
Amido dextrinizado	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2
Pinhão-manso	-	-	9 a 10	9 a 10	9 a 10	9 a 10
Sacarose	10	10	10	10	10	10
Óleo de soja	7	7	7	7	7	7
Celulose	5	5	5	5	5	5
Mistura mineral	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura vitamínica	1	1	1	1	1	1
L-Cistina	3	4,5	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de colina	2,5	2,5	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho	Qsp 100	Qsp 100	Qsp 100	Qsp 100	Qsp100	Qsp 100

CDE - dieta tendo como fonte proteica os cotilédones de pinhão-manso desengordurados com etanol sem tratamento térmico;

CDEA - dieta tendo como fonte proteica os cotilédones de pinhão-manso desengordurados com etanol umedecidos a 30% e autoclavados a 120 °C, durante 40 minutos;

TDE - dieta tendo como fonte proteica torta desengordurada com etanol sem tratamento térmico;

TDEA - dieta tendo como fonte proteica torta desengordurada com etanol umedecida a 30% e autoclavada a 120 °C, durante 40 minutos.

O ensaio biológico foi conduzido durante 28 dias, sendo que, nos primeiros quatorze dias foi avaliada a qualidade proteica (digestibilidade verdadeira, PER e NPR), e no final dos 28 dias, avaliada a toxicidade subcrônica.

Ao todo foram utilizados 48 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*), da linhagem Wistar, recém-desmamados com 23

dias de idade, pesando entre 57 e 68 g, fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, MG.

Os animais foram divididos em grupos de oito, de modo que a diferença entre as médias dos pesos não excedesse 10 g, conforme recomendação da A.O.A.C. (1997). Distribuíram-se os animais em gaiolas de aço inoxidável individuais, mantidos em ambiente com temperatura controlada de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, com ciclo de luz de 12 horas, recebendo água e alimento à vontade. O peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram registrados semanalmente durante o período experimental.

Os ratos foram alimentados com dieta normal (sem marcador) durante os sete primeiros dias. No 8º dia, as dietas normais foram retiradas, sendo substituídas por dieta marcada com 200 mg do corante índigo carmim/100 g de dieta. No 9º dia, as dietas marcadas foram retiradas e substituídas por dietas normais, sendo coletadas somente as fezes marcadas. Todas as fezes foram coletadas no 10º dia do experimento. No 11º dia a dieta normal foi substituída novamente por dieta marcada e no 12º dia foram coletadas somente as fezes não marcadas, havendo troca para dieta normal, sendo esta mantida até o final do experimento.

A eutanásia dos animais foi realizada imediatamente após o término do experimento, por asfixia em recipiente fechado contendo CO_2 e seguida de incisão nas paredes das cavidades abdominal e torácica para a coleta de sangue por ressecção da aorta abdominal. As fezes coletadas do 9º ao 12º dia do experimento foram acondicionadas em recipientes individuais e mantidas sob refrigeração. Após o período de coleta, as fezes foram secas em estufa com circulação de ar (marca MARCONI) a 105°C durante 24 horas. Em seguida, foram resfriadas, pesadas e moídas em mini-processador da marca ARNO, para determinação em triplicata do teor de nitrogênio pelo método semimicro Kjeldhal (AOAC, 1997), utilizado para o cálculo da digestibilidade verdadeira.

3.4.3 Determinação de digestibilidade verdadeira, PER (quociente de eficiência proteica), NPR (razão proteica líquida), escore químico e digestibilidade verdadeira corrigida pelo escore químico (PDCAAS).

O cálculo da digestibilidade verdadeira foi realizado de acordo com a seguinte fórmula (MILLER; BENDER, 1955):

$$D = \frac{I - (F - FK) \times 100}{I}$$

I = nitrogênio ingerido (mg) pelo grupo com dieta-teste;

F = nitrogênio fecal (mg) do grupo com dieta-teste; e

FK = nitrogênio fecal (mg) do grupo com dieta livre de nitrogênio.

D = digestibilidade;

Os animais foram pesados ao longo do experimento para determinação do PER (Quociente de Eficiência Proteica) e NPR (Razão Proteica Líquida).

O PER foi determinado considerando-se o ganho de peso do grupo-teste em relação ao consumo de proteína do grupo-teste. Para isto, utilizou-se a seguinte fórmula (HEGSTED, 1977):

$$PER = \frac{\text{ganho de peso (g) do grupo-teste}}{\text{proteína consumida (g) pelo grupo-teste}}$$

O NPR foi determinado no 14º dia do experimento, considerando o ganho de peso do grupo-teste mais a perda de peso do grupo livre de nitrogênio, em relação ao consumo de proteína do grupo-teste, segundo o método de BENDER e DOELL (1957). Para isto, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{NPR} = \frac{\text{ganho de peso (g) do grupo-teste} + \text{perda de peso (g) do grupo LN}}{\text{proteína consumida (g) pelo grupo-teste}}$$

A digestibilidade verdadeira corrigida pelo escore químico (PDCAAS) foi calculada empregando-se a seguinte fórmula (HENLEY, E. C.; KUSTER, J. M., 1994):

$$\text{PDCAAS} = \text{escore químico do aminoácido limitante} \times \text{digestibilidade verdadeira}$$

3.4.4 Avaliação da toxicidade subcrônica

Após o período de 28 dias, os animais foram pesados e submetidos à eutanásia e realizada coletas de amostras de sangue em jejum médio de 12 horas. Foram avaliados os teores de hemoglobina, hematócrito, hemácias, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração da hemoglobina corpuscular média (VHCM) em analisador hematológico automático Humancount Plus (Human).

As enzimas hepáticas transaminase glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP), gama-glutaril transferase (gGT) e fosfatase alcalina foram dosadas no plasma em um analisador bioquímico automático HumanStar 300 (Human).

Os fígados foram retirados e pesados em balança semianalítica da marca Marte, modelo AS 2000 C com precisão de 0,01g, para obtenção do peso relativo e, a seguir, acondicionados em frascos contendo formol 10% (solução tamponada em pH 7,5), até o momento da preparação histológica.

A preparação histológica se deu pela metodologia padrão de inclusão em parafina, a partir de fragmentos de 10 mm de espessura. A microtomia foi efetuada com espessura de 6 µm. Foram obtidas fotomicrografias das lâminas utilizando-se um Microscópio de luz Nikon, com Câmera Digi Pro associada e software analisador de imagens Micrometrics SE Premium. Importante salientar

que foram efetuadas 10 fotomicrografias em aumento de 400x para cada lâmina, ou seja, para cada animal, perfazendo um total de 400 fotomicrografias.

As observações foram feitas traçando-se sobre cada fotomicrografia um retículo micrométrico com 200 μm de lado, totalizando 441 pontos contados por fotomicrografia. Foram feitas as contagens dos núcleos e citoplasmas dos hepatócitos, dos capilares sinusóides, macrófagos, vasos sanguíneos e glóbulos de gordura que porventura estivessem na interseção de cada quadro.

3.5 Delineamento experimental e análise estatística

As dietas experimentais foram dispostas em delineamento inteiramente casualizado. Na análise dos resultados para comparação entre as médias, utilizou-se Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste de Dunnett para comparação com a dieta padrão de caseína, e teste SNK (Student-Newman-Keuls) para comparação pareada entre as dietas experimentais. Considerou-se o nível de significância de 5%.

As análises estatísticas foram realizadas no programa *Statistical Analysis Systems* (SAS), versão 9.2, licenciado para a Universidade Federal de Viçosa, 2013.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises físico-químicas da matéria prima e farelos

4.1.1 Composição dos grãos do pinhão-manso

Nas amostras avaliadas neste ensaio foi obtida a proporção média de 57,5% de cotilédones em relação à semente inteira, corroborando com o estudo de Makkar et. al (1997). As Tabelas 10 e 11 mostram os resultados da composição de amostras analisadas no Laboratório do Departamento de Zootecnia, da UFV.

Tabela 10: Teores de matéria seca, cinzas, nitrogênio total, proteína bruta, lipídios e fibras, em porcentagem sobre a matéria seca (% m/m)

Componentes em g/100g	Semente (casca + cotilédone)	Cotilédones	Casca	Cotilédone desengordurado com hexano	Cotilédone desengordurado com etanol
Matéria seca (60 °C)	96,73	97,97	92,29	93,55	94,89
Matéria seca total	93,78	89,64	67,18	73,00	88,77
Cinzas	4,97	4,40	6,41	10,59	8,06
Proteína bruta	14,30	19,67	5,64	58,21	47,31
N total	2,29	3,15	0,90	9,31	7,57
N proteico	2,11	3,11	0,80	8,39	6,71
Lipídios	39,08	52,32	1,82	3,74	20,07
Fibra (FDA)	32,08	14,64	74,67	8,31	23,03
Fibra (normal)	27,61	17,95	61,55	14,80	17,72

Tabela 11: Teores de minerais dos grãos do pinhão-manso (%m/m e ppm)

	(% m/m)					Ppm				
	P	Ca	Mg	Na	K	Fe	Mn	Zn	Cu	Co
Semente (casca + cotilédone)	0,26	0,35	0,41	0,017	1,25	80,04	55,73	21,23	11,14	0
Casca de pinhão-manso	92,29	0,20	0,25	0,029	1,49	158,29	93,53	7,37	9,19	0,08
Cotilédones inteiros	0,32	0,23	0,47	0,010	0,86	54,41	20,48	26,90	12,30	0
Cotilédone Desengordurado com hexano	1,09	0,14	0,96	0,016	1,92	57,42	59,96	105,00	26,84	0,54
Cotilédone Desengordurado com etanol	0,98	0,11	0,80	0,014	1,42	46,68	47,61	36,34	20,46	0,43

Em estudos de Souza et al., (2009) com pinhão-manso do município de Dourados (MS), as sementes tiveram o teor de lipídios $40,33 \pm 1,91$, proteína bruta $20,95 \pm 0,58$, cinzas $4,95 \pm 0,005$ e matéria seca de $93,76 \pm 0,06$.

Peralta-Flores et al. (2012) detectaram os teores de proteína nos cotilédones de pinhão-manso originários do México e desengordurados com hexano (farelo) encontrando valores de $45,3 \% \pm 1,0$ em base seca e cotilédones de pinhão-manso de $24,3 \pm 0,5$ em base seca. O teor de lipídios obtido foi de $52,9 \pm 1,0$ e $2,9 \pm 0,5$, cinzas de $4,7 \pm 0,5$ e $8,6 \pm 0,4$ e fibra bruta de $4,8 \pm 0,5$ e $8,1 \pm 0,7$, respectivamente.

Estudos de Penha et al. (2013) no Maranhão, encontraram na composição das sementes umidade de 9,31%, o teor em proteínas de 14,46%, lipídios de 31,62% e cinzas de 3,70%. Nos cotilédones os resultados foram 23,10% em proteínas, 66% em lipídios e 3,61% em cinzas. Estes resultados são bem

próximos aos obtidos na presente pesquisa. Esses autores também analisaram os farelos de cotilédones e detectaram o teor de umidade de 0,69%, proteínas de 54,05%, lipídios de 11,94% e cinzas de 7,40%.

A Tabela 12 mostra os resultados encontrados da composição centesimal dos cotilédones e das tortas desengordurados com etanol e hexano neste trabalho.

Tabela12: Valores médios e desvios padrão da composição centesimal dos farelos desengordurados com etanol e hexano

	CDE	CDH	TDE
Umidade	9,13 ($\pm 0,47$)	6,98 ($\pm 0,21$)	6,78 ($\pm 0,12$)
Lipídios	15,42 ($\pm 0,01$)	2,51 ($\pm 0,01$)	3,07 ($\pm 0,03$)
Proteínas	48,99 ($\pm 0,61$)	52,90 ($\pm 0,25$)	28,51 ($\pm 0,81$)
Cinzas	10,50 ($\pm 0,05$)	12,82 ($\pm 0,31$)	6,49 ($\pm 0,25$)
Carboidratos	15,96 ($\pm 1,64$)	24,79 ($\pm 0,24$)	55,15 ($\pm 0,68$)

CDE: Cotilédones de pinhão-manso desengordurados com etanol

CDH: Cotilédones de pinhão-manso desengordurados com hexano

TDE: Torta de pinhão-manso desengordurada com etanol em planta piloto.

Os cotilédones desengordurados com etanol apresentaram teor de lipídios maior que os cotilédones desengordurados com hexano devido à menor solubilidade do óleo em etanol e ao uso de tempo insuficiente para a extração. O teor de gordura inicial dos cotilédones é muito alto, da ordem de 52%. Já no farelo da semente de pinhão-manso desengordurada por prensagem e com etanol em planta piloto, o teor de lipídios apresentado foi menor devido ao fato do ponto de partida ser a torta prensada (Fusermann) e que já encontrava-se com teor de lipídio em torno de 8% antes de ser desengordurada com etanol na planta piloto.

É importante salientar que o conteúdo proteico da torta desengordurada com etanol, é quase a metade do valor dos cotilédones desengordurados com etanol, porque a torta foi preparada com sementes inteiras.

Estudos de Rakshit et al. (2008) usando sementes descascadas e desengorduradas com hexano mostraram valores de proteína bruta de $60,3\% \pm 0,2$, lipídios $0,6\% \pm 0,1$ e cinzas $9\% \pm 0,2$, diferindo dos valores determinados no presente estudo.

Também Makkar; Becker (2009) analisando farelos de cotilédones de pinhão-manso- manso (variedade tóxica) obtiveram conteúdo de proteína bruta entre 60,3 e 62,4%, lipídios com 1,5% e cinzas com 9,6%.

4.1.2 Composição em aminoácidos

A tabela 13 mostra a composição em aminoácidos (g.16g N^{-1}) de amostras de cotilédones inteiros, desengordurados com etanol ou hexano, no presente trabalho, em comparação com a composição em aminoácidos encontrada por Makkar; Becker (2009), com a ração ideal para ratos (RITSKES-HOITINGA; CHWALIBOG, 2003) e para crianças de 2 a 5 anos (FAO/WHO, 1991). Qualquer que seja o parâmetro de comparação, fica evidente a deficiência da composição em aminoácidos das amostras de pinhão-manso, principalmente lisina e aminoácidos sulfurados.

Isto se torna mais realçado quando se calcula o escore químico (tabela 14). Neste caso, os grupos fenilalanina e tirosina aparecem como os primeiros aminoácidos limitantes, seguidos da lisina e dos sulfurados, ou seja, a proteína de pinhão-manso, nas amostras usadas neste trabalho é extremamente deficiente em aminoácidos essenciais.

Tabela 13: Comparação da composição em aminoácidos (g.16g N⁻¹) de amostras de cotilédones inteiros, desengordurados com etanol ou hexano, da ração ideal para ratos e para crianças de 2 a 5 anos.

Aminoácido essencial	Cotilédone ⁴ integral	CDH ⁴	CDE ⁴	CDH ³	Ração para ratos ⁵	Criança 2-5 anos ⁶
Metionina	1,33	1,42	0,90	1,91	5,0-10,0 ¹	2,50 ¹
Cistina	0,54	1,15	0,53	2,24	-	-
Valina	2,83	3,02	1,88	5,19	5,0-6,0	3,50
Isoleucina	2,17	2,34	1,45	4,53	5,0-6,0	2,80
Leucina	4,96	5,69	3,39	6,94	7,5-8,0	6,60
Fenilalanina	2,96	3,44	2,02	4,34	6,0-10,0 ²	6,30 ²
Tirosina	2,17	2,44	1,43	2,99	-	-
Histidina	2,04	1,97	1,39	3,30	2,5-3,0	1,90
Lisina	3,25	3,67	2,25	4,28	6,0-9,0	5,80
Treonina	2,79	3,14	1,94	3,96	4,0-4,5	3,40
Triptofano	0,96	0,83	0,49	1,31	1,2-1,5	1,10

(1) Metionina + cistina

(2) Fenilalanina + tirosina

(3) MAKKAR; BECKER, (2009).

(4) Resultados obtidos pelo ITAL/Campinas – SP, conforme metodologia descrita por SPIRES (1967); WHITE, HART & FRY (1986); HAGENS, FROST & AUGUSTIN (1989).

(5) RITSKES-HOITINGA, M.; CHWALIBOG, A., (2003).

(6) FAO/WHO (1991).

Tabela 14: Escore químico do pinhão-manso (mg de aa .g de proteína⁻¹)

Aminoácido essencial	Cotilédone ⁴ integral	CDH ⁴	CDE ⁴	CDH ³	Criança 2 a 5 anos ⁵
Metionina	0,53 ¹	0,57 ¹	0,36 ¹	0,76 ¹	2,50 ¹
Cistina	-	-	-	-	-
Valina	0,81	0,86	0,54	1,48	3,50
Isoleucina	0,77	0,84	0,52	1,62	2,80
Leucina	0,75	0,86	0,51	1,05	6,60
Fenilalanina	0,47 ²	0,55 ²	0,32 ²	0,69 ²	6,30 ²
Tirosina	-	-	-	-	-
Histidina	1,07	1,03	0,73	1,74	1,90
Lisina	0,56	0,63	0,39	0,74	5,80
Treonina	0,82	0,92	0,57	1,16	3,40
Triptofano	0,87	0,76	0,45	1,19	1,10

(1) Metionina + cistina.

(2) Fenilalanina + tirosina.

(3) MAKKAR; BECKER, 2009.

(4) Resultados obtidos pelo ITAL/Campinas – SP, conforme metodologia descrita por SPIES (1967); WHITE, HART & FRY (1986); HAGENS, FROST & AUGUSTIN (1989).

(5) FAO/WHO, 1991.

4.1.3 Determinação de éster de forbol

A Tabela 15 mostra as concentrações de éster de forbol obtidas por HPLC de diferentes amostras de pinhão-manso. Verificou-se que a torta e os cotilédones desengordurados com hexano possuem concentrações de éster de forbol maiores que as concentrações da torta desengordurada com etanol, o que demonstra a grande solubilidade do éster de forbol em etanol. Isto ocorre mesmo com o cotilédone desengordurado com etanol que ainda tinha a concentração de óleo residual da ordem de 15%. Isto indica que a extração do éster de forbol é mais rápida que a extração do óleo.

Tabela 15: Concentrações de éster de forbol de diferentes amostras de pinhão-mansó obtidas por HPLC.

Amostras	mg éster de forbol. g ⁻¹ amostra
Pinhão-mansó integral	1,24
Cotilédone	1,53
Torta Fusermann	1,06
Torta Fusermann desengordurada com etanol	0,10
Cotilédone desengordurado com etanol	0,18
Torta Fusermann desengordurada com hexano	1,27
Cotilédone desengordurado com hexano	1,69

O núcleo forbol deste éster, contém grupos hidroxilas polares, apresentando então, maior afinidade por solventes com maior índice de polaridade (RIBEIRO et al. 2010).

Cruz (2012) ao extrair óleo de torta de pinhão-mansó verificou que a concentração de éster de forbol na micela de óleo/etanol foi de 0,22 mg.g⁻¹ e na micela de óleo/ hexano foi de 0,06 mg.g⁻¹, mostrando a maior solubilidade do éster de forbol em etanol. Também verificou que a extração do éster de forbol foi mais rápida que a extração do óleo. Portanto, o maior teor de éster de forbol no óleo é coerente com o menor valor no farelo desengordurado com etanol em relação ao desengordurado com hexano.

O resultado obtido para torta Fusermann desengordurada com etanol, de 0,10 mg.g⁻¹, e para o cotilédone desengordurado com etanol, de 0,18 mg.g⁻¹, demonstram a eficiência do processo de retirada do éster de forbol, e fornecem subsídio para o uso desses produtos no segundo ensaio biológico desta pesquisa.

4.2 Ensaio biológicos

4.2.1 Primeiro ensaio biológico (com cotilédones de pinhão-manso desengordurados com hexano com e sem tratamento térmico)

Neste ensaio foram usados quatro grupos de animais tratados com dieta padrão com caseína, dieta aprroteica e dietas preparadas com cotilédones de pinhão-manso desengordurados com hexano com e sem tratamento térmico. As dietas preparadas com pinhão-manso foram tóxicas para os animais que de modo geral, apresentaram perda de peso e não aumento de peso, como esperado (Tabela 16).

Tabela 16: Variação de peso dos animais (média \pm desvio padrão) em relação ao peso inicial (em %)

Dieta	ganho de peso (%)
Padrão Caseína	17,7 ^a \pm 2,3
CDH	-32,9 ^b \pm 5,1
CDHA	-33,5 ^b \pm 1,1

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Dunnett ou SNK.

CDH - cotilédones de pinhão-manso desengordurados com hexano

CDHA - cotilédones de pinhão-manso desengorduradas com hexano e autoclavada

No grupo alimentado com a dieta preparada com cotilédones de pinhão-manso desengordurados com hexano (CDH) houve morte de um animal a cada dia, do sétimo ao nono dia. No grupo alimentado com a dieta preparada com cotilédones de pinhão-manso desengordurados com hexano e autoclavada (CDHA), três animais morreram no sétimo dia de experimento. Isto vem demonstrar que o método de detoxicação dos cotilédones de pinhão-manso

não foi eficiente para a redução, ou mesmo, para a completa eliminação dos fatores antinutricionais presentes nestes.

Diante destes resultados, não foi possível calcular os índices de digestibilidade, quociente de eficiência proteica (PER) e razão proteica líquida (NPR), uma vez que os ratos morreram de forma progressiva durante o ensaio, além do fato de não existir ganho de peso, e sim perda.

No nono dia do experimento, a partir da observação que 50% dos ratos de ambos os grupos experimentais morreram, atingindo a DL_{50} , que é a dose mínima necessária para que metade dos animais fosse a óbito, optou-se por interromper o experimento.

Este fato vem demonstrar que o método de obtenção da torta detoxificada não foi eficiente não só na eliminação dos fatores antinutricionais, mas também na eliminação das toxinas presentes nesta, principalmente os ésteres de forbol, possível causa de morte dos ratos. A hipótese da presença destas toxinas nas tortas ainda é reforçada pela não ocorrência de morte entre os ratos nos grupos tratados com dietas aprroteica e padrão de caseína.

4.2.2 Segundo ensaio biológico (tortas e cotilédones desengordurados com etanol, com e sem tratamento térmico)

Neste ensaio foram usados seis grupos de animais tratados com dieta padrão com caseína, dieta aprroteica e dietas preparadas com cotilédones de pinhão-manso desengordurados com etanol, com (CDEA) e sem tratamento térmico (CDE) e com torta de pinhão-manso desengordurada com etanol, com (TDEA) e sem tratamento térmico (TDE). Os resultados do ganho de peso e ingestão de dieta dos animais por grupo estão apresentados na Figura 3.

Ao final de 14 dias os animais do grupo CDEA, TDE e TDEA obtiveram ganho de peso em relação ao peso inicial. Entretanto, este aumento ficou abaixo do grupo de animais alimentados com dieta padrão de caseína. No grupo CDE verificou-se perda média de peso de 9 gramas em relação ao peso inicial.

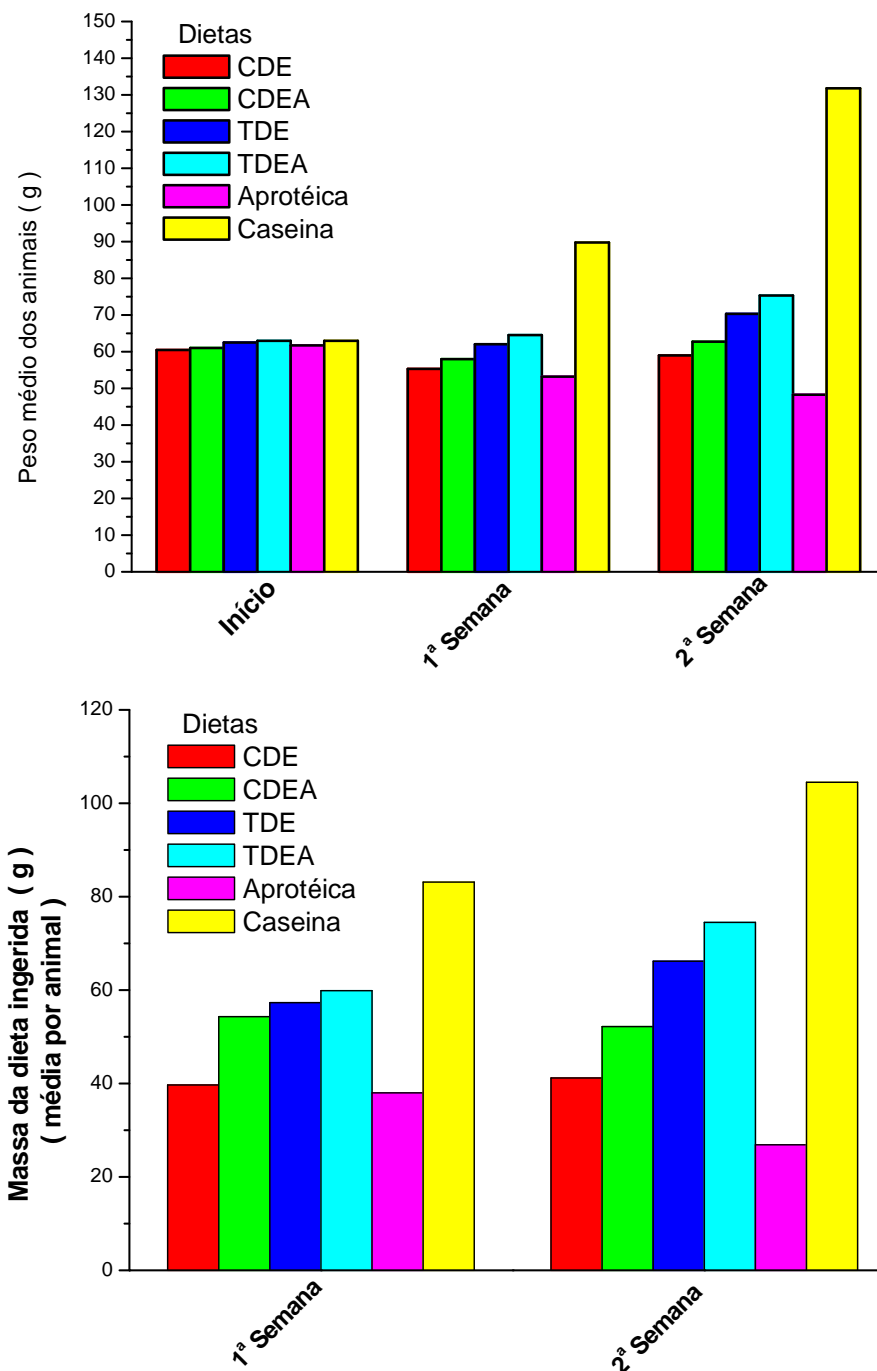


Figura 3: Peso médio dos animais e dieta ingerida durante os 14 dias (primeira e segunda semana) de experimento.

CDE . dieta tendo como fonte proteica os cotilédones de pinhão-manso desengordurados com etanol sem tratamento térmico;

CDEA _ dieta tendo como fonte proteica os cotilédones de pinhão-manso desengordurados com etanol umedecidos a 30% e autoclavados a 120 °C, durante 40 minutos;

TDE . dieta tendo como fonte proteica torta desengordurada com etanol sem tratamento térmico;

TDEA _ dieta tendo como fonte proteica torta desengordurada com etanol umedecida a 30% e autoclavada a 120 °C, durante 40 minutos.

De modo geral, a ingestão das dietas preparadas com pinhão-manso, foi menor que a ingestão da dieta preparada com caseína. A baixa ingestão pode estar relacionada com a aceitação devido ao gosto, cheiro ou textura da dieta, fato relatado por Aregheore; Becker; Makkar, 2003. Além disto, observou-se que os animais evitaram a dieta aprotéica.

A figura 4 mostra a relação entre o ganho de peso dos animais e a massa de dieta ingerida, ou seja, coeficiente de eficiência alimentar. Verifica-se que as dietas que contém o pinhão-manso como fonte proteica possuem baixa qualidade nutricional, com quociente negativo. Isto se tornou evidente quando se calculou a digestibilidade e o PDCAAS.

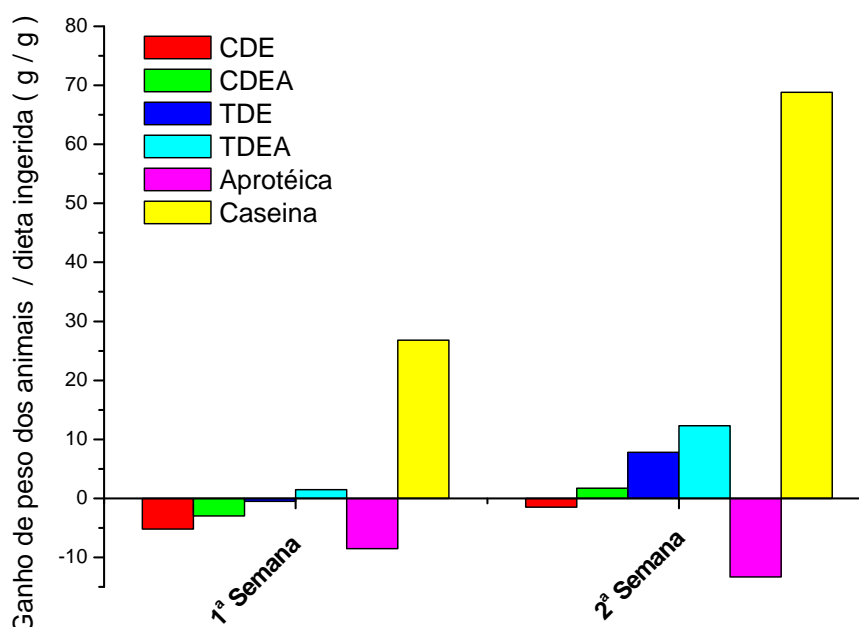


Figura 4: Relação entre as médias de dietas ingeridas e ganho de peso dos animais na primeira e segunda semanas (14 dias) de experimento (Quociente de Eficiência Alimentar).

CDE . dieta tendo como fonte proteica os cotilédones de pinhão- manso desengordurados com etanol sem tratamento térmico;

CDEA _ dieta tendo como fonte proteica os cotilédones de pinhão-manso desengordurados com etanol umedecidos a 30% e autoclavados a 120 °C, durante 40 minutos;

TDE . dieta tendo como fonte proteica torta desengordurada com etanol sem tratamento térmico;

TDEA _ dieta tendo como fonte proteica torta desengordurada com etanol umedecida a 30% e autoclavada a 120 °C, durante 40 minutos.

Para o teste de digestibilidade foram analisadas as fezes dos animais de cada grupo das dietas experimentais. As dietas TDEA, CDEA e TDE não mostraram diferença significativa com a dieta padrão. A dieta preparada com

CDE foi estatisticamente diferente da dieta padrão de caseína e das demais dietas (tabela 17). A digestibilidade verdadeira de todas as dietas é bem elevada, próxima da caseína, embora a dieta CDE seja inferior às demais.

Tabela 17: Valores de digestibilidade verdadeira (média \pm desvio padrão) das dietas experimentais

Dieta	Digestibilidade verdadeira (%)
Caseína	99,59 ^a \pm 0,06
TDEA	99,14 ^a \pm 0,15
CDEA	99,04 ^a \pm 0,23
TDE	99,02 ^a \pm 0,25
CDE	97,27 ^b \pm 0,79

Médias seguidas da mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de ou SNK.

CDE _ dieta tendo como fonte proteica os cotilédones de pinhão-manso desengordurados com etanol sem tratamento térmico;

CDEA _ dieta tendo como fonte proteica os cotilédones de pinhão-manso desengordurados com etanol umedecidos a 30% e autoclavados a 120 °C, durante 40 minutos;

TDE _ dieta tendo como fonte proteica torta desengordurada com etanol sem tratamento térmico;

TDEA _ dieta tendo como fonte proteica torta desengordurada com etanol umedecida a 30% e autoclavada a 120 °C, durante 40 minutos.

A tabela 18 mostra os resultados para o PER e RPER% das dietas experimentais.

Tabela 18: Valores médios e desvios padrão do quociente de eficiência proteica (PER) e quociente de eficiência proteica relativo (RPER%) das dietas experimentais

Dieta	PER	RPER%
Caseína	3,86 ^a ± 0,24	100
TDEA	0,94 ^b ± 0,18	24,22
TDE	0,63 ^b ± 0,37	16,19
CDEA	0,16 ^c ± 0,54	4,20
CDE	-0,19 ^d ± 0,42	-4,92

Médias seguidas da mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si teste de Dunnett ou SNK.

CDE _ dieta tendo como fonte proteica os cotilédones de pinhão-manso desengordurados com etanol sem tratamento térmico;

CDEA _ dieta tendo como fonte proteica os cotilédones de pinhão-manso desengordurados com etanol umedecidos a 30% e autoclavados a 120 °C, durante 40 minutos;

TDE _ dieta tendo como fonte proteica torta desengordurada com etanol sem tratamento térmico;

TDEA _ dieta tendo como fonte proteica torta desengordurada com etanol umedecida a 30% e autoclavada a 120 °C, durante 40 minutos.

Os resultados de PER para todas as dietas experimentais foram menores que 1, sendo que a dieta CDE apresentou valor negativo (-0,19). Os valores de PER de todas as dietas foram significativamente menores ($p < 0,05$) que os da dieta padrão de caseína que mostrou PER 3,86. As dietas TDEA e TDE são estatisticamente iguais ($p < 0,05$). Todas as dietas preparadas com pinhão-manso são significativamente inferiores a dieta padrão de caseína.

Kumar; Makkar; Becker (2011) substituíram parte da proteína em dietas para carpas, por farelo de pinhão-manso detoxicado e com adição de lisina sintética. A inclusão de 50% mostrou resultados estatisticamente iguais de PER e digestibilidade proteica em relação ao controle, enquanto a inclusão de 75% mostrou resultados de PER e de digestibilidade proteica estatisticamente

inferiores ao controle, indicando que o acréscimo de lisina melhora a qualidade da ração, mas não o suficiente para substituir completamente a caseína.

Aregheore; Becker; Makkar (2003) elaboraram dietas para ratos com cotilédones de pinhão-manso desengordurados com hexano, conseguindo PER de 1,7, porém usaram metanol e autoclave a 121°C por 35 minutos para detoxicar o farelo.

A tabela 19 mostra os resultados para o NPR e NPRR% das dietas experimentais.

Tabela 19: Valores médios e desvios padrão da razão proteica líquida (NPR) e razão proteica líquida relativa (NPRR%) das dietas experimentais

Dieta	NPR	RNPR%
Caseína	4,66 ^a ± 0,34	100
TDEA	1,84 ^b ± 0,25	39,42
TDE	1,57 ^b ± 0,31	33,63
CDE	1,52 ^b ± 0,35	32,47
CDEA	1,51 ^b ± 0,67	32,30

Médias seguidas da mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Dunnett ou SNK.

CDE _ dieta tendo como fonte proteica os cotilédones de pinhão-manso desengordurados com etanol sem tratamento térmico;

CDEA _ dieta tendo como fonte proteica os cotilédones de pinhão-manso desengordurados com etanol umedecidos a 30% e autoclavados a 120 °C, durante 40 minutos;

TDE _ dieta tendo como fonte proteica torta desengordurada com etanol sem tratamento térmico;

TDEA _ dieta tendo como fonte proteica torta desengordurada com etanol umedecida a 30% e autoclavada a 120 °C, durante 40 minutos.

Os resultados de NPR de todas as dietas foram estatisticamente menores ($p < 0,05$) que o resultado do NPR da dieta padrão de caseína que obteve NPR 4,66, e estatisticamente iguais ($p < 0,05$) entre si. As dietas experimentais embora tenham apresentado valores de digestibilidade verdadeira acima de 97%, possuem o PER e NPR baixos. Isto foi refletido no ganho de peso dos animais, demonstrando que o pinhão-manso não possui eficiência proteica para crescimento e manutenção do animal.

Segundo Pereira; Costa (2002) a melhoria da capacidade de digestão não implica, necessariamente, no aumento da qualidade proteica, pois os aminoácidos podem estar sendo bem absorvidos e não estar participando da síntese proteica em virtude da deficiência de alguns aminoácidos essenciais.

A Tabela 20 mostra o escore químico e o PDCAAS da dieta preparada com cotilédone de pinhão-manso desengordurado com etanol.

Tabela 20: Escore químico e PDCAAS da dieta preparada com cotilédones desengordurados com etanol (CDE).

Aminoácido essencial	Escore Químico	PDCAAS (%)
Metionina + Cistina	0,36	35,0
Valina	0,54	52,5
Isoleucina	0,52	50,6
Leucina	0,51	49,6
Fenilalanina + Tirosina	0,32	31,1
Histidina	0,73	71,0
Lisina	0,39	37,9
Treonina	0,57	55,4
Triptofano	0,45	43,8

Verifica-se que o valor nutricional da dieta é muito baixo, com valores de escore da ordem de 32%, para os aminoácidos (fenilalanina + tirosina), 36% para os aminoácidos (metionina + cistina) e 39% para a lisina, indicando que há pelo menos cinco aminoácidos extremamente limitantes na proteína desta amostra. Se forem considerados os valores dos escores químicos dos cotilédones mostrados na tabela 14, pode-se dizer que de modo geral, a proteína de pinhão-manso é extremamente deficiente em alguns aminoácidos essenciais. Ou seja, mesmo que a digestibilidade seja boa, o valor nutricional das dietas preparadas com pinhão-manso é muito baixo, da ordem de 30 a 40% da proteína de referência, o que explica os valores baixos de PER e NPR encontrados neste estudo.

O baixo PER e NPR das dietas com cotilédones desengordurados com etanol também pode ser devido à presença de 0,18 mg de éster de forbol por grama de cotilédones desengordurados. Aregheore; Becker; Makkar (2003) detectaram que a presença de 0,13 mg de éster de forbol em farelos de pinhão-manso, inclusos em 16% da dieta, determinaram efeitos negativos significativos na ingestão e no crescimento dos ratos.

Por outro lado, na dieta em que houve tratamento térmico mais drástico, TDEA, cozimento durante a extração do óleo por prensagem e autoclave depois do desengorduramento com etanol, obteve-se desempenho menos ruim, indicando que a extração do éster de forbol e a inativação dos fatores antinutricionais pelo calor úmido pode melhorar a qualidade da ração.

Rahma et al. (2013) usaram farelos de cotilédones de pinhão-manso detoxicado tratados com etanol a 90%, bicarbonato de sódio 0,07% e autoclave a 121 °C por 20 minutos em dieta para ratos. A dieta foi preparada de modo a fornecer 12% de proteína e foram encontrados valores de PER e NPR de 1,73 e 1,30. Este experimento se aproxima da presente pesquisa pelo uso do mesmo solvente e também de tratamento térmico em autoclave.

4.2.3 Toxicidade subcrônica (segundo ensaio)

4.2.3.1 Peso relativo do fígado

A Tabela 21 mostra as médias do peso relativo do fígado em relação às dietas ingeridas.

Tabela 21: Peso médio relativo do fígado dos ratos em relação às dietas ingeridas

Dieta	Peso médio dos animais (g)	Peso médio dos fígados (g)	Peso médio relativo (%)
CDE	52,50	2,24	4,27 ^a
CDEA	61,00	2,61	4,28 ^a
TDE	72,25	2,59	3,58 ^{b c}
TDEA	81,63	2,83	3,47 ^b
Padrão	183,00	7,64	4,17 ^{a c}

Caseína

Médias seguidas da mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de ou SNK.

CDE . dieta tendo como fonte proteica os cotilédones de pinhão-manso desengordurados com etanol sem tratamento térmico;

CDEA _ dieta tendo como fonte proteica os cotilédones de pinhão-manso desengordurados com etanol umedecidos a 30% e autoclavados a 120 °C, durante 40 minutos;

TDE . dieta tendo como fonte proteica torta desengordurada com etanol sem tratamento térmico;

TDEA _ dieta tendo como fonte proteica torta desengordurada com etanol umedecida a 30% e autoclavada a 120 °C, durante 40 minutos.

O peso médio dos fígados dos animais tratados com a dieta TDEA foi menor ($p < 0,05$) que o peso médio dos fígados dos animais tratados com a dieta padrão de caseína

As dietas CDE e CDEA não diferiram entre si ($p < 0,05$), assim como as dietas TDE e TDEA. É importante ressaltar que estes pares de dietas são provenientes da mesma matéria-prima, cotilédones de pinhão-manso e torta Fusermann, respectivamente.

Em estudo de Rakshit e colaboradores (2008) analisando a inclusão de farelos de pinhão-manso detoxicado em dieta para ratos, os autores não verificaram efeito significativo em relação ao padrão caseína no que se refere ao peso relativo do fígado.

4.2.3.2 Análises bioquímicas – enzimas hepáticas

A análise bioquímica de enzimas hepáticas a partir do plasma dos ratos sob jejum médio de 12 horas é apresentada na Tabela 22.

Tabela 22: Valores médios e desvios padrão de enzimas hepáticas dosadas do plasma de ratos em jejum médio de 12 horas

DIETA	TGO (U/L)	TGP (U/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)	gGT (U/L)
CDE	87,25 ± 35,14 ^{ab}	26,75 ± 3,59 ^{ab}	347,33 ± 83,07 ^a	6,00 ± 4,08 ^a
CDEA	117,67 ± 12,50 ^{ab}	27,00 ± 8,72 ^{ab}	327,00 ± 91,93 ^a	4,00 ± 3,00 ^a
TDE	161,00 ± 56,42 ^b	42,43 ± 17,35 ^b	506,57 ± 159,05 ^a	4,71 ± 1,25 ^a
TDEA	140,85 ± 78,43 ^{ab}	34,00 ± 9,26 ^{ab}	502,00 ± 79,50 ^a	4,86 ± 4,02 ^a
Padrão Caseína	72,33 ± 6,34 ^a	22,78 ± 4,21 ^a	419,00 ± 136,4 ^a	3,67 ± 2,5 ^a

(TGO) transaminase glutâmica oxalacética (TGP) transaminase glutâmica pirúvica (gGT) gamaglutamil transferase.

Valores seguidos da mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Dunnett ou SNK.

Pode-se observar que os resultados para as enzimas hepáticas TGO e TGP, apresentaram diferenças estatísticas para a dieta TDE em comparação com a dieta padrão, sugerindo alguma lesão hepática nos animais que ingeriram esta dieta.

No caso específico dos animais alimentados com a dieta TDE, o aumento das enzimas TGO e TGP pode ser relacionado com o nível de gordura encontrado nos hepatócitos, já que o fígado desses animais foi o que apresentou maior conteúdo de glóbulos de gordura (tabela 24), indicando uma provável toxicidade deste tratamento. Entretanto, quando comparados os valores das enzimas hepáticas entre as dietas não foi encontrado diferença significativa ($p \leq 0,05$).

As enzimas fosfatase alcalina e gamaglutamiltransferase (gGT) dosadas nos animais com as diferentes dietas não apresentaram diferença estatística

para a dieta padrão de caseína. Uma das etiologias para o aumento da gGT é o fígado gorduroso não-alcoólico (PARISE, 2002). Embora haja a presença de glóbulos de gordura nos hepatócitos, isso não foi suficiente para ocasionar aumento dessas enzimas no fígado desses animais quando comparado com o fígado dos animais que ingeriram a dieta padrão de caseína.

Berenchtein e colaboradores (2010) testaram farelos detoxicados de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) em ratos Wistar submetidos às dietas isocalóricas e isoproteicas de caseína com a substituição da caseína por 5% e 10% de pinhão-manso, não verificando diferença entre os valores de TGO e TGP em relação à dieta padrão de caseína. Estes dados diferem do presente estudo, em que foram elaboradas dietas isocalóricas e isoproteicas com substituição total da caseína por farelo de pinhão-manso.

Já nos estudos de Rahma e colaboradores (2013) os valores de TGO e TGP foram respectivamente $76 \text{ U.L}^{-1} \pm 0,2$ e $30 \text{ U.L}^{-1} \pm 0,1$.

4.2.3.3 Índices Hematológicos

A Tabela 23 mostra os índices hematológicos analisados dos animais que ingeriram as diferentes dietas propostas para o estudo.

Tabela 23: Valores médios e desvios padrão dos valores de HEM, HMG, HMT, VCM, HCM e CHCM dos animais alimentados com as diferentes dietas experimentais

Parâmetros	CDE	CDEA	TDE	TDEA	Padrão Caseína	Referência ¹
HEM (milhões.mm ³⁻¹)	6,20 ^a ± 0,57	6,08 ^a ± 0,67	6,14 ^a ± 0,33	6,23 ^a ± 0,32	6,73 ^b ± 1,99	5,4 - 10
HMG (g.dL ⁻¹)	11,62 ^a ± 0,79	11,93 ^a ± 1,20	11,47 ^a ± 0,65	11,83 ^a ± 0,44	12,71 ^b ± 2,81	11 - 18
HMT (%)	31,02 ^a ± 3,60	31,03 ^a ± 2,89	30,52 ^a ± 1,22	32,10 ^a ± 1,62	34,92 ^b ± 1,05	35 - 49
VCM (fl)	50,17 ^a ± 2,14	51,50 ^a ± 2,16	50,00 ^a ± 2,97	51,33 ^a ± 0,82	51,74 ^b ± 1,87	
HCM (pg)	18,80 ^a ± 1,37	19,72 ^a ± 0,84	18,73 ^a ± 1,73	19,05 ^a ± 0,82	18,84 ^a ± 3,24	
CHCM (mg.dL ⁻¹)	37,40 ^a ± 2,63	38,37 ^a ± 0,43	37,52 ^a ± 1,54	36,87 ^a ± 1,21	36,45 ^b ± 1,62	

(1) CUBAS, et. al., 2006.

HEM-Hemácia; HMG-Hemoglobina; HMT-Hematócrito; VCM-Volume Corpuscular Médio; HCM-Hemoglobina Corpuscular média; CHCM- Concentração hemoglobínica corpuscular média
Os valores seguidos da mesma letra, dentro da mesma linha, não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Dunnett ou SNK.

Embora todos os índices sanguíneos analisados tenham diferido estatisticamente dos parâmetros da dieta padrão, com exceção do HCM, não há grandes variações entre os resultados, e que possam caracterizar anemia dos animais.

Berenchtein e colaboradores. (2010) ao substituir a caseína por 5% e 10% de farelo de pinhão-manso detoxicado, em dieta para ratos Wistar, também não verificaram diferença entre estes índices.

4.2.3.4 Histomorfometria do fígado

A Tabela 24 mostra os resultados das análises histomorfométricas realizadas no fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais.

A figura 5 apresenta uma mostra das imagens dos fígados analisados dos animais dos diferentes grupos experimentais, em relação à deposição de gordura. Podemos observar maior deposição de gordura no fígado dos animais do grupo TDE (Figura 5 D).

Tabela 24: Quantificação histomorfométrica dos componentes do parênquima hepático dos animais dos diferentes grupos experimentais (média)

Dieta	Componentes do parênquima hepático ¹	Vacúolos de gordura
CDE	410,73 ^a	30,28 ^a
TDEA	383,64 ^b	57,36 ^b
CDEA	364,85 ^c	76,15 ^c
TDE	349,88 ^d	91,13 ^d
Padrão Caseína	385,12 ^a	55,88 ^a

(1) núcleo, citoplasma, macrófago, capilar sinusóide e vaso sanguíneo. Valores seguidos da mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Dunnett ou SNK.

Foram quantificados os núcleos e citoplasmas de hepatócitos, macrófagos, capilares sinusóides, vasos sanguíneos e vacúolos de gordura. A alteração apresentada nos fígados foi a esteatose, com a presença de vacúolos de gordura de diferentes tamanhos no citoplasma dos hepatócitos. A esteatose hepática pode ter sua origem, neste caso, na deficiência proteica das dietas experimentais, devido à deficiência principalmente de metionina ou ainda na ligeira presença de éster de forbol. Segundo Zamin Júnior (2009) a

deficiência do aminoácido metionina leva ao acúmulo de gordura no fígado.

Os animais alimentados com a dieta CDE apresentaram resultados estatisticamente iguais à dieta padrão de caseína, o que pode ser atribuído à menor ingestão de dieta e, portanto, menor ingestão de éster de forbol.

Li et al., (2010) conduziram pesquisa com óleo de *Jatropha curcas* L., variedade tóxica originária da Índia, com base em pré testes estipularam seis dosagens (36.00, 32.40, 29.16, 26.24, 23.62 e 21.26 mg/kg de massa corporal) administradas via intragástrica em dez ratos. Observaram que na dose de 23.62 mg/kg não foram encontradas evidências microscópicas de danos no coração, intestino delgado, cérebro e pâncreas. Foram observados apenas infiltrados linfocitários no fígado. Na maior dose (36.00 mg/kg) foi encontrada entre outros sinais histopatológicos, a constante presença de vacúolos de gordura nos hepatócitos.

Wang et al. (2011) não evidenciaram mudanças histopatológicas em rins e fígados de porcos tratados com dieta onde a proteína de soja foi substituída por 50% de farelo de pinhão-manso detoxicado.

Rahma et al. (2013) também não encontraram diferenças no parênquima hepático de ratos tratados com dieta contendo como fonte proteica farelo de pinhão-manso detoxicado, estando este compondo 12% em proteínas da dieta.

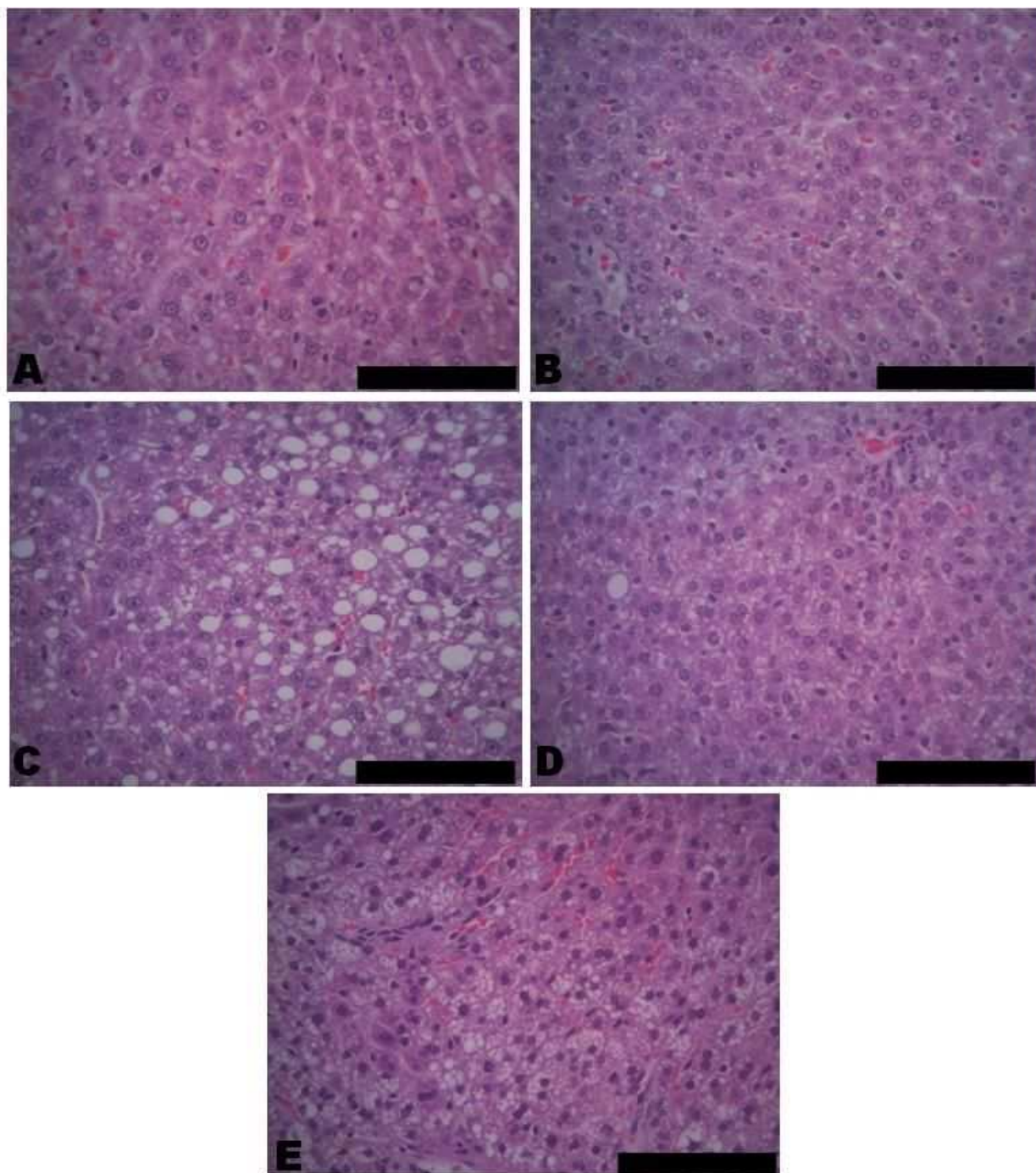


Figura 5: Análise histológica do fígado do grupo controle (A) e dos grupos tratados com dieta CDE (B), CDEA (C), TDE (D) e TDEA (E). Barra = 100 μm.

5 CONCLUSÃO

As amostras de pinhão-manso usadas neste trabalho podem ser consideradas como boas fontes de proteínas, com teores da ordem de 28 % na torta e a 52 % nos cotilédones. Porém, a sua utilização na alimentação de animais monogástricos é problemática devido à presença de substâncias tóxicas como o éster de forbol. O uso de etanol para desengordurar as tortas e os cotilédones das amostras diminuiu a concentração de substâncias tóxicas para valores aceitáveis para os animais (éster de forbol < 0,2 mg. g⁻¹ de amostra). O tratamento térmico, autoclavagem do material úmido, provavelmente inativou a maioria dos fatores antinutricionais, pois as dietas tratadas desse modo tiveram digestibilidade da ordem de 97% a 99%, semelhantes à da dieta padrão de caseína. Entretanto, digestibilidade corrigida pelo escore químico caiu para valores da ordem de 35% devido à baixa concentração de alguns aminoácidos essenciais como fenilalanina e tirosina, metionina e cistina e lisina. Desse modo os valores de PER e NPR das dietas preparadas com tortas e cotilédones de pinhão-manso foram muito baixos. O baixo valor proteico das dietas experimentais também foi evidenciado na análise histológica do fígado dos ratos, pela presença de vacúolos de gordura se comparados à dieta padrão de caseína. Todos os resultados indicaram, no mínimo, a necessidade de suplementação desses aminoácidos em rações preparadas com derivados do pinhão-manso.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J. C.; GODOI, A. R.; CARMO, C. A.; EDUARDO, J. L. P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 37, n. spe, July 2008.
- ADAM, S.E. Toxic effects of *Jatropha curcas* in mice. **Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 67-77, 1974.
- ADEBOWALE, K. O.; ADEDIRE, C. O. Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 5 n. 10, p. 901-906, May 2006.
- ADERIBIGBE, A. O., JOHNSON, C. O. L. E., MAKAR, H. P. S., BECKER, K. Chemical composition and effect of heat on organic matter and nitrogen degradability and some anti-nutritional components of *Jatropha* meal. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 67, p. 223-243, 1997.
- ALMEIDA, S. Pinhão-mansão, opção para o biodiesel. Disponível em: http://www.agrolink.com.br:8888/colunistas/pg_detalhe_coluna.asp?Cod=22892007). Acesso em: 27 fev. 2009.
- ALVES, J. M. A. et al. Pinhão-mansão uma alternativa para produção de biodiesel na agricultura familiar da Amazônia brasileira. **Agro@mbiente Online**, Boa Vista, v. 2, n. 1, jan/jun 2008.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 15. ed. Washington: AOAC, 1990.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 16 ed., 3 rev. Gaithersburg: AOAC, 1997.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 16. ed., 4 rev., Washington: 1998.
- 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 LatexAgglutination and Haemagglutination Methods and Inactivation of Lectin by Heat Treatments. **J. Sci. Food Agric.**, v. 77, 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. **S. Pac. J. Nat. Sci.**, v. 21, p. 50-56, 2003.
- ARRUDA, F. P.; NAPOLEÃO E. M. B.; ANDRADE A. P.; PEREIRA W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de Pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) como

alternativa para o semi-árido nordestino. **Rev. bras. ol. fibros.**, Campina Grande, v.8, n.1, p.789-799, 2004.

BECKER, K.; MAKKAR H.P.S. *Jatropha curcas*: a potential source for tomorrow's oil and biodiesel. **Lipid Technol.**, v. 20, p. 104–107, 2008.

BENDER, A. E; DOELL. B.H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **British Journal Nutrition.**, v. 11, p. 138-143, 1957.

BENEVIDES, C. M. J.; SOUZA, M. V.; SOUZA, R. D. B.; LOPES, M. V. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 67-79, 2011.

BERENCHTEIN, B.; ABDALLA, A. L.; MORSY, A. S.; ABDALLA FILHO, A.L.; CASTILHO, L. A.; SCHIAVINATTO, P.B. G.; SANTOS, P.P.; PEÇANHA, M.R.S.R.; GOMES, J.D.F.; SILVA, J.; SHEN, C. G.; LUCA, R.C.; ARIETA, N. F. Use of biodiesel co-product from *Jatropha curcas* as a ingredient for animal feed. **Advances in animal biosciences**, v. 1, n. 1, p. 286, 2010.

BOSE, B. C.; SEPAHA, G. C., VIGAYVARGIYA, R. and SAIFI, Q. Observations on the pharmacological actions of *Jatropha curcas*. **Arch. Inter. Pharmacodyn.**, v. 130, p. 28-34, 1961.

BRASIL. Lei 11.097, de 13 de Janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005.

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. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/pibic/anais/2009/Artigos/RE0901004.pdf>> acessado em 24 de setembro de 2012.

CUBAS, Z. S. et al. **Tratado de animais silvestres**. São Paulo: Roca, 2006.

CRUZ, M. R. **Extração de óleo da torta de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) com etanol para remoção de éster de forbol**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 2012. 57p.

EL BADWI, S. M. A., ADAM, S. E. I.; HAPKE, H. J. Comparative toxicity of *Ricinus communis* and *Jatropha curcas* in Brown Hissex chicks. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr**, v. 102, n. 2, p. 75-77, 1995.

ELDRIDGE, A. C. ; WOLF, W. J.; NASH, A. M.; SMITH, A. K. Alcohol washing of soybean protein. **J. Agric. Food Chem.**, v. 11, p. 323-328, 1963.

ERICKSON, D. R. **Practical handbook of soybean processing and utilization**. AOCS Press and United Soybean Board: USA, 1995.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Protein Quality Evaluation**: Food and Nutrition Paper, v. 51, Rome, Italy, 1991.

FREIRE, E. A.; ESTRELA, M. A.; LIMA, V. L. A.; LAIME, E. M. O. Importância do cultivo do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para uso do biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4 SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1., 2010, João Pessoa. Inclusão Social e Energia: **Anais...** Campina grande: Embrapa Algodão, p. 118-121, 2010.

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, p. 1490-1498, 2011.

GRIFFITHS, D. W.; BIRCH, A. N. E.; HILLMAN, J. R. Antinutritional compounds in the Brassicaceae: analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Invergowrie, v. 73, n. 1, p. 1-18, 1998.

GOEL, G.; MAKKAR, P. S. H.; FRANCIS, G; BECKER, K. Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals **International Journal of Toxicology**, v. 26, p. 279-288, 2007.

HAAS, W.; STERK, H.; MITTELBACH, M. Novel 12-deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolated from seed oil of *Jatropha curcas*. **Journal of natural products**, v. 65, p. 1434-1440, 2002.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of aminoacids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 6, p. 912-916, 1989.

HEGSTED, D. M. Protein quality and its determination. In: WHITAKER, J.R.; TANNENBAUM, S.R. **Food proteins**. Westport: AVI Publishing, 1977. 654 p.

HENLEY, E. C.; KUSTER, J. M. Protein quality evaluation by protein digested amino acid scoring. **Food technology**, v. 4, p. 74-77, 1994.

HELLER, J. **Physic Nut. *Jatropha curcas* L.** Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, n. 1, 1996. 66 p.

HOFFMAN, G. **The chemistry and technology of edible oils and fats and their high fat products**. Academic Press Inc. London, 1989.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005.

KING, A.J.; HE, W.; CUEVAS, J. A.; FREUDENBEGER, M.; RAMIARAMANANA, D.,

GRAHAM, I. A. Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 10, p. 2897-2905, 2009.

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**, v. 17, n. 3, p. 313-326, jun. 2011.

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

LAVIOLA, B. G.; DIAS, L. A. S. Teor e acúmulo de nutrientes em folhas e frutos de pinhão-manso. **Ver. Bras. de Ciênc. Solo**. v. 32, n. 5, Viçosa, 2008.

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**, v. 48, p. 620–625, 2010.

LIBERALINO, A., BAMBIRRA, E. A., MORAES SANTOS, E.C. *Jatropha curcas* L. seeds: chemical analysis and toxicity. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 31, n. 4, p. 539-50, 1988.

MAKKAR, H. P. S., BECKER, K., SPORER, F. WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Jour. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 3152-3157, 1997.

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**, v. 62, p. 207–215, 1998.

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**, v. 88, p.1542–1548, 2008.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and valueadded coproducts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, 2009.

MAKKAR, H.; MAES, J.; DE GREYT, W.; BECKER, K. Removal and Degradation of Phorbol Esters during Pre-treatment and Transesterification of *Jatropha curcas* Oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 86, p. 173–181, 2009.

MARQUES, D.A; FERRARI, R. A.. **Biológico**, IN: Palestra 21ª RAIB o papel das novas biotecnologias no melhoramento genético do pinhão-mansão. São Paulo, v.70, n.2, p.65-67, 2008.

MARTINEZ-HERRERA, j; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G. ;DA VILA-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**, v. 96, p. 80–8, 2006.

MELO, J. C.; BRANDER Jr, W.; CAMPOS, R. J. A.; PACHECO, J. G. A.; SCHULER, A. R. P.; STRAGEVITCH, L. **Avaliação preliminar do potencial do pinhão-mansão para a produção de biodiesel**. p.198-203. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/producao/Preliminar20.pdf>> Acesso em: 09 fev. 2011.

MILLER D. S.; BENDER A. E. The determination of the net utilization of proteins by shortened method. *Br J Nutr.*; v. 9, n. 4, p. 382-388, 1955.

MORETTO, E.; FEET, R. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos. São Paulo, 1998. 150p.

MOURGUE, M.; DELPHAUT, J.; BARET, R; KASSAB, R. Study of the toxicity and localization of toxalbumin (curcin) in the seeds of *Jatropha curcas* Linn. - **Bull Soc Chim. Biol. (Paris)**, v. 43, p.517-531, 1961.

OKAMOTO, S. Studies on the alcoholic extraction of soybean oil. **Contemporary Mandchuria**, Darian, p. 543-546, 1947.

PANDO, S. C., et al. Biochemical characterization of a lectin from *Delonix regia* Seeds. **Journal of Protein Chemistry**, v.21, n.4, p.279-285, 2002.

PARISE, E. R. Esteatose hepática. *Atheros*, v.13, n. 2, p. 52-55, 2002.

PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973. 284 p.

PENHA, M. N. C.; SILVA, M. D. P.; MENDONÇA, K. K. M.; BRANDÃO, K. S. R.; MACIEL, A. P.; SILVA, F. C. Caracterização físico-química da semente e óleo de pinhão-mansão (*Jatropha curcas*) cultivado no Maranhão. Disponível em: <<http://www.corpoica.gov.co/sitioweb/Documento/JatrophaContrataciones/CARACTERIZACIONFISICO-QUIMICA-BRASIL.pdf>>, acessado em 31 de julho de 2013.

PERALTA-FLORES, L.; GALLEGOS- TINTORÉ, S.; SOLORZA-FERIA, J.; DÁVILA ORTÍZ, G.; CHEL-GUERRERO, L.; MARTÍNEZ-AYALA, A. Biochemical evaluation of protein fractions from physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Grasa y aceites**, v. 63, n. 3, p. 25-259, jul.-sept, 2012.

PEREIRA, C. A. S., COSTA, N. M. B. Proteínas de feijão preto sem casca: digestibilidade em animais convencionais e em animais isentos de germes (germ-free). **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p.5-14, 2002.

PEREIRA, D. 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.1, p.1-11, 2010.

PINTO, Tais Leite Ferreira et al. Avaliação da viabilidade de sementes de pinhão-manso pelos testes de tetrazólio e de raios X. **Rev. bras. sementes**, Londrina, v. 31, n.2, 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-31222009000200023&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 14 de julho de 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222009000200023>.

PIRES C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B.. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.1, p. 179-187, jan.-mar. 2006.

RAHMA, E. H.; MANSOUR, E. H.; HAMODA, S. T. Biological evaluation of Jatropha curcas seed as a new source of protein. **Merit Research Journal of Food Science and Technology**, v. 1, n. 2 p. 23-30, 2013.

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**, v.46, p.3621-3625, 2008.

RAO, R. K.; ARNOLD, L.K. Alcoholic extraction of vegetable oils .III. Solubilities of babassu, cocnut, olive, palm, rapeseed, and sunflower seed oils in aqueous ethanol. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign Ill, v. 33, n. 9, p.389-391, 1956.

RAO, R. K. ARNOLD, L.K. Alcoholic extraction of vegetable oils .III. Solubilities of babassu, cocnut, olive, palm, rapeseed, and sunflower seed oils in aqueous ethanol. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign Ill, v. 33, n. 2, p. 82-84, 1956.

RAO, R. K. ; KRISHNA, M. G.; ZAHER, S. H.; ARNOLD, L.K. Alcoholic extraction of vegetable oils .I . Solubilities of cottonseed, peanut, sesame and soybean oils in aqueous ethanol. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign Ill, v. 32, n. 7, p.420-423, 1955.

REEVES, P.G., NIELSEN, F. H., FAHEY, G. C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-1951, 1993.

RIBEIRO, J.A.A.; SCHWERZ JÚNIOR, P.; SOUSA, P.M. *et al.* Desenvolvimento de processo semiautomatizado para a extração e quantificação de éster de forbol em torta de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 4., 2010, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Biodiesel: inovação tecnológica e qualidade, 2010. p.1241-1242. (Resumo).

RITSKES-HOITINGA, M.; CHWALIBOG, A. Nutrient requirements, experimental design, and feeding schedules in animal experimentation. In: **Handbook of laboratory animal science- essential principles and practices**, 2 ed. CRC Press, v.1, cap. 12, 2003.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Inf. Agropec.**, v. 26, p. 44-78, 2005.

SEVERINO, L.S. **O Que Sabemos sobre a Torta de Mamona**. Documentos, 134, Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 31p.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. Varela: São Paulo, 1996.

SIEGEL, A. Uber die Giftstoffe zweier Euphorbiaceen. Ph. D. Dissertation. Medicinal Faculty, Imperial Univ., Dorpat., 1983.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos**: Métodos químicos e biológicos, 3 ed. Viçosa: UFV, 2002, 235p.

SILVA, M. T. C.; TURATTI, J. M. Extração de óleo de soja com etanol. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 73-89, 1991.

SMITH, O.B.; OSAFO, E.L.K.; ADEGBOLA, A.A. Studies on the feeding value of agro-industrial by-products: strategies for improving the utilization of cocoa-pod-based diets by ruminants. **Animal Food Science and Technology**, v.20, p.189-201, 1988.

SOLAE, Science series. 2009 disponível em: http://www.solae.com.br/~media/Files/pt-BR/Qualidade%20da%20Proteína_PORT.pdf acesso em 28 de setembro de 2012.

SOUZA, A. D. V.; FAVARO, S. P.; ITAVO, L. C. V.; ROSCOE, R. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-manso, nabo-forrageiro e crambe. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, DF, v. 44, n. 10, p.1328-1335, 2009.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v. 39, p.1412–1416, 1967.

STIRPE, F. O; PESSION-BRIZZI, A.; LORENZONI, E. S. P.; MONTANARO, L.; SPERTI, S. Studies on the Proteins from the Seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas* toxic properties and inhibition of protein synthesis in vitro. **Biochem. J.**, v.156, p.1-6, 1976.

SWERN, D., Ed. **Bailey's industrial oil and fat products**. 4 ed. New York: Wiley-Interscience Publishers, 1979.

TEIXEIRA J. P. Feijão. **Teor e composição do óleo de sementes de *jatropha sp.*** Bragantia: Campinas. 1987.

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 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.

WAN, P. J. **Introduction to Fats and Oil Technology**. American Oil Chemist's Society. Champaign, 1991. 330 p.

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 growth, serum biochemical parameters and visceral organs. **Animal Feed Science and Technology**, n.170, p. 141– 146, 2011.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY; J. C. An evaluation of the waters pico-tag system for the amino-acid analysis of food materials. **The Journal of Automatic Chemistry**, v.8, n.4, p. 170-177, 1986.

ZAMIN JUNIOR, I.; MATTOS, A. A.; MATTOS, A. Z.; MIGON, E.; SOARES, E.; PERRY, M. L. S. Modelo experimental de esteatohepatite não-alcoólica com dieta deficiente em metionina e colina. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v. 46, n. 1, 2009.