

DAYANA ALVES RODRIGUES

**QUANTIFICAÇÃO E DEGRADAÇÃO DOS ÉSTERES DE FORBOL EM
TORTA E FARELO DE *Jatropha curcas* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

R696q
2015 Rodrigues, Dayana Alves, 1989-
Quantificação e degradação dos ésteres de forbol em torta e farelo de de *Jatropha curcas* L / Dayana Alves Rodrigues. – Viçosa, MG, 2015.
vii, 42f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Antônio Jacinto Demuner.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.34-39.

1. Compostos orgânicos. 2. Éster de forbol. 3. Degradação química. 4. Pinhão-manso. 5. Bovino - Alimentação e ração.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.
Programa de Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 547

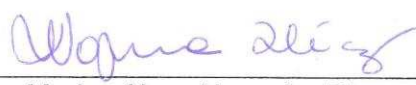
DAYANA ALVES RODRIGUES

QUANTIFICAÇÃO E DEGRADAÇÃO DOS ÉSTERES DE FORBOL EM
TORTA E FARELO DE *Jatropha curcas* L.

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica,
para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de julho de 2015.


Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
(Coorientador)


Marisa Alves Nogueira Diaz


Antônio Jacinto Demuner
(Orientador)

A Deus, à minha família, e em especial
aos meus pais, irmãos e namorado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado em todas as etapas desse trabalho, protegendo, iluminando e me dando forças em prosseguir.

Aos meus queridos pais Rosmarina e Wanderley, aos meus irmãos Luana, Hyanna e Mateus, pela educação que me foi dada, pelo amor incondicional, pelo incentivo e pela dedicação em todos os momentos.

Ao meu namorado Gustavo pelo apoio, dedicação e companheirismo imensuráveis.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), pela disponibilização da infraestrutura para realização dos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Antônio Jacinto Demuner, pelo apoio, pelo incentivo e pela dedicação na orientação.

Aos professores Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, Marcelo Henrique dos Santos, Antônio Alberto da Silva e a Rita de Cássia Superbi de Sousa pela compreensão e apoio.

Ao professor Abelardo Silva Júnior e ao doutorando Otávio Valério de Carvalho pela realização dos testes citotóxicos.

Ao Félix Gonçalves de Siqueira da unidade Embrapa Agroenergia pelo fornecimento da torta de pinhão-manso.

Aos amigos dos Laboratórios MIPID (Manejo Integrado de Plantas Daninhas) e LASA (Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos), pela convivência agradável e amizade.

A minha família, que mesmo distante estava torcendo pelo meu sucesso.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Dayana Alves Rodrigues, filha de Wanderley dos Reis Rodrigues e Rosmarina Cordeiro Alves Rodrigues, nasceu em Janaúba, Minas Gerais, em 02 de fevereiro de 1989.

Em 2009, ingressou no Curso de Licenciatura em Química na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, diplomando-se em julho de 2013.

Durante este período, foi bolsista do Programa de Educação Tutorial (PET/CAPS) por três anos, desenvolvendo pesquisas na área de Educação e eletroquímica.

Em agosto de 2013 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química Orgânica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa. Desenvolveu pesquisas de degradação de compostos orgânicos no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), e em Julho de 2015, submeteu-se à defesa de dissertação para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Sumário

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 PINHÃO-MANSO E SEU CULTIVO	2
1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SEMENTE DE PINHÃO-MANSO	4
1.3 ÉSTERES DE FORBOL.....	6
1.4 UTILIZAÇÃO DA TORTA E FARELO DO PINHÃO-MANSO COMO RAÇÃO ANIMAL	7
1.5 PROCESSO DE DETOXIFICAÇÃO DO PINHÃO-MANSO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1 AMOSTRAGEM.....	10
2.2 DETERMINAÇÃO DOS ÉSTERES DE FORBOL NA TORTA E NO FARELO DE PINHÃO-MANSO	10
2.3 SELEÇÃO DOS TRATAMENTOS PARA DEGRADAÇÃO DOS ÉSTERES DE FORBOL. 11	
2.3.1 Tratamento com temperatura	11
2.3.2 Tratamento com radiação Gama	11
2.3.3 Tratamento com radiação Ultravioleta.....	12
2.3.4 Tratamento com solução aquosa de hidróxido de amônio e ureia	12
2.3.5 Delineamento experimental.....	12
2.4 OTIMIZAÇÃO DOS TRATAMENTOS	12
2.4.1 Tratamento com solução aquosa de hidróxido de amônio	13
2.4.2 Tratamento com solução de ureia	13
3. CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL.....	14
3.1 Cinzas	14
3.2 Lipídeo.....	15
3.3 Proteínas.....	15
3.4 Fibra bruta	15
4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE TORTA E DO FARELO DE PINHÃO-MANSO TRATADOS E SEM TRATAMENTO.	16
4.1 Células	16
4.2 Extratos utilizados	17
4.3 Análise do efeito citotóxico.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ÉSTERES DE FORBOL NA TORTA E NO FARELO DE PINHÃO-MANSO	19
5.2 SELEÇÃO DOS TRATAMENTOS PARA A DEGRADAÇÃO DOS ÉSTERES DE FORBOL	21
5.3 OTIMIZAÇÃO DOS TRATAMENTOS	23
5.4 CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DA TORTA E DO FARELO DE PINHÃO-MANSO .	29
5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS METANÓLICOS DA TORTA E DO FARELO DE PINHÃO-MANSO.	31
6. CONCLUSÕES	33
7. REFERÊNCIAS.....	34
8. ANEXOS	40

RESUMO

RODRIGUES, Dayana Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Quantificação e Degradação dos Ésteres de Forbol em Torta e Farelo de *Jatropha curcas* L.** Orientador: Antônio Jacinto Demuner. Coorientador: Luiz Cláudio Almeida Barbosa.

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma oleaginosa com alto teor de óleo, considerada uma promissora matéria-prima para a obtenção de biodiesel. O processo de extração do óleo gera grande quantidade de resíduos, que constituem fonte renovável de alto valor nutricional, de baixo custo e que ainda não possui direcionamento de uso. A utilização deste material na alimentação animal pode ser uma alternativa por possibilitar o aumento da renda do produtor sem aumentar o custo com a produção e a área plantada. No entanto, estes coprodutos são considerados tóxicos a animais, pela presença dos ésteres de forbol, sendo crucial sua detoxificação antes do uso para este fim. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi propor tratamentos de degradação dos ésteres de forbol presentes nos coprodutos da extração do óleo de pinhão-manso (torta e farelo), sem reduzir seus valores nutricionais, e verificar sua toxicidade em células de rim bovino para seu uso como possível suplemento na dieta de ruminantes. O tratamento com solução de hidróxido de amônio associado ao tratamento térmico foi o mais eficiente na degradação dos compostos. Os teores de proteína após este tratamento estão próximos aos encontrados em fontes usualmente adicionadas em formulações de rações. Os ensaios citotóxicos provaram a diminuição da toxicidade dos extratos metanólico de torta e farelo de pinhão-manso tratados em relação aos extratos sem tratamento. Reforçando o potencial destes coprodutos como fontes de proteínas na dieta bovina.

ABSTRACT

RODRIGUES, Dayana Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Quantification and Degradation of Phorbol Esters of Cake and Bran of *Jatropha curcas* L.** Adviser: Antônio Jacinto Demuner. Co-Adviser: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.

The pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) a seed with high oil content, considered a promising raw material for production of biodiesel. The oil extraction process generates large amounts of waste, which are renewable source of high nutritional value, low cost and does not have use of guidance. The use of this material in the feed can be an alternative for enabling a higher income for the producers without increasing the cost of production and the planted area. However, these byproducts are considered toxic to animals, the presence of phorbol esters, and their critical detoxification before use for this purpose. In this context, the objective of this research was to propose degrading treatment of phorbol esters present in the co-products of the extraction of *Jatropha* oil (cake and meal), without reducing their nutritional values, and check their toxicity in bovine kidney cells to their use as a possible supplement in the diet of ruminants. Treatment with ammonium hydroxide solution associated with the thermal treatment was more efficient in the degradation of compounds. The protein levels after treatment are close to those found in sources usually added in feed formulations. Cytotoxic tests proved the decreased toxicity of methanol extracts pie and jatropha meal treated compared to untreated extracts. Enhancing the potential of these co-products as sources of protein in cattle diet.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de energia tem sido crucial para o desenvolvimento da sociedade humana ao ajudá-la a controlar e a adaptar-se ao meio ambiente. Gerir o uso da energia é inevitável em qualquer sociedade funcional. No mundo industrializado o desenvolvimento de recursos energéticos tem se tornado essencial à agricultura, transportes, recolha de desperdícios, tecnologia da informação, telecomunicações que são hoje pré-requisitos de uma sociedade desenvolvida.

A maior parte da energia consumida no mundo provém de fontes limitadas, finitas e não renováveis, como petróleo, carvão e gás natural, totalizando quase 90% da demanda de energia mundial. Essas fontes não renováveis possuem diversos pontos negativos como, o aumento da temperatura global, sendo limitadas e com previsão de esgotamento no futuro, portanto, a busca por fontes alternativas de energia é de suma importância (MAKKAR et al., 2009).

A partir de 2008 a Agência Nacional de petróleo, gás natural e biocombustíveis com base na lei nº 11.097, de janeiro de 2005, instituiu o Programa Brasileiro de Biodiesel e fixou um percentual mínimo obrigatório de 2% de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado em qualquer parte do território nacional. Em continuidade com essa política, em 2013 esse mínimo já foi alterado para 5%. Nesse sentido, a procura de novas oleaginosas para obtenção de óleo para a produção de biodiesel torna-se imprescindível para suprir a demanda nacional.

No Brasil, devido à grande diversidade de espécies oleaginosas, pode-se produzir biodiesel a partir de diferentes óleos vegetais como os provenientes de soja, milho, amendoim, algodão, babaçu, palma e pinhão-manso (FERRARI et al., 2005). Dentre as oleaginosas, o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) vem se destacando como uma cultura com grande potencial (NUNES, 2007). Uma das vantagens desta espécie é o seu longo ciclo produtivo que pode chegar a 40 anos, mantêm a média de produtividade de 2 t ha⁻¹, além de ser uma cultura que contém alto teor de óleo, pode se desenvolver nas pequenas propriedades com a mão de obra familiar (PURCINO e DRUMMOND, 1986 citado por

ARRUDA et al., 2004).

A obtenção do óleo vegetal para a produção do biodiesel pode gerar grande quantidade de resíduos. Estes resíduos ou coprodutos constituem matéria prima renovável de baixo custo e sua utilização pode possibilitar o aumento da renda do produtor sem aumentar o custo com a produção e a área plantada (ABDALLA et al., 2008). Dessa forma, além de agregar valor a um coproduto, promove-se a redução do seu impacto ambiental.

Alguns estudos relataram que a torta de pinhão-manso é rica em proteína bruta, no entanto, apresenta teores de compostos tóxicos e antinutricionais impedindo a sua utilização diretamente na alimentação animal, sendo empregada como adubo (MARTINEZ et al., 2006).

Os compostos tóxicos e antinutricionais presentes nas sementes do pinhão-manso são os ésteres de forbol, lectina inibidor de tripsina e fitato. No entanto os ésteres de forbol são considerados os principais componentes tóxicos presentes nas sementes e sua concentração varia de acordo com a variedade de pinhão-manso analisada, todavia, se detoxificados esses coprodutos poderiam ser utilizados como complemento na dieta animal, sendo fonte de energia para ruminantes, aves e monogástricos (EMBRAPA, 2012).

1.1 Pinhão-manso e seu cultivo

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) pertence à família Euforbiaceae, a mesma da mamona e mandioca. É uma cultura perene, rústica e adaptada às mais diversas condições edafoclimáticas (ALVES et al., 2008).

O gênero *Jatropha* é formado por aproximadamente 160 espécies, sendo herbáceas e arbustivas. Elas apresentam valor medicinal, ornamental e algumas são produtoras de óleo.

O pinhão-manso está distribuído em todas as regiões tropicais, inclusive no Brasil. Além de ser resistente à seca, pode se desenvolver em vários tipos de solos, inclusive naqueles arenosos, salinos, alcalinos e rochosos, os quais, sob o ponto de vista nutricional e físico, são restritivos ao pleno desenvolvimento de raízes (ALVES et al., 2008).

Em geral, esta espécie possui um arbusto grande, de crescimento rápido, cuja altura normal está entre dois e três metros, mas pode alcançar até

cinco metros em condições especiais. O diâmetro do tronco é de, aproximadamente 0,20 m, possui raízes curtas e pouco ramificadas, caule liso, de lenho mole e medula desenvolvida, mas pouco resistente. O floema possui longos canais que se estende até as raízes, nos quais circula o látex, um suco leitoso que corre com abundância de qualquer ferimento. O tronco é dividido desde a base, em compridos ramos, com numerosas cicatrizes produzidas pela queda das folhas na estação seca, as quais ressurgem logo após as primeiras chuvas (CORTESÃO, 1956 citado por ARRUDA et al., 2004).

Antigamente, o óleo do pinhão-manso era usada na fabricação caseira de sabão sendo sua primeira aplicação comercial reportada em Lisboa (GÜBITZ et al., 1999), e mais recentemente, como cerca viva. Seu maior atributo, entretanto, é o alto teor de óleo produzido pelas sementes, podendo frutificar por mais de 40 anos (NUNES, 2007).

O pinhão-manso apresenta fruto capsular ovoide com diâmetro de 2,0 a 3,0 cm, trilobular com uma semente em cada cavidade, formado por um pericarpo ou casca lenhosa e dura (Figura 1). Nos primeiros estádios a cor é inicialmente verde, passando por amarelo, castanho e por ultimo preto, quando atinge o estado de maturação. Apresenta 38% a 47% de casca e 53 a 62% de sementes pesando cada uma de 1,50 a 3,0 g (ARAÚJO e SOUSA, 2008).

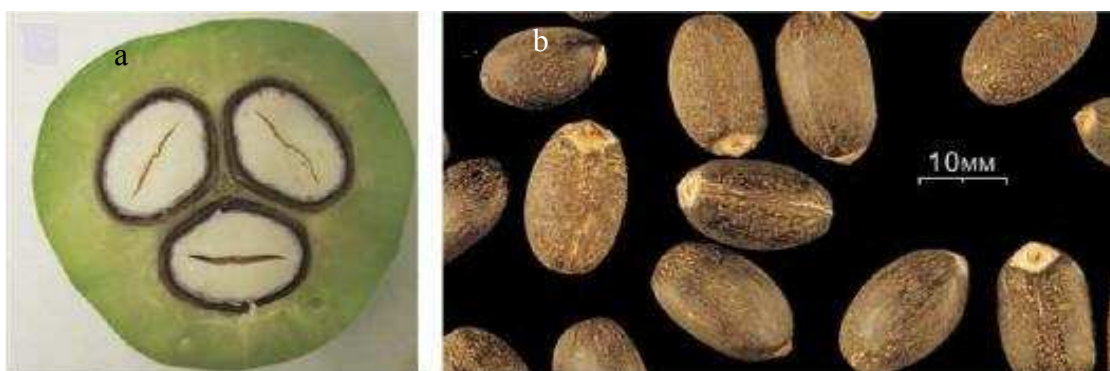


Figura 1. a) Seção transversal do fruto de *Jatropha curcas* L. contendo três sementes. b) sementes maduras de *Jatropha curcas* L. (Fonte: HAAS et al., 2002)

O pinhão-manso quando comparado com outras oleaginosas como soja e mamona, pode ser considerada uma das mais promissoras das regiões sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil, por ser uma planta com um

potencial considerável na produção de combustíveis renováveis sendo que sua utilização apresenta um menor impacto negativo sobre o meio ambiente (ACHTEN, et al., 2008).

O processo de extração do óleo do pinhão-mansão para a fabricação do biodiesel gera o óleo, a torta e o farelo. A torta e o farelo são produzidos durante a extração do óleo, considerados dois importantes coprodutos da cadeia produtiva dos óleos de pinhão-mansão. Sendo a torta (resíduo da prensagem com aproximadamente 7 a 10% do óleo residual) e o farelo (resíduo da extração com solvente com menos de 1% do óleo residual).

1.2 Composição química da semente de pinhão-mansão

As sementes do pinhão-mansão possuem cerca de 7% de água, 55,3% de açúcar, amido, albuminoides e materiais minerais, sendo 4,8% de cinzas, 4,2% de nitrogênio e 37,5% de óleo. O óleo não apresenta cheiro, sendo incolor e fluido por possuírem de uma a quatro ligações duplas, porém pode precipitar e solidificar a alguns graus acima de zero (NUNES et al., 2007), sendo os ácidos graxos oleico e linoleico encontrados em maior proporção seguidos dos ácidos esteárico e palmítico, palmitoleico e lignocérico em menores concentrações (MARTINEZ et al., 2006). Os óleos vegetais são constituídos por uma mistura de tri, di e monogliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias (SANTOS, 2011). As quantidades de óleo obtidas do pinhão-mansão variam entre 25% a 40% de acordo com a extração escolhida, genótipo e tempo de coleta. Estudos realizados por TEIXEIRA (1987) mostram que *Jatropha curcas* cultivada no estado de São Paulo apresentou em média $34 \pm 1,4\%$ de óleo nas sementes. Este valor foi detectado a partir do momento em que os frutos de pinhão-mansão passaram a apresentar os primeiros sinais de maturação. Segundo o autor é de extrema importância o conhecimento dos primeiros sinais de maturação do fruto para realizar a extração,

De acordo com CASTRO et al., (2008), a época adequada para colheita de uma determinada espécie pode ser identificada por parâmetros como a coloração dos frutos, teor de água, massa de matéria seca, tamanho entre outros. No entanto, diversos desses parâmetros quando avaliados em conjunto

contribuem para a obtenção de lotes de sementes com maior qualidade e para a identificação do ponto de máximo acúmulo de matéria seca, inclusive de óleo, pelas sementes, chamado de ponto de maturidade de massa (EGGLI, 1998).

A partir de estudos realizados por MARTINEZ et al., (2006) com quatro variedades de pinhão-manso de diferentes regiões edafoclimáticas originárias do México pode-se determinar a composição em aminoácidos da proteína do farelo desengordurado, conforme dados apresentados na Tabela 1.

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

Aminoácidos essenciais	Mínimo	Máximo	FAO/WHO
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
Aminoácidos não-essenciais			
Ácido aspártico	11,40	12,20	
Prolina	3,86	4,21	
Serina	4,59	4,91	
Ácido glutâmico	14,70	16,70	
Glicina	4,16	4,40	
Alanina	4,26	4,51	
Arginina	10,40	11,80	

FAO/WHO 1991: referência sugerida para crianças de 2-5anos ^a cistina + metionina. ^b tirosina + fenilalanina. Fonte: Martinez-Herrera et al., (2006). Modificado.

Apesar do pinhão-mansão ser uma fonte rica em aminoácidos sua utilização diretamente na alimentação animal não é permitida devido à presença de componentes tóxicos nas sementes. Por este motivo, a sua única utilização tem sido como adubo. Essa toxicidade por muito tempo foi atribuída a uma lectina denominada curcina, porém, mais tarde descobriu-se que essa atividade tóxica está relacionada com a presença de uma complexa mistura de ésteres que apresenta atividades carcinogênicas e ação inflamatória, denominados ésteres de forbol (YUNPING et al., 2012).

1.3 Ésteres de forbol

Os ésteres de forbol são um grupo de substâncias de ocorrência natural encontrados em espécies das famílias Euphorbiaceae e Thymeleaceae. Esses compostos são derivados do diterpeno tigliane, compostos policíclicos nos quais duas hidroxilas em carbonos vizinhos são esterificadas com ácidos graxos (Figura 2) (GOEL et al., 2007).

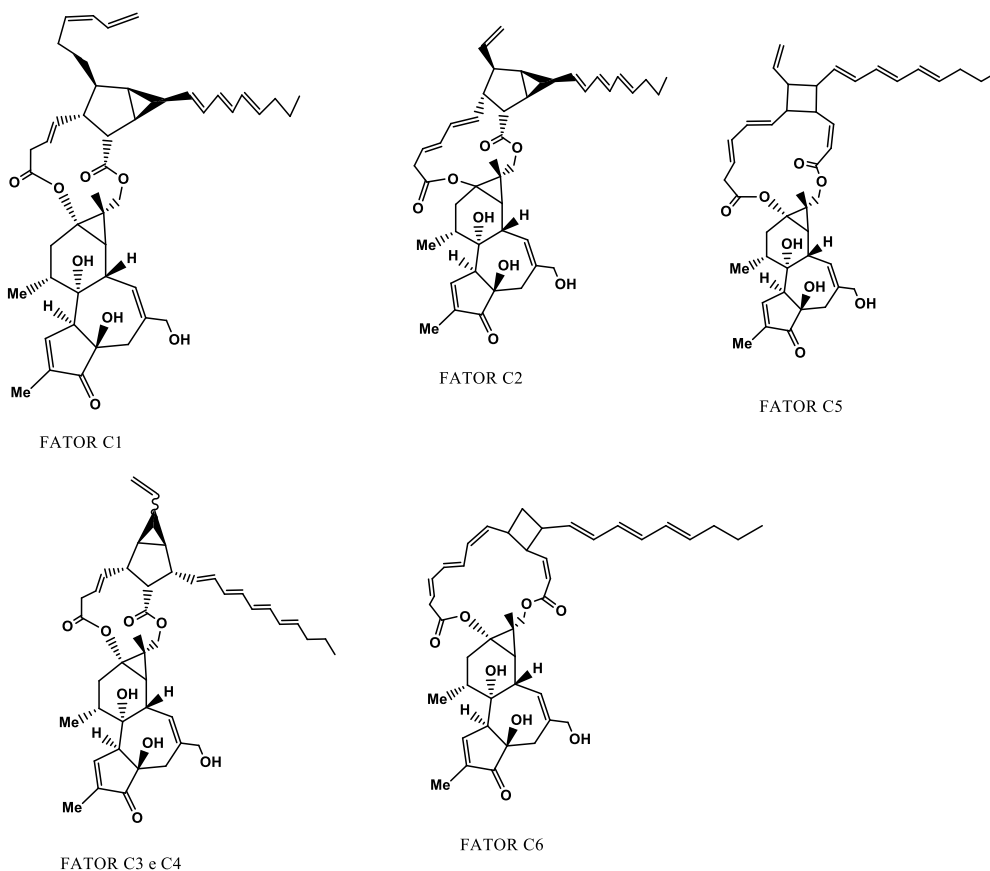


Figura 2. Estruturas de ésteres de forbol isoladas em *Jatropha curcas* L. (Haas et al., 2002).

Os ésteres de forbol são substâncias que causam toxicidade aguda. Manifesta por uma resposta inflamatória intensa, e/ou toxicidade crônica, por meio da promoção de tumores pelo mecanismo de ligação, imitam a ação do diacilglicerol, ativador da proteína quinase C, a qual regula o crescimento e diferenciação celular. A atividade biológica dos ésteres de forbol é altamente específico-estrutural. São encontrados em baixíssimas concentrações, porém animais que receberam estas substâncias na dieta manifestaram sinais de intoxicação (GOEL et al., 2007). Efeitos purgativos, irritação da pele e promoção de tumores são as principais causas relatadas pela ingestão de pinhão-manso por animais (MAKKAR et al., 2007), o que limita a sua utilização na alimentação animal.

Os ésteres de forbol são compostos termicamente estáveis e podem suportar a temperatura de torrefação (160 °C durante 30 minutos) (CRUZ, 2012). No entanto é possível reduzir a sua concentração em tortas ou farelos pela combinação de tratamentos químicos com tratamentos térmicos (MAKKAR et al., 1997; AREGHEORE et al., 2003; RAKSHIT et al., 2008).

Embora, o gênero *Jatropha* apresenta-se predominantemente composto por espécies tóxicas, existem espécies com baixos teores dos ésteres de forbol, considerados naturalmente atóxicos. Essas espécies não tóxicas tem ocorrência restrita a algumas regiões do México (MAKKAR et al., 1997). Da mesma forma existem espécies que não possuem ésteres de forbol, como a *Jatropha phatyphylla*, entretanto possuem fatores antinutricionais como fitatos, lectina e inibidores de tripsina (MAKKAR, et al., 2010).

Estudos realizados por MAKKAR, et al., (1997), avaliaram diferentes variedades de pinhão-manso, uma delas consideradas atóxica, a qual apresentou baixo teor de ésteres de forbol (0,11 mg g⁻¹), enquanto que as variedades tóxicas foram encontrados valores elevados, com teor máximo de 2,70 mg g⁻¹ de ésteres de forbol.

1.4 Utilização da torta e farelo do pinhão-manso como ração animal

Os gastos com alimentação de animais de corte são os principais fatores responsáveis pelo custo da produção. Com isso, alimentos alternativos e de

baixo custo, representam uma forma de maximizar os lucros. A agroindústria gera quantidades consideráveis de coprodutos que, muitas vezes, têm potenciais valores nutritivos, os quais poderiam ser utilizados na alimentação (GOES et al., 2008)

A utilização da torta ou farelo de pinhão-manso na alimentação animal pode ser analisada sob duas vertentes, a primeira, ainda pouco estudada, visa avaliar o nível máximo de adição de pinhão-manso que não expresse toxicidade ou no qual essa toxicidade não apresente severidade. E a segunda, visa obter uma metodologia eficaz para detoxificação dessa oleaginosa (MONTEIRO, 2014).

Os coprodutos da extração do óleo de pinhão-manso livres de substâncias tóxicas tornariam um alimento alternativo, de baixo custo com alto valor nutricional. O principal interesse da sua utilização está relacionado com a quantidade significativa de proteína, nitrogênio, potássio e sódio além de outros componentes nutricionais importantes na alimentação animal presentes nesta oleaginosa.

1.5 Processo de detoxificação do pinhão-manso

MAKKAR et al., (2008), realizando estudos comparativos com sementes de pinhão-manso de diferentes regiões do oeste e leste da África, América do Norte, América Central e Ásia, observaram que o valor nutricional e a quantidade de substâncias com potencial tóxico no pinhão-manso variam conforme a região do plantio. E ainda que as sementes de pinhão-manso provenientes de plantas da Província de Paplanta, no México, não apresentaram ésteres de forbol em quantidade detectável. No entanto, a maioria dos genótipos apresentaram teores elevados dos ésteres de forbol, sendo considerados tóxicos a animais.

Makkar et al., (2010), descrevem um método eficiente mas inviável economicamente de detoxificação dos ésteres de forbol presentes no pinhão-manso a níveis não detectáveis. As sementes foram lavadas com água a 60 °C e deixadas em repouso por uma hora, em seguida, foi adicionado NaOH (6 mol L⁻¹) até pH 11, e deixado novamente em repouso durante 15 minutos. A mistura foi centrifugada e o sobrenadante coletado. Posteriormente foi

adicionado HCl (1 mol L⁻¹) até pH 8, seguido de álcool até formação de um precipitado e, por último, separação e lavagem do coproduto gerado. Foi adicionado etanol 95%, deixando em agitação por 30 min e centrifugando-se por 10 minutos. O precipitado foi coletado e lavado novamente com etanol por 10 minutos, e por fim o precipitado foi seco a 40 °C.

Estudos realizados por KHARE et al., (2011), conseguiram a degradação completa de ésteres de forbol em nove dias sob condições de fermentação otimizada por *Pseudomonas aeruginosas*, durante o estado de fermentação da semente isenta de óleo.

Em estudos utilizando tratamentos alcalinos para a degradação de ésteres de forbol, foram reduzidos em até 89% na farinha de sementes inteiras e descascadas (RAKSKIT et al., 2008). MARTINEZ et al., (2006) utilizando a torta de pinhão-manso reduziu em 97,9% o teor dos ésteres de forbol, extraíndo o composto com etanol e éter de petróleo seguido de tratamento com bicarbonato de sódio a 0,07%.

Já existem alguns tratamentos capazes de degradar os ésteres de forbol presentes nos coprodutos da extração do óleo em pinhão-manso, associando processos físicos e químicos a elevadas temperaturas (CRUZ, 2012). No entanto, poucas metodologias foram capazes de degradar o composto a níveis atóxicos com baixo custo e direcionando seu uso para ração animal.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo propor tratamentos que reduzam os teores de ésteres de forbol presentes na torta e no farelo de pinhão-manso, visando sua utilização como fonte proteica na dieta de animais.

2. Material e Métodos

2.1 Amostragem

A amostra de torta de pinhão-manso foi oriunda de uma variedade selecionada para produção de biodiesel desenvolvida pela Embrapa Hortaliças localizada no município de Brasília-DF. A amostra de farelo foi obtida a partir da amostra de torta.

A amostra de torta (100 g) foi adicionada em cartucho de celulose e levada a extrator soxhlet. A um balão (1L) foi adicionado 500 mL de hexano. O balão foi aquecido em manta e mantido sob refluxo por 4 horas. O solvente foi concentrado sob pressão reduzida a 60 °C. Foi obtido um óleo (8,338 g) de coloração amarelada. O farelo desengordurado com hexano foi dessolventizado a temperatura ambiente (25 °C) e deixado sob refrigeração à -4 °C até o momento das análises.

2.2 Determinação dos ésteres de forbol na torta e no farelo de pinhão-manso

A determinação dos ésteres de forbol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência seguindo a metodologia proposta por DEVAPPA *et al.*, (2013).

As amostras de torta de pinhão-manso (0,5 g) foram adicionadas a um eppendorf (2 mL) contendo 3 esferas de vidro com diâmetro de 3 mm. O volume foi completado com metanol e as amostras foram agitadas em vortex a 200 rpm por 3 minutos, sonicada por 5 minutos e novamente, agitada em vórtex por mais um minuto e por fim centrifugada a 8000 G. A camada metanólica formada foi retirada e todo o procedimento foi repetido três vezes. As camadas metanólicas provenientes das quatro extrações foram agrupadas e concentradas sob pressão reduzida a 60 °C. O resíduo oleoso obtido na extração foi ressuspensionado em 0,5 mL de metanol e novamente centrifugado, passado por seringa com filtro de diâmetro de 0,45 µm e analisado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) sistema Shimadzu LC 20AT, conectado a um detector arranjo de diodos (DAD) e integrador processador

(Shimadzu SPD 20A), com duas bombas de injeção automática, utilizando uma coluna C18 de aço inox (Shimadzu VP-ODS Shim-pack (250 mm x 4,6 mm d.i, e tamanho de partícula de 5 µm). Fase móvel: acetonitrila e água (80:20) em comprimento de onda 280 nm, temperatura de 30 °C e fluxo de 1,3 mL min⁻¹. O mesmo procedimento foi realizado para o farelo de pinhão-manso. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

2.3 Seleção dos tratamentos para degradação dos ésteres de forbol

Os seguintes tratamentos foram adotados: exposição à alta temperatura (120 °C), exposição à radiação gama (30 KGy), exposição à luz ultravioleta (3 horas), tratamento com solução aquosa de hidróxido de amônio (3 % m/m) e tratamento com solução de ureia (3 % m/m).

2.3.1 Tratamento com temperatura

O tratamento térmico foi realizado em amostras de torta (2 g) mantidas em estufa a 120 °C por 6 horas. A extração e determinação dos teores de ésteres de forbol foram realizadas conforme o item 2.2. O mesmo procedimento foi realizado para as amostras de farelo. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

2.3.2 Tratamento com radiação Gama

A degradação por radiação gama foi realizada seguindo metodologia proposta por GOGOI et al., (2014), utilizando Co-60 como fonte de radiação. Esta etapa foi realizada no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (Nuclebras) localizado no Campus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em Belo Horizonte - MG. .

As amostras de torta (1,5 g) foram submetidas à exposição de 30 KGy. A extração e determinação dos teores de ésteres de forbol foram realizadas conforme o item 2.2. O mesmo procedimento foi realizado com o farelo de pinhão-manso. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

2.3.3 Tratamento com radiação Ultravioleta

As amostras de torta (2 g) foram expostas à radiação UV, utilizando lâmpada de mercúrio de baixa pressão (15 W) em câmara escura por 3 horas. A extração e determinação dos teores de ésteres de forbol foram realizadas conforme o item 2.2. O mesmo procedimento foi realizado com o farelo de pinhão-manso. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

2.3.4 Tratamento com solução aquosa de hidróxido de amônio e ureia

As amostras de torta (2 g) e a solução aquosa de hidróxido de amônio (3% m/m) (10 mL) foram adicionadas a um balão (50 mL). A mistura foi agitada a 200 rpm a 35 °C por 45 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada e lavada com água destilada até pH 7. A torta tratada foi deixada em estufa por 8 horas a 105 °C. A extração e determinação dos teores de ésteres de forbol foram realizadas conforme o item 2.2. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Também foi realizado o mesmo procedimento trocando a solução aquosa de hidróxido de amônio por solução de ureia.

2.3.5 Delineamento experimental

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5, sendo o primeiro fator constituído pelos dois tipos de amostras (torta e farelo) e o segundo fator dos diferentes tratamentos de degradação (soluções de hidróxido de amônio (3% m/m), solução de ureia (3% m/m), tratamento térmico (120 °C), radiação gama (30 KGy), e luz ultravioleta (3 horas).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, os efeitos significativos submetidos ao teste de Tukey ao nível de confiança de 5% de probabilidade.

2.4 Otimização dos tratamentos

Neste estudo foram realizadas as otimizações das condições dos

tratamentos que obtiveram os melhores resultados na degradação dos ésteres de forbol.

2.4.1 Tratamento com solução aquosa de hidróxido de amônio

O estudo da otimização do tratamento com solução aquosa de hidróxido de amônio foi feito separadamente para as amostras de torta e de farelo. E foram estudadas variações nas concentrações de solução aquosa de hidróxido de amônio (3 e 7% m/m) associadas a tratamentos térmicos (35, 70 e 90 °C).

A amostra de torta (2 g) e a solução aquosa de hidróxido de amônio (3% m/m) (10 mL) foram adicionadas a um balão (50 mL). A mistura foi agitada a 200 rpm nas diferentes temperaturas (35, 70 e 90 °C) por 45 minutos, filtrada e lavada com água destilada até pH 7. A torta tratada foi deixada em estufa por 8 horas a 105 °C. A extração e determinação dos teores de ésteres de forbol foram realizadas conforme o item 2.2. O mesmo procedimento foi realizado com amostras de farelo. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

2.4.1.2 Delineamento experimental

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 sendo o primeiro fator composto por duas concentrações de solução aquosa de hidróxido de amônio (3 e 7% m/m) e o segundo fator por diferentes temperaturas (35, 70 e 90 °C). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, os efeitos significativos submetidos ao teste de Tukey ao nível de confiança de 5% de probabilidade.

2.4.2 Tratamento com solução de ureia

O mesmo procedimento adotado no item acima foi realizado substituindo a solução aquosa de hidróxido de amônio por solução de ureia.

2.4.3 Tratamento com radiação Gama

O estudo da otimização do tratamento com radiação gama na torta e no farelo foram realizados na mesma análise. E foram estudadas os efeitos das variações de doses de radiação gama (30, 50 e 70 KGy). As degradações foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por GOGOI et al., (2014), utilizando como fonte de radiação o Co-60.

Amostras de torta (1,5 g) foram submetidas à exposição das diferentes doses de radiação gama. E a extração e determinação dos teores de ésteres de forbol foram realizadas conforme o item 2.2. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O mesmo procedimento foi realizado com farelo.

2.4.3.1 Delineamento experimental

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3, sendo o primeiro fator composto pelo tipo de amostra (torta e farelo) e o segundo fator composto por diferentes doses de radiação aplicada (30, 50 e 70 KGy). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, os efeitos significativos submetidos ao teste de Tukey ao nível de confiança de 5% de probabilidade.

3. Caracterização nutricional

As caracterizações nutricionais da torta e do farelo de pinhão-manso sem tratamento e tratados, foram realizadas pelo Departamento de Tecnologia de Alimentos no laboratório de análise físico-química de alimentos da UFV.

3.1 Cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada pelo método AOAC 942.05 (2000).

As amostras de torta (3 g) tratadas e não tratadas foram adicionadas a cadinhos e incineradas em mufla a 550 °C por 3 horas. Os cadinhos foram levados ao dessecador para resfriamento e pesagem. A determinação da

massa das cinzas foi feito pelo método gravimétrico. O mesmo procedimento foi realizado para amostras de farelo. O procedimento foi realizado em triplicata.

3.2 Lipídeo

A determinação da fração lipídica das amostras de torta sem tratamento e com tratamento foram realizadas pelo método AOAC 920.39C (1995).

As amostras de torta (2 g) tratadas e não tratadas foram adicionadas a cartucho de celulose e este foi transferido para o aparelho extrator tipo soxhlet. As amostras foram transferidas a um balão (250 mL) e foi adicionado éter (150 mL). O balão foi aquecido em manta e mantido sob refluxo por 8 horas (quatro a cinco gotas por segundo). Após a extração, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o óleo residual foi pesado. O mesmo procedimento foi realizado para as amostras de farelo. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

3.3 Proteínas

A determinação da proteína bruta das amostras de torta sem tratamento e com tratamento foram realizados seguindo a metodologia proposta pelo MINISTÉRIO da AGRICULTURA, 1981.

O nitrogênio da amostra foi digerido com ácido sulfúrico e posteriormente foi destilado pelo destilador Kjeldahl. Neste método, o nitrogênio (N) total, isto é, o N proteico e não proteico são convertidos em proteína bruta. Para a conversão do nitrogênio em proteína, foi utilizado o fator de correção 6,25. O mesmo procedimento foi realizado para as amostras de farelo. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

3.4 Fibra bruta

A determinação da fibra bruta das amostras de torta sem tratamento e com tratamento foi realizado seguindo a metodologia proposto pelas NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985). As amostras (2 g) foram

adicionadas a um cartuchos de celulose e extraídas em soxhlet, utilizando éter como solvente. O solvente remanescente foi retirado sob pressão reduzida. O resíduo foi transferido para um erlenmeyer (750 mL), com boca esmerilhada. Foi adicionado solução ácida (100 mL) e o agente de filtração (0,5 g). As amostras foram colocadas em refluxo por 40 minutos a partir do tempo em que a solução ácida foi adicionada, mantidas sob aquecimento, sendo agitadas frequentemente, a fim de evitar que gotas sequem na parede do frasco. As amostras foram filtradas em cadinho de Gooch previamente preparados com areia diatomácea e com auxílio de vácuo. E em seguida foram lavadas com água fervente até que a água de lavagem não tivesse reação ácida e novamente lavadas com álcool (20 mL) e éter (20 mL). O material foi aquecido em estufa a 105 °C por 2 horas, e resfriado em dessecador até a temperatura ambiente. E foram pesadas, repetindo as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante. As amostras foram incineradas em mufla a 550°C e resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente. Foram pesadas, e repetindo as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante. A perda de peso é igual à quantidade de fibra bruta. O mesmo procedimento foi realizado para as amostras de farelo. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

4. Avaliação da citotoxicidade dos extratos metanólicos de torta e do farelo de pinhão-manso tratados e sem tratamento.

Os estudos citotóxicos foram realizados no Laboratório de Virologia Animal do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

4.1 Células

O estudo foi realizado utilizando células do rim de bovinos (MDBK), cultivadas a 37°C, em estufa com atmosfera umedecida (95%) e enriquecida com CO₂ (5%). O Meio Essencial Mínimo (MEM) (Sigma-Aldrich) foi utilizado para o crescimento e manutenção das células, contendo penicilina (1,6 mg mL⁻¹), estreptomicina (0,4 mg mL⁻¹) e suplementados com 10% de soro fetal bovino (SBF).

4.2 Extratos utilizados

Os extratos metanólicos utilizados foram diluídos para uma concentração estoque de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ em PBS (tampão fosfato salino) e DMSO. Após o preparo das concentrações, as soluções foram esterilizadas e filtradas utilizando filtro com membrana poliéstersulfônica (PES) com tamanho de poro de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. As concentrações avaliadas no teste foram diluídas em MEM e corresponderam a 10, 20, 40, 80, 100, 140 e $180 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para cada concentração foram realizadas 6 repetições. O DMSO utilizado na diluição dos extratos também foi avaliado pelo ensaio de citotoxicidade para assegurar seu uso enquanto solvente.

4.3 Análise do efeito citotóxico

A citotoxicidade foi avaliada microscopicamente por alteração da morfologia celular e confirmada e mensurada através de variação do método colorimétrico baseado na redução do sal tetrazolium brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) por células viáveis, estabelecido por MOSMANN (1983) e NIU *et al.* (2001). Este sal é um substrato amarelo que é clivado por células vivas formando o produto azul escuro formazana, requerendo membranas mitocondriais ativas (células recém-mortas não clivam quantidades significativas de MTT).

O ensaio de atividade citotóxica com MTT foi realizado utilizando microplacas de 96 orifícios contendo células MBDK (2×10^4 células poço⁻¹) que foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 horas em estufa com atmosfera a 5% de CO_2 para adesão das células, restabelecimento do crescimento e início de formação das camadas celulares. Depois desse intervalo, foram tratadas com soluções de diferentes concentrações dos compostos e incubadas novamente em estufa por 72 horas. As microplacas foram monitoradas por microscopia óptica diariamente.

Após o período de incubação, foram avaliados os efeitos dos extratos sobre a viabilidade e a morfologia celular (perda da monocamada, granulação, vacuolização no citoplasma, alongamento e estreitamento dos prolongamentos e escurecimento das bordas celulares). Em seguida, as células foram lavadas

duas vezes com tampão salino fosfato (PBS) a pH 7,2 e incubadas em estufa com MTT (1 mg mL⁻¹) por 4 horas. Posteriormente, o sal formado foi solubilizado pela adição de DMSO (100 µL poço⁻¹) e agitação por 15 minutos a 76 RPM e 37 °C em agitador com temperatura controlada. As microplacas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ durante 1 hora. As densidades ópticas (DO) foram determinadas por leitora de microplaca a 492 nm.

A viabilidade celular foi calculada para cada concentração testada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{média densidade óptica (células tratadas)} \times 100}{\text{média densidade óptica (controles)}}$$

A CC₅₀ foi definida como sendo a concentração necessária para reduzir a densidade óptica em 50%, indicando uma redução máxima de 50% na viabilidade celular. Seis poços foram avaliados para cada concentração de cada extrato e para o controle e os resultados foram apresentados como a média desses valores.

5. Resultados e discussão

5.1 Identificação dos ésteres de forbol na torta e no farelo de pinhão-manso

Os isômeros dos ésteres de forbol já encontrados em *Jatropha curcas* L. são divididos em seis fatores (C1, C2, C3, C4, C5 e C6), embora nem todas espécies apresentem todos estes isômeros, sendo mais comum a presença de quatro isômeros. Essas moléculas de ésteres de forbol têm a estrutura de tigliane como um núcleo comum (12-desoxi-16-hidroxi-forbol) e que se diferenciam pelas cadeias laterais ligadas à função éster (CHIES, 2013). E a quantificação destes ésteres de forbol é reportada na literatura como sendo equivalente a um éster de forbol PMA (12-miristato-13-acetato de forbol) extraído da espécie *Croton tiglium*. Estudos realizados por DEVAPPA et al., (2013) compararam a quantificação dos ésteres de forbol utilizando o padrão 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA) com o fator majoritário C1 (equivalente a 51% dos ésteres de forbol isolado da *Jatropha curcas* L.) e observaram a equivalência entre os mesmos. Desta forma pode-se supor que os ésteres de forbol de pinhão-manso e PMA possuem coeficientes de absorvidade similares permitindo a quantificação dos ésteres de forbol com exatidão.

Neste estudo, a mesma proposta de quantificação realizada por GOGOI et al., (2014), foi adotada. As condições cromatográficas foram otimizadas priorizando melhor separação entre os picos e menor tempo de corrida. Inicialmente foi variada a porcentagem de acetonitrila (63%, 77% e 80%) utilizando fluxo de 1,0 mL min⁻¹ (Figura 3).

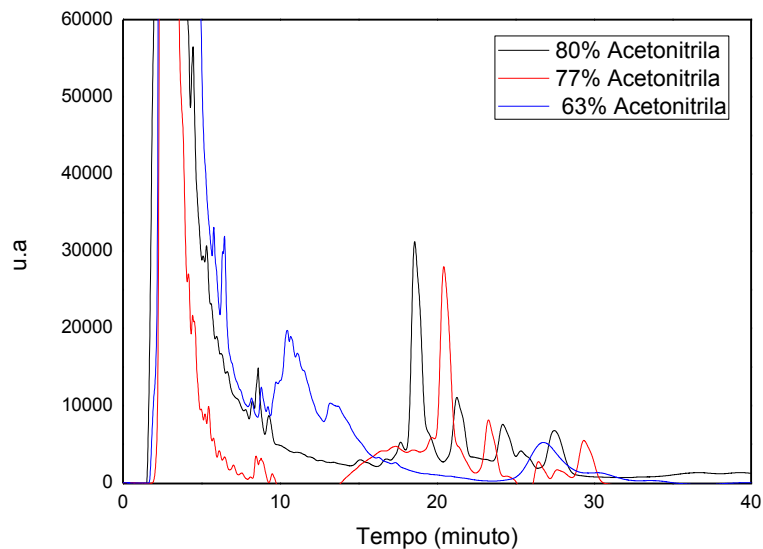


Figura 3. Cromatograma dos ésteres de forbol variando a porcentagem de acetonitrila utilizando fluxo de 1.0 mL min^{-1} .

O aumento da proporção de acetonitrila melhorou a separação dos picos dos ésteres de forbol, sendo adotada a utilização de 80% de acetonitrila. No entanto, na busca pela redução do tempo da corrida, visando menores gastos de tempo e solvente, também foi variado o fluxo da corrida ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$ para $1,3 \text{ mL min}^{-1}$). O aumento do fluxo reduziu o tempo da corrida de 30 minutos para 20 minutos (Figura 4).

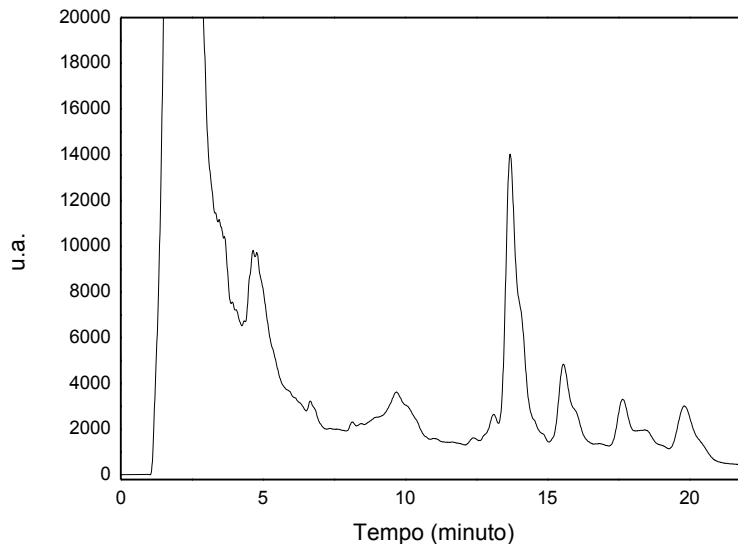


Figura 4. Cromatograma dos ésteres de forbol utilizando 80:20 (Acetonitrila/Água), fluxo de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$.

Os quatro picos dos ésteres de forbol foram observados no intervalo de 14 a 20 minutos utilizando o fluxo de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ (Figura 4). Os picos foram

identificados comparando os espectros de UV de cada pico com os espectros de UV reportados na literatura (Figura 5). Sendo o primeiro indicando a presença do fator C1, segundo pico fator C2, terceiro pico fator C3 e o quarto pico refere-se aos fatores C4 e C5. Todos os picos foram quantificados em equivalência ao padrão 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA). As concentrações iniciais encontradas na torta e no farelo de pinhão-manso foram $0,452 \text{ mg g}^{-1}$ e $0,224 \text{ mg g}^{-1}$ respectivamente.

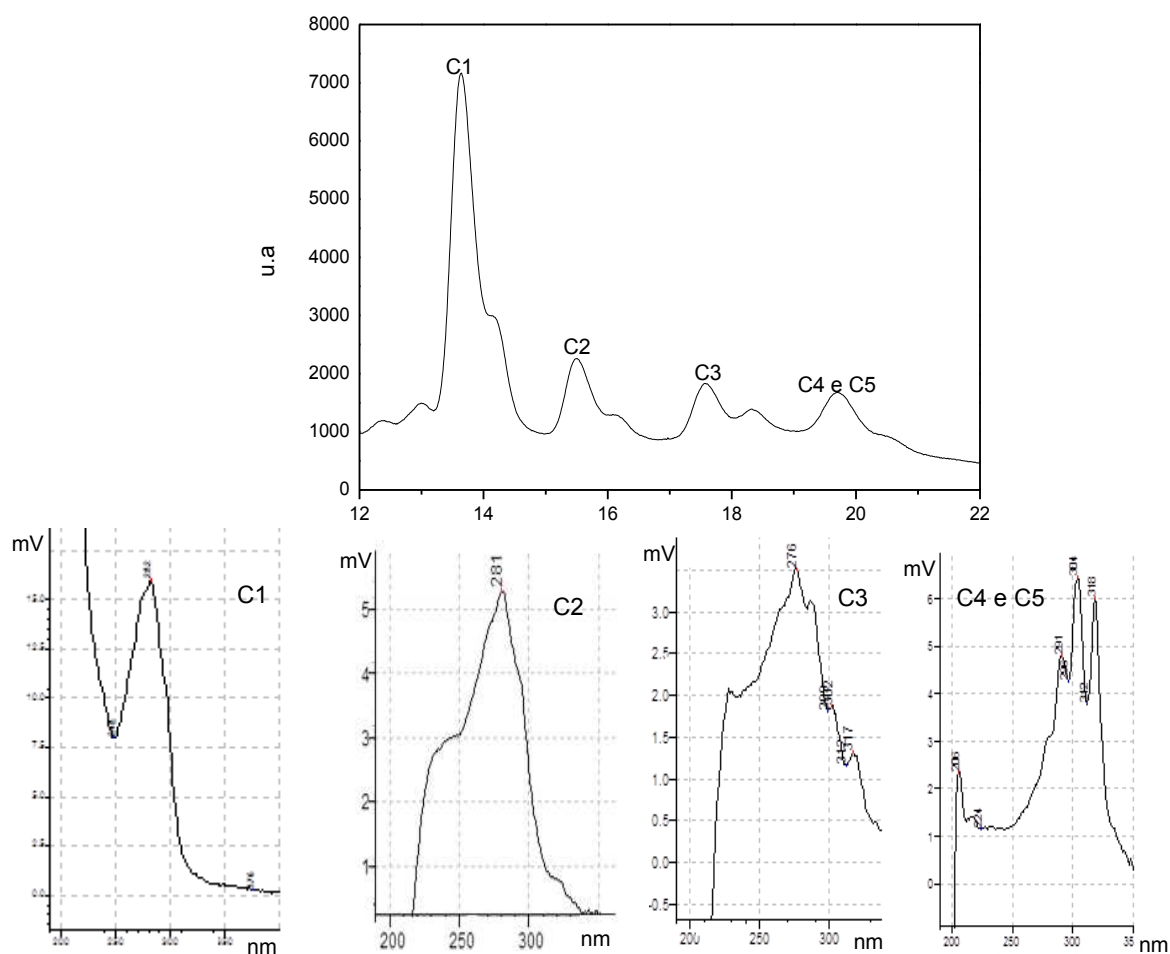


Figura 5. CLAE-UV (λ 280 nm) cromatograma dos picos dos ésteres de forbol presentes na torta e no farelo e seus respectivos espectros.

A escolha dos tratamentos para a degradação dos ésteres de forbol presentes na torta e no farelo de pinhão-manso foi baseada em tratamentos já propostos na literatura, e outras formas alternativas que apresentam potencial para degradação do composto: exposição à alta temperatura ($120 \text{ }^\circ\text{C}$), exposição à radiação gama (30 KGy), exposição à luz ultravioleta (3 horas),

tratamento com solução aquosa de hidróxido de amônio (3% m/m) e tratamento com solução de ureia (3% m/m). Estes dois últimos foram escolhidos por serem muito utilizados em amonização de forragens, sendo fontes alternativas que fornecem nitrogênio não proteico ao animal (DOLBERG, 1992).

No estudo da análise de variância entre os cinco tratamentos adotados houve efeito significativo na interação entre os tipos de amostras e os tratamentos, por esta razão foi realizado o estudo do desdobramento da interação entre os fatores.

Todos os tratamentos reduziram os teores dos ésteres de forbol presentes tanto na torta quanto no farelo de pinhão-manso, com destaque para o uso de solução aquosa de hidróxido de amônio, solução de ureia e radiação gama (Figura 6). Todavia, de acordo com MAKKAR et al., (1998), para que os co-produtos da extração do óleo de pinhão-manso sejam considerados atóxicos à animais, as concentrações dos ésteres de forbol devem estar abaixo de $0,11 \text{ mg g}^{-1}$, valor não alcançado em nenhum dos tratamentos.

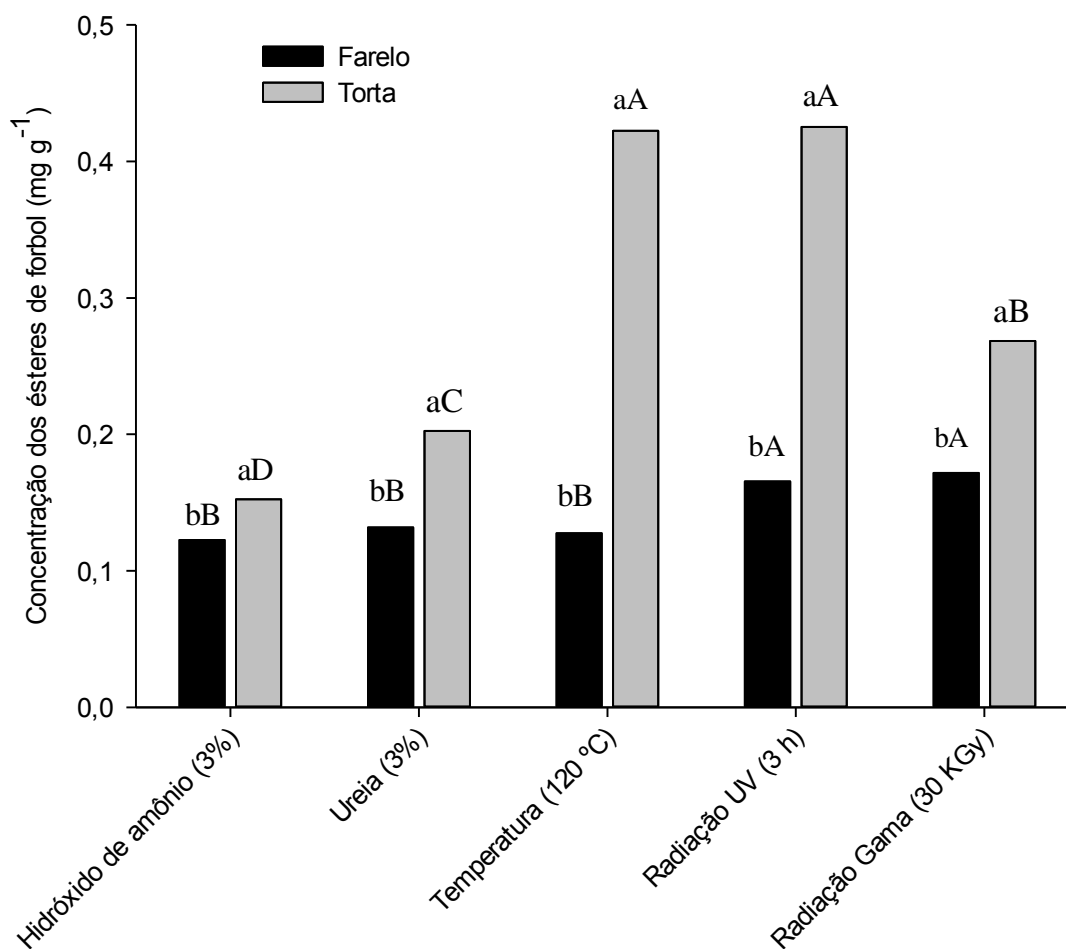


Figura 6. Concentração dos ésteres de forbol (mg g^{-1}) da torta e do farelo de pinhão-manso submetidas aos diferentes tratamentos de degradação dos ésteres de forbol. Barras de mesma cor seguidas por letras maiúsculas iguais e barras de cores diferentes seguidas por mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5.3 Otimização dos tratamentos

Visando aumentar a eficiência dos tratamentos, os três com melhores resultados (solução aquosa de hidróxido de amônio, solução de ureia e radiação gama), foram submetidos a novos estudos.

Os tratamentos utilizando solução aquosa de hidróxido de amônio e solução de ureia, foram avaliados em diferentes concentrações (3 e 7% m/m) associadas a tratamentos térmicos (35, 70 e 90 °C). E o tratamento com

radiação gama, foi analisado quanto à influência do aumento das doses de radiação na degradação dos ésteres de forbol.

Os estudos associando solução de ureia com tratamento térmico só causaram efeito significativo na variação de temperatura em torta.

O aumento da temperatura na torta reduziu a eficiência da solução de ureia em degradar os ésteres de forbol (Figura 7). Já no farelo, o aumento da concentração de ureia e temperaturas não causaram nenhum efeito na degradação dos ésteres de forbol (Figura 8).

As menores concentrações dos ésteres de forbol alcançadas com estes tratamentos foram $0,1876 \text{ mg g}^{-1}$ e $0,1314 \text{ mg g}^{-1}$ na torta e no farelo respectivamente, valores ainda considerados tóxicos (Makkar et al., 1998).

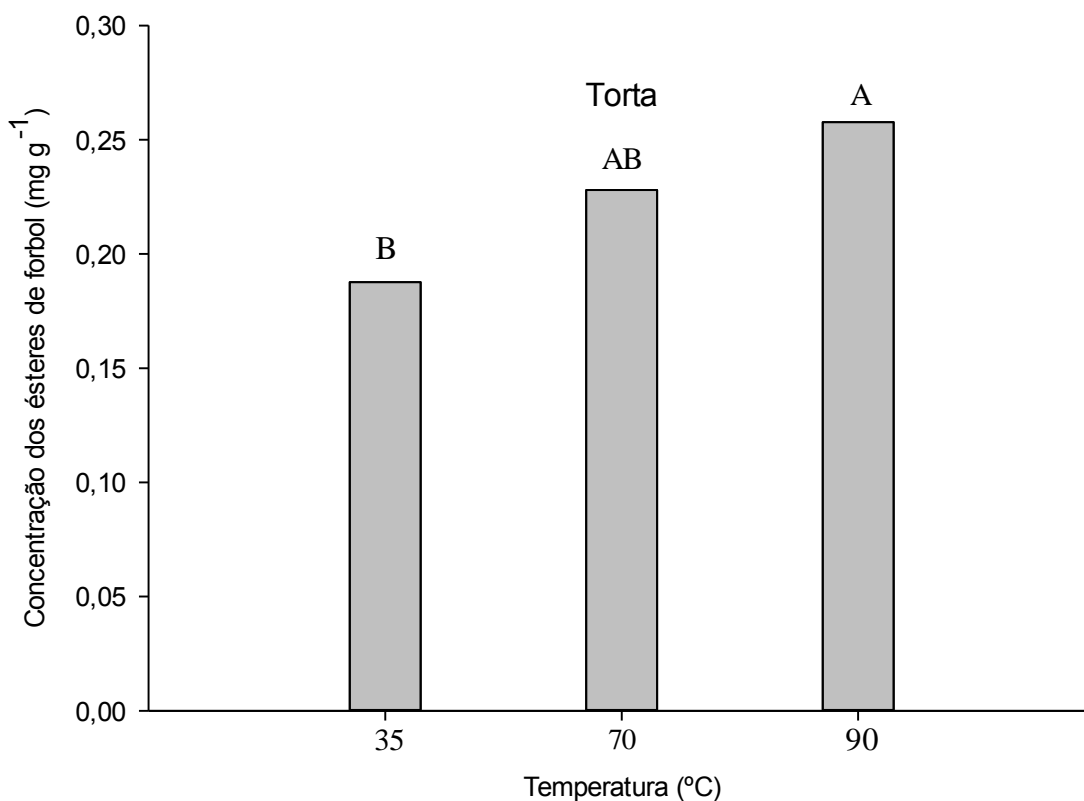


Figura 7. Concentração dos ésteres de forbol (mg g^{-1}) presentes na torta de pinhão-manso submetidas a diferentes temperaturas. Barras de mesma cor seguidas por letras maiúsculas iguais e não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

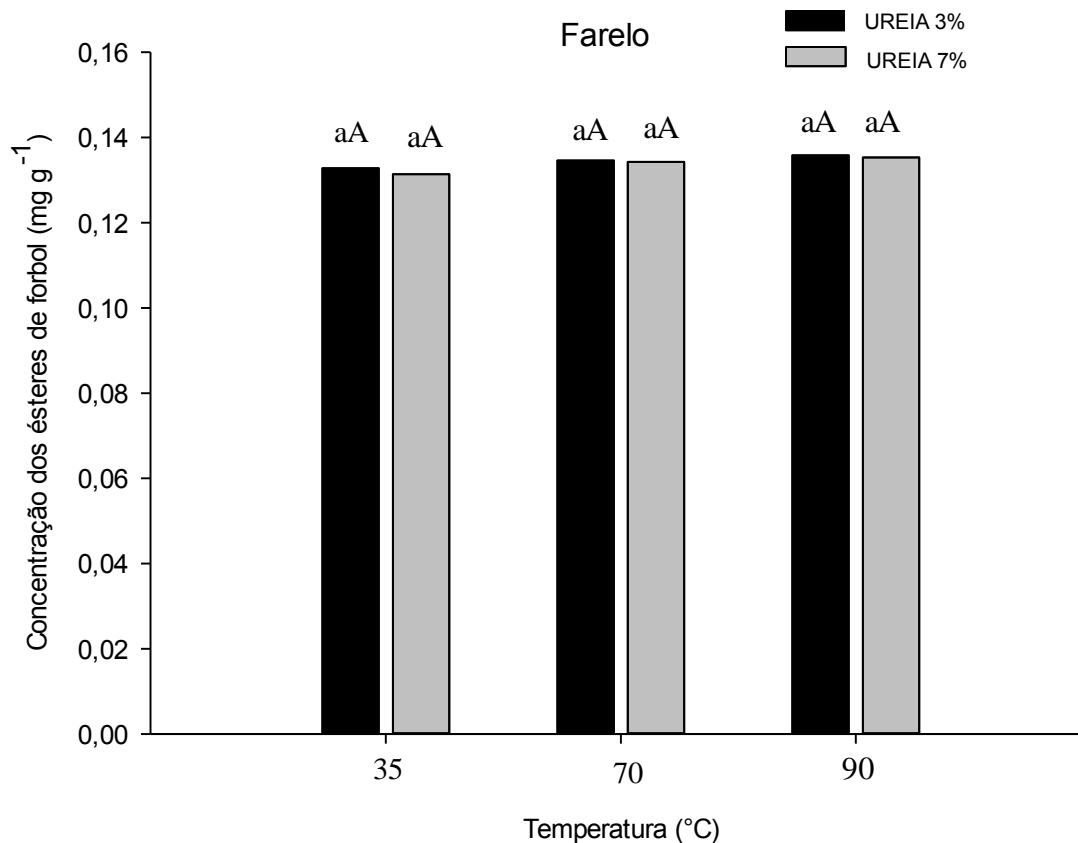


Figura 8. Concentração dos ésteres de forbol (mg g^{-1}) presentes no farelo de pinhão manso submetidas a diferentes concentrações de ureia e temperaturas. Barras de mesma cor seguidas por letras maiúsculas iguais e barras de cores diferentes seguidas por mesmas letras minúsculas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A degradação causada pela radiação gama na torta e no farelo foram estudadas em uma mesma análise de variância. A interação entre estes dois fatores foi significativa, por esta razão optou-se pelo estudo do desdobramento da interação.

O aumento das doses de radiação gama aumentou a eficiência de degradação dos ésteres de forbol presentes na torta e no farelo (Figura 9). No entanto, os menores valores alcançados, na torta ($0,1143 \text{ mg g}^{-1}$) e no farelo ($0,1138 \text{ mg g}^{-1}$) estão a cima dos valores considerados atóxicos. Vale ressaltar que esta técnica além de ser de custos elevados, necessita de locais específicos, inviabilizando possíveis aplicações em grande escala.

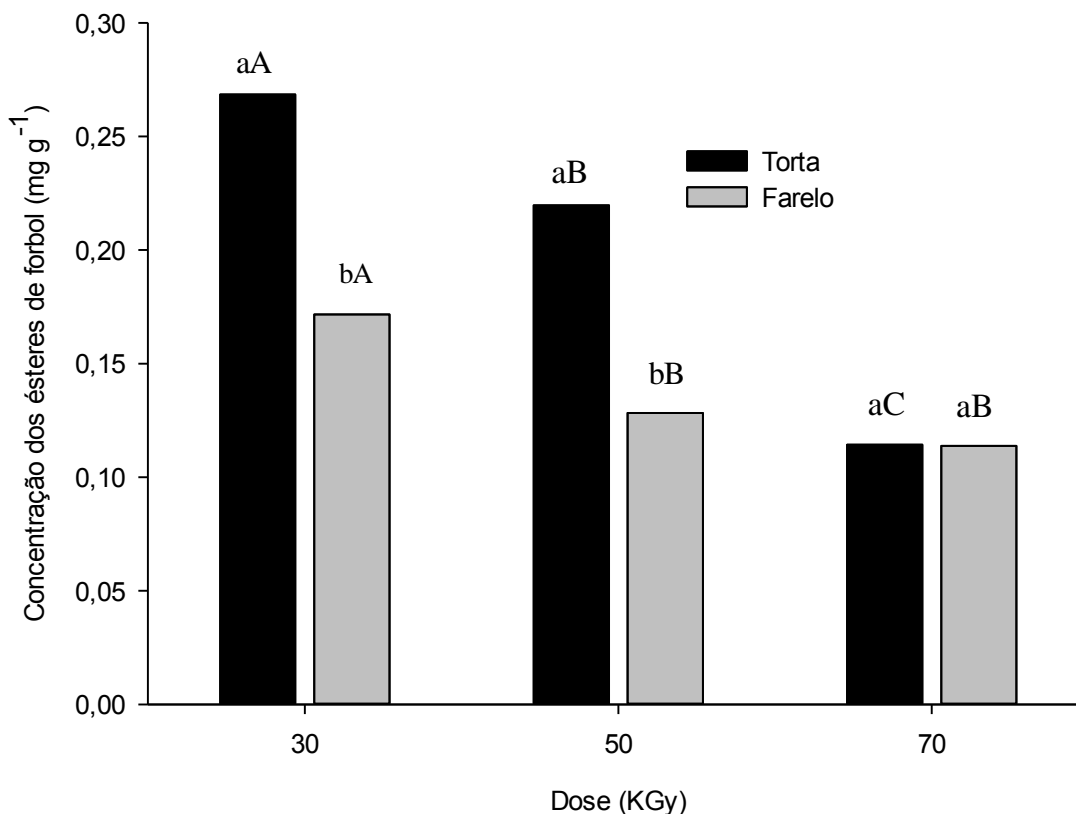


Figura 9. Concentração dos ésteres de forbol (mg g^{-1}) presentes no farelo de pinhão-manso submetidas a diferentes doses de radiação. Barras de mesma cor seguidas por letras maiúsculas iguais e barras de cores diferentes seguidas por mesmas letras minúsculas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O tratamento com solução aquosa de hidróxido de amônio associado à temperatura resultou em efeito significativo na interação entre estes fatores, para os dois tipos de amostras (torta e farelo).

O uso de solução aquosa de hidróxido de amônio associado ao tratamento térmico apresentou respostas semelhantes na torta e no farelo (Figuras 10 e 11). A concentração de 7% causou maior degradação somente quando associada ao tratamento térmico à 35 °C. E o aumento da temperatura aumentou a degradação dos ésteres de forbol presentes tanto na torta quanto no farelo.

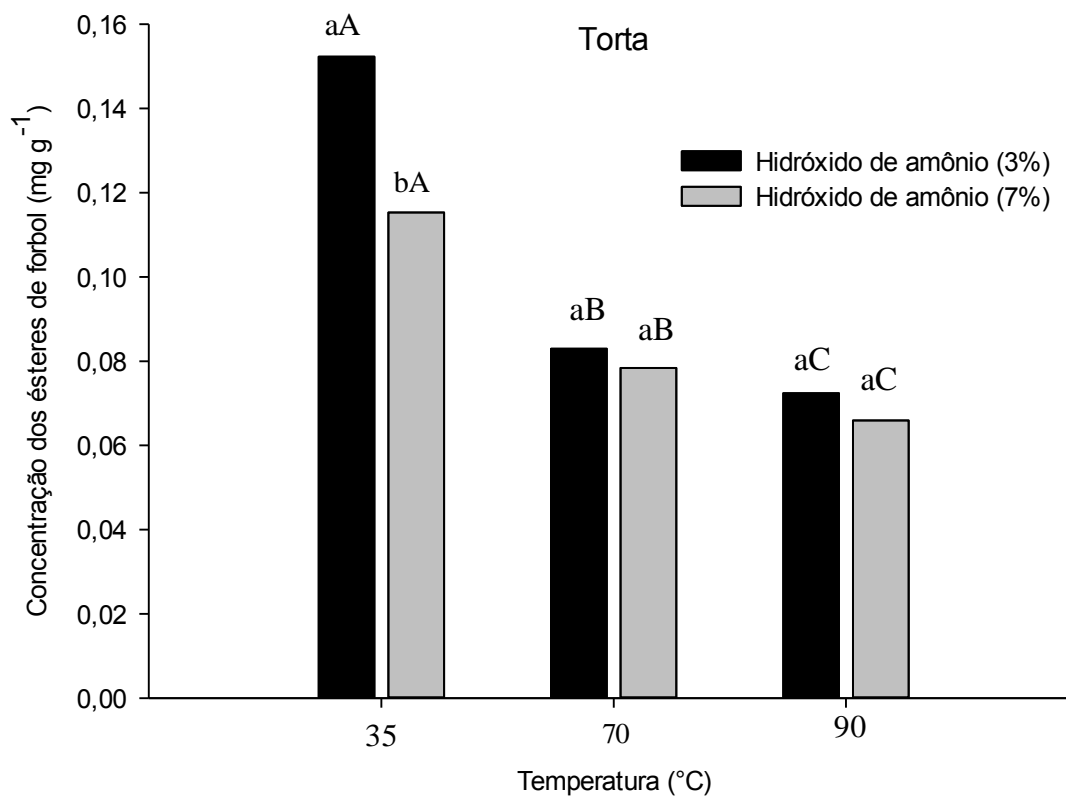


Figura 10. Concentração dos ésteres de forbol (mg g^{-1}) da torta de pinhão-manso submetidas a diferentes concentrações de solução aquosa de hidróxido de amônio e temperaturas. Barras de mesma cor seguidas por letras maiúsculas iguais e barras de cores diferentes seguidas por mesmas letras minúsculas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

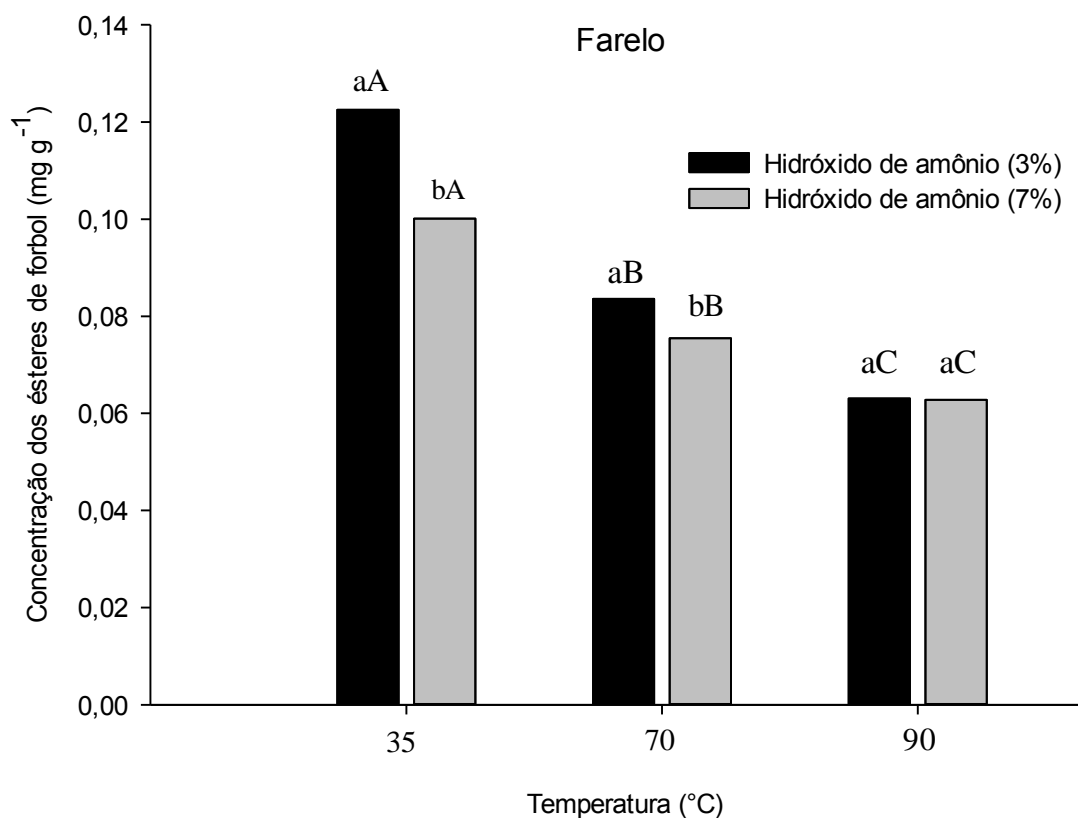


Figura 11. Concentração dos ésteres de forbol (mg g^{-1}) do farelo de pinhão-manso submetidas a diferentes concentrações de solução aquosa de hidróxido de amônio e temperaturas. Barras de mesma cor seguidas por letras maiúsculas iguais e barras de cores diferentes seguidas por mesmas letras minúsculas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O tratamento térmico isoladamente não foi eficiente na degradação dos ésteres de forbol, resultados também encontrados por MAKKAR et al.,(1997). Segundo estes autores afirmam que o calor por si só não consegue degradá-los. No entanto, os autores observaram que a temperatura associada a tratamentos químicos foram os tratamentos mais eficazes na redução dos ésteres de forbol. No presente trabalho, os tratamentos realizados a 70 e 90 °C, independente da concentração de hidróxido de amônio adotada e tipo de amostra (torta ou farelo) foram os melhores tratamentos, uma vez que os teores de ésteres de forbol obtidos foram menores que $0,08 \text{ mg g}^{-1}$, valores abaixo dos níveis considerados atóxicos.

MARTINEZ et al., (2006) trataram a torta com etanol 90% e 0,07% de

NaHCO₃ conseguiram reduzir os ésteres de forbol a 0,08 mg g⁻¹. AREGHEORE et al., (2003) lavaram a torta 4 vezes com metanol 92% e observaram que os ésteres de forbol foram reduzidos para 0,09 mg g⁻¹. As possíveis razões para a diminuição dos teores de ésteres de forbol nos tratamentos com solução de hidróxido de amônio podem ser explicados pela reação de “amoniólise”, ocorrendo uma reação entre amônia e um éster, produzindo uma amida (TORKOV e FEIST, 1978).

Segundo SUNDSTOL e COXWORTH (1984) alguns fatores podem afetar na eficiência da amonização, dentre eles a temperatura. Estas reações se processam mais rapidamente em temperaturas mais altas do que mais baixas, sendo as temperaturas mais próximas de 100 °C as reações são quase imediatas, enquanto que, quando próximas de 0 °C, são extremamente lentas (GARCIA e PIRES 1998). Explicando assim o sucesso da associação do tratamento com solução de hidróxido de amônio a temperaturas mais levadas (70 e 90 °C).

Contudo, o tratamento utilizando solução aquosa hidróxido de amônio (3% m/m) a 90 °C foi o melhor na degradação dos ésteres de forbol presentes em co-produtos de pinhão-manso, e por isso, este tratamento foi selecionado para posteriores análises, nutricional e de citotoxicidade.

5.4 Caracterização nutricional da torta e do farelo de pinhão-manso

As amostras tratadas com solução aquosa de hidróxido de amônio (3% m/m) associado ao tratamento térmico (90 °C), e amostras sem tratamento, foram submetidas à caracterização nutricional. O teor de lipídeo, cinza e fibra foram determinados em relação à base seca (Tabela 2).

Tabela 2. Composição nutricional da torta e do farelo de pinhão-manso tratado e sem tratamento.

	Cinza (%)	Fibra (%)	Lipídeo (%)	Proteína (%)
Torta sem tratamento	5,7	26,76	8,26	24,7
Torta tratada	3,3	29,67	4,47	11,7
Farelo sem tratamento	6,1	22,2	0,13	24,3
Farelo tratado	4,7	31,1	0,12	10,4

As porcentagens de cinza variaram de 5,7% a 3,3% na torta de pinhão-manso sem tratamento e tratada, e 6,1% a 4,7% no farelo sem tratamento e farelo tratado. Em estudos realizados com tortas obtidas pelo albúmen, MAKKAR et al., (1997) encontraram teor de cinza de 9,9%. MARTÍNEZ et al., (2006) , analisando o efeito de tratamento químico na torta, encontraram teores de cinza que variaram de 9,8 a 10,8% nas tortas sem tratamentos e de 8,8 a 12,4% nas tratadas. RAKSHIT et al., (2008) estudaram a torta obtida por sementes inteiras prensadas e, posteriormente, extraídas em soxhlet e torta obtida de albúmen extraído em soxhlet, obtiveram valores de cinza de 10,2 e 9,0%, respectivamente. Teores de cinza próximos ao obtido neste trabalho foram observados por Mendonça (2009) que analisaram a torta de pinhão-manso obtida pela prensagem das sementes inteiras (5,4% de cinzas) e o farelo de pinhão-manso (6,2% de cinzas).

As fibras alimentares variaram de 26,76% a 29,67% na torta sem tratamento e tratada, e 22,1% a 31,1% no farelo sem tratamento e tratado. Todavia, é importante frisar que, aproximadamente 99% das fibras alimentares são compostas por fibras insolúveis. As fibras insolúveis diminuem o tempo de trânsito intestinal, aumentam o peso das fezes, torna mais lenta a absorção da glicose e retardam a digestão do amido (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). SOUZA et al., (2009), analisando a torta de pinhão-manso obtida por dupla prensagem das sementes inteiras, encontraram teores de fibras alimentares de 36,68%, valores próximos aos encontrados neste trabalho.

Os teores de lipídeos foram de 8,16% a 4,47% na torta sem tratamento e tratada respectivamente, e 0,13% a 0,12% no farelo sem tratamento e tratado.

A redução dos teores de lipídeos, entre torta e farelo de pinhão-manso, ocorreu devido à extração da torta pelo hexano. Segundo BOMFIM et al., (2009), a presença do óleo eleva o valor de energia das dietas e, na maioria das vezes, melhora o perfil da gordura presente nos produtos animais. Por outro lado, pode reduzir o consumo voluntário e a produção pela interferência na digestão da fibra ou palatabilidade das dietas. Em pequenos ruminantes níveis máximos de 4% de óleo suplementar devem ser respeitados.

Os teores de proteína variaram de 24,7 a 11,7% na torta sem tratamento e tratada respectivamente, e 24,3 a 10,4% no farelo sem tratamento e tratado respectivamente. De acordo com XIAO e ZHANG (2011), o teor de proteína presente na torta é influenciado pelo processo de obtenção desta. Estudos realizados por RAKSHIT et al., (2008) encontram resultados aproximados de 22,2% de proteína para as tortas as quais foram obtidas a partir da prensagem das sementes inteiras, mesmo processo realizado neste trabalho. Neste mesmo estudo, quando as sementes foram descascadas e posteriormente prensadas os teores de proteínas obtidos foram maiores (60,3%), segundo os autores essa diferença no teor de proteína ocorreu, principalmente devido a grande quantidade de casca presente na torta prensada inteira, o que contribui para o aumento do teor de fibra nesta torta.

Os teores de proteína observados tanto na torta quanto no farelo de pinhão-manso após o tratamento estão próximos aos encontrados em fontes usualmente adicionadas em formulações de rações, como: farelo de milho (10,37%) e farelo de sorgo (12,38%) (CLARINDO et al., 2008). Reforçando o potencial destes coprodutos como fontes de proteínas na dieta bovina.

5.5 Avaliação da citotoxicidade dos extratos metanólicos da torta e do farelo de pinhão-manso.

As amostras tratadas com solução de hidróxido de amônio (3% m/m) associado ao tratamento térmico (90 °C), e as amostras sem tratamento, foram submetidas à análise do efeito citotóxico. Foi determinado a CC50 de cada extrato para as células de rim bovino (MDBK), A CMNT dos extratos estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Avaliação de citotoxicidade dos extratos metanólicos tratados com solução aquosa de hidróxido de amônio (3% m/m) associado ao tratamento térmico (90 °C), e amostras sem tratamento em células MDBK.

Extratos	CC₅₀^a (µg mL⁻¹)
Torta sem tratamento	490,25
Torta tratada	832,35
Farelo sem tratamento	518,74
Farelo tratado	2.223,21

^a Concentração do composto relacionada com redução de 50% da viabilidade celular

A toxicidade celular do DMSO também foi avaliada. A determinação da CC₁₀ (concentração relacionada com redução de 10% da viabilidade celular) do DMSO foi limitante para a preparação das concentrações das substâncias utilizadas nos ensaios citotóxicos, de forma a justificar o seu uso enquanto solvente, sem interferência nos resultados de toxicidade.

Todos os extratos avaliados apresentaram resultados dose-dependentes para os efeitos citotóxicos. Os extratos da torta e do farelo de pinhão-manso sem tratamento possuíram **CC₅₀** menores que os extratos tratados, indicando que o tratamento reduz a toxicidade dos extratos. A toxicidade do farelo tratado (**CC₅₀ 2.223,21 µg mL⁻¹**) é inferior ao da torta tratada (**CC₅₀ 832,35 µg mL⁻¹**). Tal fato pode ser explicado pela eliminação de outros possíveis compostos tóxicos além dos ésteres de forbol presentes na torta, durante o processo de obtenção do farelo a partir da extração da torta em soxhlet.

6. Conclusões

O tratamento associando solução aquosa de hidróxido de amônio (3% m/m) e tratamento térmico (90 °C), reduz os teores dos ésteres de forbol presentes nos coprodutos da extração do óleo de pinhão-manso a níveis abaixo de 0,07 mg g⁻¹, considerados atóxicos.

Os valores nutricionais presentes na torta e no farelo após este tratamento indicam, que estes co-produtos apresentam potencial para a utilização como fonte alternativa de nutrientes.

Os extratos metanólicos da torta e do farelo de pinhão-manso tratados apresentaram toxicidade consideravelmente inferior aos extratos sem tratamento.

Os resultados deste estudo indicam a possibilidade da utilização dos co-produtos da extração do óleo de pinhão-manso tratados, como fonte alternativa de proteína na dieta de animais.

7. Referências

ABDALLA, A. L.; SILVA, J. C. F.; GODOI, A. R.; CARMO, C. A.; EDUARDO, J. L. P. *et al.* Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. R. Bras. Zootec., Viçosa, v. 37, n. spe, July 2008.

ACHTEN, W. M.; VERCHOT, L.; FRANKEN, Y. J.; MATHIJS, E.; SINGH, V. P., AERTS, R. *Jatropha* bio-diesel production and use. Biomass and Bioenergy. v. 32, p. 1063-1984, 2008.

ALVES, J. M. A.; SOUZA, A. A.; SILVA, S. R. G.; LOPES, G. N.; SMIDERLE, O. J.; UCHÔA, S. C. P. Pinhão-mansô uma alternativa para produção de biodiesel na agricultura familiar da Amazônia Brasileira. Agro@ambiente Online, Boa vista, v. 1, n. 1 jan/jun 2008.

AOAC- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 17 ed. Gaythersburg, M. D., 2000.

ARAÚJO, L. G.; SOUSA, K. C. I. Pinhão-mansô para produção de biodiesel. Revista Anhanguera. v. 9, n. 1, jan/dez 2008.

AREGHEORE, E. M.; BECKER, K.; MAKKAR, H. P. S. Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments and preliminar nutritional evaluation with rats. S. Pac. Sci. 21: 50-56, 2003.

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N.E.M.; ANDRADE, A.P.; SEVERINO, L.S. Cultivo de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-àrido nordestino. Revista brasileira de oleaginosas e fibrosas, Campina Grande, v.8, n.1, p.789-799, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 920.39,C). Arlington: A.O.A.C., chapter 33. p. 10-12, 1995.

BOMFIM, M. A. D.; SILVA, M. M. C.; SANTOS, S. F. Potencialidades da utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de caprinos e ovinos. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*, v.3, n.4, p.15-26, 2009.

CASTRO, M. M.; GODOY, A. R.; CARDOSO, A. I. I. Qualidade de sementes de quiabeiro em função da idade e do repouso pós-colheita dos frutos. *Ciência e Agrotecnologia*, v.32, p.1491-1495, 2008.

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

CLARINDO, R. L.; SANTOS, F. A. P.; BITTAR, C. M. M.; IMAIZUMI, H.; LIMA, N. V. A. E PEREIRA, E. M. Avaliação de fontes energéticas e protéicas na dieta bovinos confinados em fase de terminação. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 4, p. 902-910, out./dez. 2008.

CRUZ, M. R. Extração de óleo da torta de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) com etanol para remoção de éster de forbol. Dissertação (Ciência e tecnologia de alimentos), 2012.

DEVAPPA, R. K.; BINGHAM, J. P.; KHANAL, S. K.. High performance liquid chromatography method for rapid quantification of phorbol esters in *Jatropha curcas* seed. *Industrial Crops and Products*. v. 49, p. 211-219, 2013.

DOLBERG, F. Progressos na utilização de resíduos de culturas tratadas com uréia-amônia. In: Simpósio internacional em ruminantes. Lavras, 1992. Anais. Lavras, p. 322-337, 1992.

EGGLI, D. B. Seed Biology and the yield of grain crops. New York: CAB International. p.178. 1998.

EMBRAPA AGROENERGIA. Pesquisa e desenvolvimento para aproveitamento da torta de pinhão-manso na alimentação animal. Relatório de 2012. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/61930/1/Folder->

destoxificacao-pinhao-manso-2012.pdf. Acesso em: 16 de fev. 2015.

FERRARI, R. A.; OLIVERIA, V. S.; SCABIO, O. A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 19-23, 2005.

GARCIA, R.; PIRES, A. J. V. Tratamento de volumosos de baixa qualidade para utilização na alimentação de ruminantes. In: Congresso nacional dos estudantes de zootecnia, Viçosa, 1998. Anais...Viçosa: AMEZ, p. 33-60, 1998.

GOEL, G.; HARINDER, P. S.; MAKKAR, G. F.; BECKER K. Phorbols ESters: Structure, Biological Activity, and Toxicity. *Internation. Journal of Toxicology*, v. 26, p. 279-288, 2007.

GOES, R. H. T. B.; TRAMONTINI, R. C. M.; ALMEIDA, G. D.; CARDIM, S. T.; RIBEIRO, J.; OLIVEIRA, L. A.; MOROTTI, F.; BRABES, K. C. S.; OLIVEIRA, E. R. Degradabilidade ruminal da matéria seca e da proteína bruta de diferentes subprodutos agroindustriais utilizados na alimentação de bovinos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Brasília, v. 9, n. 3, p. 715-725, 2008.

GOGOI, R.; NIYOGI, U. K.; TYAGI, A. K. Reduction of phorbol ester content in *Jatropha* cake using high energy gamma radiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2014.

GÜBITZ, G. M.; MITTELBAACH, M.; TRABI, M. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technology*, v. 67, 73–82, 1999.

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

INSTITUTO ADOLF LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª ed. Brasília: Anvisa 2005, p.1000.

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

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

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. SPORER, F.; WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas* L.. *Journal Agricultural Food Chemistry*. v. 45, n. 3, p. 3152-3157, 1997.

MAKKAR, H. P. S.; MARTÍNEZ, H. J.; BECKER, K. Variations in seed number per fruit, seed physical parameters and contents of oil, protein and phorbol ester in toxic and non-toxic genotypes of *Jatropha curcas*. *Journal of Plant Sciences*, v.3, n.3, p. 260-265, 2008.

MAKKAR, H. P. S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Plant secondary metabolites. New Jersey: Humana Press. Cap. 17. p. 101-105, 2007.

MAKKAR, H. P.; KUMAR, V.; OYELEYE, O. O.; AKINLEYE, M. A.; Angulo-Escalante, M. A.; and Becker, K. Traditional wisdom confirmed by scientific research: *Jatropha* species from Mexico is non-toxic. *Nature Precedings*, 2010.

MAKKAR, H.; MAES, J.; GREYT, W. Removal and degradation of phorbol esters during pre-treatment and transesterification of *Jatropha curcas* oil. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, Chicago, v. 86, n. 2, 173-181, Feb. 2009.

MARTINEZ, H. J.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G.; DÁVILA-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 México. *Food Chemistry*, London, v. 96, n. 1, p. 80-89, May 2006.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Salsicharia. In: Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos. Brasília, DF, v. II, cap. 2, p. 3-6, 1981.

MONTEIRO, A. G. D. Detoxificação de coprodutos obtidos na extração dos óleos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e de Mamona (*Ricinus communis* L.) para produção de alimentos em animais. Lavras: UFLA, Tese (Agroquímica)- Programa de Pós-graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, v.65, p.55 - 63, 1983.

NIU, Q. X.; ZHAO, C. Y.; JING, Z. A. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. Journal of Immunological Methods, v.251, p.11–19, 2001.

NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutzv. 1, cap. IV, p.136, , 1985.

NUNES, C. F. Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). Lavras, p. 78, 2007.

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 Chem. Toxicol. 46, 3621-3625, 2008.

SANTOS, S. B.. Biorrefinaria de Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.): Armazenamento, extração de óleo e produção sustentável de biodiesel com etanol. Tese (Engenharia Agrícola), 2011.

SOUZA, A. D. V.; FÁVARO, S. P.; ÍTAVO, L. C. V.; ROSCOE, R. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-manso, nabo-forrageiro e crambe. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 44, n. 10, p. 1328-1335, 2009.

SUNDSTOL, F.; COXWORTH, E. M. Ammonia treatment. In: SUNDSTOL, F. e OWEN, E. Straw and others fibrous by-products as feed.. Amsterdam: ELSEVIER PRESS, p.196-247, 1984.

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

TORKOV, H.; FEIST, W.C. A mechanism for improving the digestibility of lignocelulosic material with dilute alkali and liquid ammonia. Adv. Chem. Ser., v.26, n.1, p.13-21, 1978.

XIAO, J.; ZHANG, H. Comparative evaluation of *Jatropha curcas* L. seed meals obtained by different methods of defatting on toxic, antinutritional and nutritive factors. Journal Food Sci Technol. v. 51, p. 1126-1132, 2011.

YUNPING, B.; HA, B. T. N.; EUNICE, Y.; CHUENG, L. L.; YAN, Y. Light induced degradation of phorbol esters. Ecotoxicology and Environmental Safety. v. 84, p. 268-273, 2012.

8. Anexos

Tabela 4. Quadro do resumo da análise de variância (ANOVA) das concentrações dos ésteres de forbol (mg g^{-1}) da torta e farelo de pinhão-manso submetidas a tratamentos de degradação.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
Tipo de amostra	1	0,16970**
Tratamento	4	0,27470**
Interação	4	0,02123**
Resíduo	20	0,00006
CV (%)		3,50

* e **:significativo ao nível de 0,05 e 0,01, pelo teste F, respectivamente; GL: grau de liberdade

Tabela 5. Quadro do resumo da análise de variância (ANOVA) das concentrações dos ésteres de forbol (mg g^{-1}) da torta de pinhão manso submetidas ao tratamento com solução de ureia sob diferentes concentrações e temperaturas.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
		Torta
Concentração	1	0,00003 ^{ns}
Temperatura	2	0,00742**
Interação	2	0,00094 ^{ns}
Resíduo	12	0,00015
CV (%)		12,0

* e **:significativo ao nível de 0,05 e 0,01 respectivamente, ^{ns} não significativo pelo teste F, GL: grau de liberdade.

Tabela 6. Quadro do resumo da análise de variância (ANOVA) das concentrações dos ésteres de forbol (mg g^{-1}) de farelo de pinhão-manso submetidas ao tratamento com solução de ureia sob diferentes concentrações e temperaturas.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
		Farelo
Concentração	1	0,0000 ^{ns}
Temperatura	2	0,00002 ^{ns}
Interação	2	0,00000 ^{ns}
Resíduo	12	0,00002
CV (%)		3,30

* e **:significativo ao nível de 0,05 e 0,01 respectivamente, ^{ns} não significativo pelo teste F, GL: grau de liberdade,.

Tabela 7. Quadro do resumo da análise de variância (ANOVA) das concentrações dos ésteres de forbol (mg g^{-1}) da torta e farelo de pinhão manso submetidas ao tratamento com radiação Gama com diferentes doses de radiação.

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio
Torta	1	0,01783**
Farelo	2	0,01698**
Interação	2	0,01698**
CV(%)		6,37

* e **:significativo ao nível de 0,05 e 0,01, pelo teste F, respectivamente; GL: grau de liberdade

Tabela 8. Quadro do resumo da análise de variância (ANOVA) das concentrações dos ésteres de forbol (mg g^{-1}) da torta de pinhão manso submetidas ao tratamento com hidróxido de amônio sob diferentes concentrações e temperaturas de degradação.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
		Torta
Concentração	1	0,00160**
Temperatura	2	0,00714**
Interação	2	0,00050**
Resíduo	12	0,00002
CV (%)		4,29

* e **:significativo ao nível de 0,05 e 0,01, pelo teste F, respectivamente; GL: grau de liberdade

Tabela 9. Quadro do resumo da análise de variância (ANOVA) das concentrações dos ésteres de forbol (mg g^{-1}) do farelo de pinhão-manso submetidas ao tratamento com solução de hidróxido de amônio sob diferentes concentrações e temperaturas

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
		Farelo
Concentração	1	0,00048**
Temperatura	2	0,00363**
Interação	2	0,00190**
Resíduo	12	0,00002
CV (%)		4,75

* e **:significativo ao nível de 0,05 e 0,01, pelo teste F, respectivamente; GL: grau de liberdade