

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

Avaliação da destoxificação da torta de pinhão manso
(*Jatropha curcas L.*) usando método químico

Raquel Escrivane Guedes

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA DESTOXIFICAÇÃO DA TORTA DE PINHÃO MANSO
(*JATROPHA CURCAS L.*) USANDO MÉTODO QUÍMICO**

RAQUEL ESCRIVANE GUEDES

Sob a Orientação da Professora
Dr^a Marisa Fernandes Mendes

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de concentração em Tecnologia Química

Seropédica, RJ
Julho de 2013

633.85

G924a

T

Guedes, Raquel Escrivane, 1984-

Avaliação da destoxificação da torta de pinhão manso (*Jatropha Curcas* L.) usando método químico / Raquel Escrivane Guedes. - 2013.

82 f.

Orientador: Marisa Fernandes Mendes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2013.

Bibliografia: f. 66-71.

1. Pinhão-manso - Teses. 2. Pinhão-manso - Toxicologia - Teses. 3. Ésteres de forbol - Destoxificação metabólica - Teses. 4. Metanol - Teses. 5. Engenharia química - Teses. I. Mendes, Marisa Fernandes, 1972-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

RAQUEL ESCRIVANE GUEDES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 11/07/2013

Prof^a. Marisa Fernandes Mendes (Dr^a / Departamento de Engenharia Química/IT/UFRRJ)
(Orientadora e Presidente)

Prof^a. Jussara Lopes de Miranda (Dr^a / Departamento de Química Inorgânica/IQ/UFRRJ)

Prof^a. Cristiane Hess de Azevedo Meleiro (Dr^a / Departamento de Engenharia de Alimentos/DTA/UFRRJ)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, a eles devo o meu caráter, meus valores e meu amor;

À minha irmã Rejane, peça fundamental na minha jornada, sempre do meu lado nos momentos mais difíceis;

Ao meu noivo Bruno, pela paciência, pelo cuidado e pelo amor;

Ao meu irmão Rodrigo e a todos da minha família, que mesmo estando longe eu tenho sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre iluminou meus caminhos;

À Prof^a. Dr^a Marisa Fernandes Mendes pela orientação, oportunidade e dedicação;

À Banca examinadora, Prof^a. Jussara Lopes de Miranda, Prof^a Cristiane Hess de Azevedo Meleiro;

À todo o corpo docente da UFRRJ, que de alguma forma contribuíram para a minha formação;

À toda a equipe do projeto PetroBio Girassol;

À PETROBRAS e à FAPERJ, pelo apoio financeiro;

À empresa EPAMIG, pela doação das sementes de pinhão-manso;

Ao Prof. Armando Sabaa Srur e Prof. Everaldo Zonta pela ajuda nas análises;

À Prof^a. Rosane Castro Nora pela confiança e disponibilidade;

Aos colegas do Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis, em especial Fabiana, Márcio e Cristiane;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade;

A todos que, de alguma forma, colaboraram na realização deste trabalho, em especial Elaine, Rodrigo e Orlando e aos amigos do mestrado.

RESUMO

GUEDES, Raquel Escrivane. **Avaliação da destoxificação da torta de pinhão manso (*Jatropha curcas L.*) usando método químico**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Neste trabalho, as sementes de pinhão manso foram prensadas e a torta foi extraída em soxhlet em diferentes condições operacionais. Um delineamento central composto rotacional (DCCR) foi utilizado para avaliar a percentagem de éster de forbol extraída e o teor final de proteína obtido por diferentes tratamentos. O pinhão manso (*Jatropha curcas L.*), pertencente à família das Euphorbiaceae, é uma oleaginosa que possui um alto teor de óleo que se destaca como uma planta com características favoráveis para a produção de biodiesel. Como consequência da extração de seu óleo, milhares de toneladas de torta são produzidas como co-produto. Essa torta contém alto valor nutricional, mas a presença de éster de forbol (EF), um composto tóxico, restringe a sua utilização na alimentação de animais. Para agregar valor a esse co-produto é necessária a realização da destoxificação, ou seja, a remoção do EF. Diante disso, essa dissertação teve a finalidade de estudar um tratamento químico para a destoxificação da torta de pinhão manso. Duas metodologias foram realizadas baseadas em diferentes planejamentos experimentais. Um planejamento avaliou a solução 0,07% de NaHCO₃ como solvente e as variáveis analisadas foram tempo de extração (1-8 h) e razão soluto/solvente (1:5-1:15 p/v) e o outro planejamento avaliou o tempo de extração (1-8 h), razão soluto/solvente (1:5-1:15 p/v) e percentagem de metanol na mistura com etanol utilizada como solvente (0-100%). No estudo utilizando a solução 0,07% de NaHCO₃ como solvente, o teor de proteína variou de 14,92 a 18,52%. Os teores de fibra, cinza e lipídeo variaram de 32,24-36,62%, 5,21-5,91% e 14,12-16,71%, respectivamente e a melhor condição de remoção de EF foi em 8 h e 1:13,55 p/v, onde o teor final de EF na torta foi de 0,82 mg/g, mostrando que o processo não foi eficaz na destoxificação da torta. Com a utilização da mistura de etanol e metanol como solvente, o teor de proteína variou de 20,29 a 14,01% nas tortas tratada e bruta, respectivamente. A matéria seca, teor de lipídeo, cinzas e teor em fibra alimentar, em base seca, variaram de 88,47-90,70%, 16,55-1,85%, 6,14-7,71% e 42,03-47,60% com os tratamentos químicos, respectivamente. Na utilização de 50% de metanol como solvente o EF foi reduzido em 97,30% (0,10 mg/g) usando tempo de extração de 8 h e proporção de soluto/solvente de 1:10 p/v, o que indica que o método químico utilizado foi capaz de destoxificar a torta de pinhão manso e aumentar o teor de proteína, aumentando assim seu valor nutricional.

Palavras-chave: Éster de forbol, metanol, análise estatística

ABSTRACT

GUEDES, Raquel Escrivane. **Detoxification evaluation of the *Jatropha curcas* L. cake using chemical methodology.** Dissertation (Master in Chemical Engineering, Chemical Technology). Technology Institute, Chemical Engineering Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The methodology involved the pressing of the *Jatropha curcas* seeds and the cake was extracted using soxhlet and different operational conditions for PE removal. The central composite rotatable design (CCRD) was used to evaluate the percentage of phorbol ester extracted by the different treatments. *Jatropha curcas*, belonging to Euphorbiaceae family, is an oilseed with a high oil content and it stands as a plant with potential for biodiesel production. As a result of its oil extraction, thousand tonnes of seed cake are produced as by-product. This seed cake has high nutritional value, but the presence of phorbol ester (PE), a toxic compound, restricts its use in animal feed. The detoxification of this by-product could aggregate value to this raw material and this is the aim of this work. Two methodologies were done based on different experimental planning. A design evaluated the influence of the solution 0.07% of NaHCO₃ as the extraction solvent and the variables analyzed were extraction time (1-8 h) and solute/solvent ratio (1:5-1:15 w/v). The other design evaluated extraction time (1-8 h), solute/solvent ratio (1:5-1:15 w/v), and percentage of methanol in the mixture with ethanol used as solvent (0-100%). The study using 0.07% of NaHCO₃ as solvent of extraction, the protein content ranged from 14.92 to 18.52%. The fiber content, ash and lipid ranged from 32.24-36.62%, 5.21-5.91% and from 14.12-16.71%, respectively and the best conditions of PE extraction were 8 h and 1:13.55 w/v, where the final content of the PE was 0.82 mg/g showing that the process was not effective in detoxification of the seed cake. Using methanol and ethanol as solvent the protein content ranging from 20.29 to 14.01% in seed cake treated and untreated, respectively. The dry matter, lipid, ash and dietary fiber content ranged from 88.47 to 90.70%, 16.55-1.85%, 6.14-7.71% and 42.03-47.60% with chemical treatments, respectively. Using a mixture with 50% of methanol the PE was reduced at 97.30% (0.10 mg/g) with extraction time of 8 h and solute/solvent ratio of 1:10 w/v, it show that the chemical method used was able to detoxify the seed cake and increase the protein content, also increasing its nutritional value.

Keywords: Phorbol ester, methanol, statistical analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ilustração de uma árvore de pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	3
Figura 2- Planta de pinhão manso: a- Tronco; b- Látex.....	3
Figura 3- Planta de pinhão manso: a- Folhas em crescimento; b- Planta entrando no repouso; c- Brotamento com as primeiras chuvas.....	4
Figura 4- Flores: a- Florescência; b- Flores masculinas; c- Flores femininas.....	4
Figura 5- Frutos em diferentes estádios de maturação em uma mesma planta	5
Figura 6- Frutos de pinhão manso.	5
Figura 7- Semente de pinhão manso.	6
Figura 8- Pragas: a- Tripes; b- Cigarrinha verde; c- Ninfas e adultos dos percevejos.	8
Figura 9- Doenças: a- Oídio; b- Ferrugem.	8
Figura 10- Intoxicação de ovinos: a- Animal raquético e deprimido; b- Ovino morto após ingerir casca da <i>Jatropha curcas</i>	12
Figura 11- Variedades de pinhão manso: a- Genótipo tóxico; b- Genótipo não tóxico.	17
Figura 12- Estrutura molecular do 12-deoxi-16-hidroxi-forbol	18
Figura 13- Variação do peso dos ratos alimentados com diferentes rações.....	25
Figura 14- Variação do peso dos peixes alimentados com diferentes rações.....	26
Figura 15- Porcentagem extraída de éster de forbol com os diferentes solventes.....	35
Figura 16- Sementes de pinhão manso doadas pela EPAMIG.....	40
Figura 17- Prensa utilizada para a obtenção da torta.....	40
Figura 18- Fluxograma de obtenção da torta.....	41
Figura 19- Tratamento de destoxificação	42
Figura 20- Fluxograma completo do processo utilizado.	42
Figura 21- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) da extração do éster de forbol em função do tempo e da razão soluto/solvente.	52
Figura 22- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) da extração do éster de forbol em função do tempo e influência da mistura de metanol/etanol.	53
Figura 23- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) da extração do éster de forbol em função da mistura de metanol/etanol e da razão soluto/solvente.....	53
Figura 24- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) do teor de proteína em função da mistura de metanol/etanol e da razão soluto/solvente.	56
Figura 25- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) do teor de proteína em função da mistura de metanol/etanol e do tempo.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição do fruto do pinhão manso	5
Tabela 2- Teor de éster de forbol e composição do albúmen de diferentes regiões	13
Tabela 3- Fatores tóxicos e antinutricionais presentes nas tortas de <i>Jatropha curcas</i> e soja ..	14
Tabela 4- Composição do albúmen e casca de variedades de <i>Jatropha curcas</i>	15
Tabela 5- Composição da torta de diferentes variedades de <i>Jatropha curcas</i> e soja	15
Tabela 6- Variação do número de sementes por fruto dos genótipos tóxico e não tóxico	17
Tabela 7- Peso e teor de proteína, óleo e éster de forbol nos genótipos tóxico e não tóxico ..	17
Tabela 8- Principais ácidos graxos presentes no óleo do pinhão manso	19
Tabela 9- Composição química da torta obtida de diferentes variedades e por diferentes métodos de extração do óleo	20
Tabela 10- Composição da torta obtida por diferentes processos	20
Tabela 11- Composição química da torta obtida por diferentes métodos de extração	21
Tabela 12- Comparação da composição de aminoácidos essenciais de torta de <i>Jatropha</i>	21
Tabela 13- Fatores tóxicos de torta de pinhão manso proveniente de vários países	22
Tabela 14- Toxicidade da torta obtida por diferentes métodos de extração de óleo	23
Tabela 15- Degradação ruminal de proteína, teores de IT, saponina, lectina e fitato	24
Tabela 16- Lectina e inibidor de tripsina presente nas amostras	25
Tabela 17- Ingredientes e composição das rações utilizadas na alimentação dos peixes.....	26
Tabela 18- Teor de éster de forbol e lectina em diferentes tratamentos de destoxificação da torta de <i>Jatropha curcas</i>	28
Tabela 19- Resultado de experimentos com ratos	29
Tabela 20- Efeito de diferentes tratamentos nos fatores antinutricionais, tóxicos e na digestibilidade de proteínas da torta de pinhão manso de diferentes regiões do México.....	30
Tabela 21- Alguns componentes da ração dos porcos.....	31
Tabela 22- Composição química das tortas de pinhão manso	32
Tabela 23- Teor de éster de forbol nas tortas e composição das rações para os ratos.....	32
Tabela 24- Peso dos ratos no início e final do experimento e éster de forbol consumido	33
Tabela 25- Mortalidade dos ratos durante o experimento	33
Tabela 26- Teor de éster de forbol em extração com ultra-som com diferentes solventes	34
Tabela 27- Concentração final de éster de forbol em torta extraída no soxhlet	35
Tabela 28- Formulação das rações utilizadas na alimentação de carpas	36
Tabela 29- Efeito dos diferentes tratamentos sobre a toxicidade da torta de pinhão manso ...	37

Tabela 30- Média de ganho de peso diário dos caprinos.....	38
Tabela 31- Níveis codificados e reais do DCCR usando mistura de etano e metanol.....	44
Tabela 32- Níveis codificados e reais do DCCR usando solução 0,07% NaHCO ₃	45
Tabela 33- Composição das tortas de pinhão manso bruta e tratada com metanol e etanol....	48
Tabela 34- Porcentagem extraída e teor final de éster de forbol com metanol e etanol.....	50
Tabela 35- Coeficientes de regressão, erro padrão e significância estatística para a extração de EF	51
Tabela 36- Análise de variância da porcentagem de EF extraído com metanol e etanol	52
Tabela 37- Teor de proteína obtido nas tortas tratadas com metanol e etanol	54
Tabela 38- Coeficientes de regressão, erro padrão e significância estatística do teor de proteína obtido no tratamento com metanol e etanol	55
Tabela 39- Análise de variância do teor de proteína utilizando-se etanol e metanol	56
Tabela 40- Composição das tortas de pinhão manso bruta e tratada quimicamente com NaHCO ₃ 0,07%	58
Tabela 41- Porcentagem extraída e teor final de EFl com a solução 0,07% de NaHCO ₃	58
Tabela 42- Análise de variância da extração dos EF utilizando NaHCO ₃ 0,07%	59
Tabela 43- Teor de proteína obtido nas tortas tratadas com NaHCO ₃	59
Tabela 44- Coeficientes de regressão, erro padrão e significância estatística do teor de proteína obtido nos tratamentos realizados com NaHCO ₃	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 O Pinhão Manso (<i>Jatropha curcas L.</i>).....	2
2.1.1 Características botânicas	2
2.1.2 Origem e distribuição	6
2.1.3 Produção e produtividade.....	7
2.1.4 Pragas e doenças.....	7
2.1.5 Principais usos do pinhão manso	9
2.2 Toxicidade	9
2.2.1 Comparação entre as variedades tóxica e não tóxica	13
2.2.2 Ésteres de forbol.....	18
2.3 O Óleo do Pinhão Manso.....	19
2.4 Torta Residual Proveniente da Extração do Óleo	20
2.5 Processos de Destoxificação	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Materiais	40
3.2 Metodologia Experimental	41
3.2.1 Preparação da amostra para análise de teor de éster de forbol.....	43
3.3 Planejamento Experimental	43
3.3.1 Planejamento utilizando mistura de metanol e etanol como solvente.....	44
3.3.2 Planejamento utilizando solução de NaHCO ₃ 0,07% como solvente.....	44
3.4 Caracterização da Torta de Pinhão Manso.....	45
3.4.1 Análise de umidade	45
3.4.2 Cinza.....	45
3.4.3 Lipídeo	45
3.4.4 Proteína.....	46
3.4.5 Fibra solúvel e insolúvel	46
3.5 Determinação do Teor de Éster de Forbol por HPLC	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
4.1 Resultados Obtidos do Tratamento com Mistura de Metanol e Etanol	48
4.1.1 Caracterização da torta de pinhão manso	48
4.1.2 Influência das variáveis na porcentagem de éster de forbol extraída.....	49

4.1.3	Influência das variáveis no teor de proteína.....	54
4.2	Resultados Obtidos do Tratamento com NaHCO ₃ 0,07%.....	57
4.2.1	Caracterização da torta de pinhão manso.....	57
4.2.2	Influência das variáveis na porcentagem de éster de forbol extraída.....	58
4.2.3	Análise dos resultados em relação ao teor de proteína.....	59
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	61
6	ANEXOS	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

O biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis e produzido a partir da reação de transesterificação entre óleos vegetais puros ou usados ou gordura animal com um álcool. O biodiesel pode ser usado puro ou misturado ao diesel de petróleo em diferentes proporções.

O Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), criado pelo Governo Federal, objetiva a produção e o uso sustentável do biodiesel a partir do cultivo de diferentes oleaginosas, possibilitando a criação de empregos e renda no campo e contribuindo para o desenvolvimento regional e a inclusão social dos agricultores. Neste programa definiu-se que, a partir de 2008, o biodiesel seja obrigatoriamente adicionado ao diesel de petróleo num percentual de 2%, o chamado B2 (SATURNINO *et al.*, 2005). Atualmente, o biodiesel vendido nos postos pelo Brasil possui 5% de biodiesel e 95% de diesel (B5).

O Brasil apresenta reais condições para se tornar um dos maiores produtores de biodiesel do mundo por dispor de solo e clima adequados ao cultivo de oleaginosas. Estima-se que existam no Brasil mais de 200 espécies de oleaginosas com potencial para esta produção, entre elas pode-se citar a mamona, o girassol, o nabo forrageiro, o algodão, a soja, entre outras (NUNES, 2007).

Dentre as oleaginosas, o pinhão manso (*Jatropha curcas L.*) vem se destacando como uma cultura com grande potencial (NUNES, 2007). Uma das vantagens do pinhão manso é o seu longo ciclo produtivo que pode chegar a 40 anos, mantém a média de produtividade de 2 ton/ha, além de ser uma cultura que pode se desenvolver nas pequenas propriedades com a mão-de-obra familiar disponível e contém um alto teor de óleo (PURCINO e DRUMMOND, 1986 citado por ARRUDA *et al.*, 2004).

A produção de biodiesel gera um grande volume de torta como co-produto da extração do óleo. No caso do pinhão manso, essa torta, apesar de ser rica em proteína, não pode ser aproveitada para a ração animal, da mesma forma como ocorre para o farelo de soja, devido à presença de fatores tóxicos e antinutricionais.

Os compostos tóxicos e antinutricionais encontrados nas sementes do pinhão-mansos são os ésteres de forbol, lectina, inibidor de tripsina e fitato, porém os ésteres de forbol são considerados os principais componentes tóxicos presente nas sementes e sua concentração varia de acordo com a variedade de pinhão-mansos analisada.

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de destoxificar a torta, ou seja, extrair os ésteres de forbol, utilizando diferentes métodos químicos e biológicos, de forma que a toxidez seja eliminada. Além disso, outra alternativa para a produção da torta destoxificada seria o melhoramento genético da planta, com a obtenção de variedades não tóxicas.

Diante disso, esse trabalho tem como objetivo verificar a eficiência da extração em Soxhlet na remoção do éster de forbol utilizando solventes orgânicos (metanol e etanol) e inorgânico (NaHCO_3), analisando-se o tempo de extração, razão soluto/solvente e o solvente utilizado com o auxílio de um delineamento composto central rotacional, além de realizar a caracterização da torta bruta e destoxificada.

Essa dissertação contém, então, uma revisão bibliográfica sobre as características do pinhão manso, sua toxicidade, composição do óleo e da torta e os principais trabalhos já publicados para a destoxificação de sua torta no Capítulo 2. No Capítulo 3, encontram-se os materiais e métodos aplicados nesse estudo, envolvendo todas as caracterizações da matéria-prima utilizada, assim como da torta destoxificada. Os resultados encontrados e as análises da influência das variáveis estudadas estão presentes no Capítulo 4 e as conclusões e sugestões para trabalhos futuros são apresentados no Capítulo 5.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na revisão bibliográfica são descritas as principais características da cultura do pinhão manso como botânica, os principais usos, origem e distribuição, pragas e doenças, produção e produtividade, composição do óleo e a toxicidade desta oleaginosa onde uma comparação entre as variedades tóxicas e não tóxicas e as características do principal componente tóxico, ou seja, o éster de forbol, são apresentadas. Será discutida também a composição da torta, mostrando seu valor nutricional e toxicidade assim como os trabalhos científicos envolvendo processos de destoxificação deste co-produto.

2.1 O Pinhão Manso (*Jatropha curcas L.*)

Diante da crescente preocupação com a preservação do meio ambiente e o aquecimento global, muitos estudos têm sido realizados na busca por novas fontes de energia que possibilite a diminuição do uso de combustíveis fósseis devido à grande emissão de dióxido de carbono oriunda da queima destes. Entre as fontes de energia renováveis mais importantes encontra-se o biodiesel, um combustível biodegradável que pode ser produzido a partir de gorduras animais ou de óleos vegetais.

Entre as oleaginosas estudadas para a produção do biodiesel, o pinhão manso (*Jatropha curcas L.*) destaca-se como uma planta com alto potencial, pois, possui alto teor de óleo, é existente de forma espontânea em áreas de solo pobre em nutrientes e de clima desfavorável, é resistente a doenças e pouco atacado por pragas, suas sementes são tóxicas e, por isso, não são consumidas por pássaros ou animais e, também, não são desviadas para o consumo humano. A cultura possui um longo ciclo produtivo, que pode chegar a 40 anos, é tolerante à seca, gera renda pela venda do óleo, é suprimento de energia (o óleo pode ser utilizado em motores e máquinas para a geração de eletricidade), contribui para o desenvolvimento rural e fixação do homem no campo, promove a segurança alimentar (permite o uso de culturas anuais alimentícias em consórcio), entre outros (SATO *et al.*, 2009).

O pinhão manso, também conhecido como purgueira (CORTESÃO, 1956; SATURNINO *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2008), grão maluco (ALVES *et al.*, 2008), pinhão-de-cerca (ALVES *et al.*, 2008), medicineira (ALVES *et al.*, 2008), mundubi-assu (HELLER, 1996), pinhão-do-inferno (ALVES *et al.*, 2008), pinhão das barbadassas (CORTESÃO, 1956), pinhão de purga (CORTESÃO, 1956; ALVES *et al.*, 2008), pinhão do Paraguai (CORTESÃO, 1956; SATURNINO *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2008), entre outros, pertence à família Euphorbiaceae, a mesma da mamona e da mandioca, que compreende, aproximadamente, 8000 espécies e cerca de 320 gêneros. O gênero *Jatropha* possui cerca de 160 espécies de plantas herbáceas e arbustivas (HELLER, 1996).

Entretanto, a espécie ainda se encontra em processo de domesticação e, segundo Saturnino *et al.* (2005), somente nos últimos 30 anos é que esta começou a ter seus aspectos agrônômicos pesquisados.

2.1.1 Características botânicas

O pinhão manso é um arbusto grande, de crescimento rápido, cuja altura normal é quatro ou cinco metros podendo chegar a 8 m e, em alguns casos, atinge 12 m de altura (CORTESÃO, 1956; TOMINAGA *et al.*, 2007) (Figura 1).



Figura 1- Ilustração de uma árvore de pinhão manso (*Jatropha curcas L.*)
Fonte: TOMINAGA *et al.* (2007)

De acordo com Cortesão (1956), o tronco, mostrado na Figura 2a, tem tendência a se ramificar desde a base em compridos e espalhados ramos, possui numerosas cicatrizes produzidas pela queda das folhas na estação seca, é esverdeado, de lenho pouco resistente, de medula desenvolvida e de diâmetro de, aproximadamente, 20 cm. Possui longos canais que se prolongam até as raízes, nos quais circula o látex (Figura 2b), suco leitoso que corre com abundância de qualquer ferimento, o qual, depois de seco, torna-se uma substância acastanhada com aspecto de resina. Saturnino *et al.* (2005) relatam que o tronco e os ramos são revestidos por uma camada cerosa que, depois de seca, se desprende em lâminas finas.

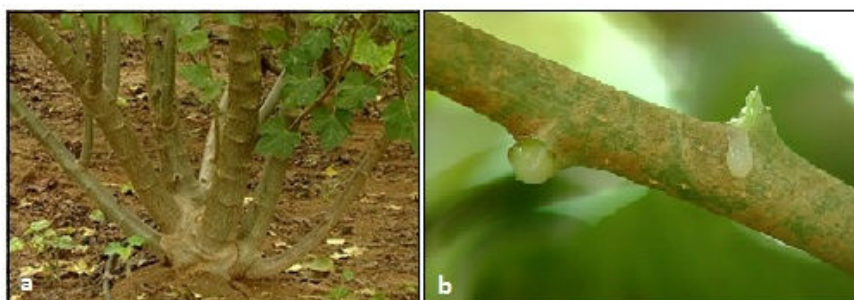


Figura 2- Planta de pinhão manso: a- Tronco; b- Látex
Fonte: TOMINAGA *et al.* (2007)

Ainda segundo Cortesão (1956), as folhas novas apresentam coloração vermelho-vinho e, à medida que crescem (Figura 3a), tornam-se verdes, esparsas e brilhantes, de três a cinco lóbulos, com nervuras esbranquiçadas e salientes na face inferior. As folhas caem na época de seca ou na estação fria e a planta entra em repouso (Figura 3b) até o começo da primavera ou na época das chuvas quando ocorre o rebrotamento, como mostrado na Figura 3c.



Figura 3- Planta de pinhão manso: a- Folhas em crescimento; b- Planta entrando no repouso; c- Brotamento com as primeiras chuvas.

Fonte: TOMINAGA *et al.* (2007)

A florescência, mostrada na Figura 4a, surge juntamente com as folhas novas. A cultura do pinhão manso apresenta floração monóica, ocorrendo flores masculinas (Figura 4b), mais numerosas (mais de 50 flores) e femininas (Figura 4c) localizadas nas ramificações (de 10 a 20 flores). As flores femininas têm pedúnculo longo e as masculinas possuem pedúnculo articulado e têm dez estames, cinco unidos na base e cinco unidos na coluna localizando-se nas extremidades das ramificações. Depois da abertura, as flores femininas permanecem receptivas para a polinização por três dias. No quarto dia, as flores que não foram fecundadas caem. A polinização das flores é feita por insetos, principalmente abelhas, formigas, vespas e moscas (CORTESÃO, 1956; TOMINAGA *et al.*, 2007).



Figura 4- Flores: a- Florescência; b- Flores masculinas; c- Flores femininas.

Fonte: TOMINAGA *et al.* (2007)

As flores de uma mesma florescência abrem em dias diferentes, o período que vai desde a abertura da primeira flor feminina até a última é de 20 dias aproximadamente. O desenvolvimento dos frutos acompanha a ordem de surgimento das flores, assim, ao mesmo tempo em que alguns frutos já estão amadurecendo, outros ainda estão se formando, como mostrado na Figura 5. Com isso, todas as etapas de florescimento e frutificação podem ser encontradas em uma mesma planta ao mesmo tempo (TOMINAGA *et al.*, 2007). Segundo Saturnino *et al.* (2005), um dos problemas da produção do pinhão manso está na colheita, pois a maturação desuniforme dos frutos dificulta a colheita mecanizada, tendo esta que ser realizada em inúmeras etapas, aumentando os gastos com mão-de-obra e, conseqüentemente, levando à redução dos lucros para o produtor.



Figura 5- Frutos em diferentes estádios de maturação em uma mesma planta
Fonte: TOMINAGA *et al.* (2007)

Com relação ao fruto, o mesmo é capsular ovóide com diâmetro de 1,5 a 3,0 cm e constitui-se de uma casca resistente e lenhosa. É trilocular com uma semente em cada cavidade, possui de 2,5 a 4,0 cm de comprimento por 2,0 a 2,5 cm de largura (SATURNINO *et al.*, 2005), e é inicialmente verde, passando a amarelo, castanho e, por fim, preto, quando atinge o estado de maturação (ARRUDA *et al.*, 2004). Segundo Tominaga *et al.* (2007), os frutos contêm normalmente três sementes pretas, mas podem ser encontradas 1, 2 ou 4 sementes e alcançam o máximo do seu desenvolvimento em um período de dois meses.

Os frutos são constituídos de 53 a 62% de sementes e de 38 a 47% de casca, pesando cada um de 1,53 a 2,85 g, conforme o tamanho do fruto (PEIXOTO, 1973, citado por SATURNINO *et al.*, 2005). As sementes e frutos podem ser vistos na Figura 6.



Figura 6- Frutos de pinhão manso.
Fonte: TOMINAGA *et al.* (2007)

Segundo Brasil (1985), citado por Saturnino *et al.* (2005), o fruto do pinhão manso compõe-se de 26,2% de epicarpo e 73,8% de semente como pode-se observar na Tabela 1.

Tabela 1- Composição do fruto do pinhão manso

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

Fonte: SATURNINO *et al.* (2005)

Segundo Makkar e Becker (1997), o baixo teor de umidade nas sementes pode ser, em parte, responsável pela não deterioração destas durante um longo período de tempo e a presença de fatores antinutricionais e tóxicos também pode aumentar a sua vida útil.

A semente, mostrada na Figura 7, é relativamente grande, quando madura, mede de 1,5 a 2 cm de comprimento e de 1,0 a 1,3 cm de largura. O tegumento é rígido, escuro, quebradiço e possui na parte superior uma excrescência carnuda, a carúncula. Debaxo do tegumento existe uma película branca cobrindo a amêndoa. Possui um albúmen abundante, branco e oleaginoso, contendo o embrião provido de dois largos cotilédones achatados. A semente de pinhão, dependendo da variedade, condições ecológicas, tratos culturais entre outros, pode ter de 34 a 45% de casca e 55 a 66% de amêndoa. As sementes contêm ainda 7,2% de água, 37,5% de óleo e 55,3% de açúcar, amido, albuminóides e materiais minerais, sendo 4,8% de cinzas e 4,2% de nitrogênio (ARRUDA *et al.*, 2004).



Figura 7- Semente de pinhão manso.
Fonte: TOMINAGA *et al.* (2007)

Segundo Silveira (1934), citado por Arruda *et al.* (2004), cada semente contém de 27,90 a 37,33% de óleo e o albúmen contém de 5,5 a 7% de umidade e 52,54 a 61,72% de óleo. Para Braga (1976), citado por Arruda *et al.* (2004), as sementes de pinhão manso contêm de 25 a 40% de óleo inodoro e fácil de extrair por pressão.

2.1.2 Origem e distribuição

De acordo com Saturnino *et al.* (2005), sua origem não está bem definida e o conhecimento mais antigo de pinhão manso remota a 70 milhões de anos, segundo assinalam especialistas a respeito de fósseis descobertos na Belém Peruana.

Para Cortesão (1956), a cultura é originária da América do Sul, Brasil ou Antilhas, e foi introduzida em Cabo Verde, África e Índia pelos navegadores portugueses. Tominaga *et al.* (2007) acham mais confiável considerar o México como país de origem e os índios, que migraram da América do Norte para a América do Sul há mais de 10.000 anos, como os responsáveis pela sua distribuição para a Argentina e o Brasil. A expansão da cultura para o continente africano e Sudeste Asiático ocorreu através dos marinheiros portugueses após o descobrimento do Brasil.

Cortesão (1956) relata que a propagação da *Jatropha curcas* se deu, provavelmente, auxiliada pelo fato do homem ter reconhecido e aproveitado suas propriedades medicinais e sua utilidade como cerca, por não ser utilizada como alimentação animal.

Atualmente, o pinhão-manso é conhecido e cultivado em todo o mundo e, de acordo com Openshaw (2000), a cultura do pinhão manso está distribuída, principalmente, nas Américas, África e parte da Ásia; sendo largamente cultivada no México, Nicarágua, Tailândia e partes da Índia. No passado, o arquipélago de Cabo Verde foi importante exportador das sementes da espécie para Portugal. Organizações governamentais e não-

governamentais no sul da África, Brasil, Mali e Nepal e em outros países através da iniciativa privada, têm sido responsáveis pelo cultivo desta cultura.

Segundo Cortesão (1956) e Peixoto (1973), citado em Arruda *et al.* (2004), a *Jatropha curcas* é encontrada em quase todas as regiões intertropicais, ocorrendo em maior escala nas regiões tropicais e temperadas e, em menor extensão, nas regiões frias. Sua distribuição geográfica no Brasil é bastante vasta devido a sua rusticidade, bem como às pragas e doenças, sendo adaptável a condições climáticas muito variáveis, desde o Nordeste até São Paulo e Paraná. Desenvolve-se bem tanto nas regiões tropicais secas como nas zonas equatoriais úmidas, assim como nos terrenos áridos e pedregosos, podendo suportar longos períodos de secas. Encontra-se desde a orla marítima, ao nível do mar, até 1.000 m de altitude, mas se desenvolve mais vigorosamente entre 500 e 800 m.

2.1.3 Produção e produtividade

O pinhão manso é uma planta produtora de óleo com todas as qualidades necessárias para ser transformado em matéria-prima para produção de biodiesel. Além de apresentar boa conservação da semente colhida, é uma cultura de fácil cultivo e pode se desenvolver em pequenas propriedades valorizando a agricultura familiar (PURCINO e DRUMMOND, 1986, citados por ARRUDA *et al.*, 2004).

Estima-se que em 2008 foi plantada no mundo uma área de 900.000 hectares, sendo a maior parte, 760.000 hectares (85%) na Ásia, seguida da África com 120.000 hectares (12%) e América Latina com 20.000 hectares, principalmente, no Brasil. Estima-se que esta plantação chegue a 12,8 milhões de hectares em 2015 sendo África, Gana e Madagascar os maiores produtores e o Brasil o maior produtor da América Latina com 1,3 milhões de hectares (FAO, 2010).

A produtividade do pinhão manso varia em função da região, do método de cultivo e da variedade utilizada, bem como da regularidade pluviométrica e fertilidade do solo.

Em relação à variedade, os dois fatores responsáveis pela produtividade da planta são: quantidade de ramos que saem da base e o número médio de frutos por cacho. Como as inflorescências surgem no ápice de cada ramo, quanto maior o número destes na planta, maior será sua produção (TOMINAGA *et al.*, 2007).

Castro, Devid e Anacleto (2008) estudaram a produtividade de diferentes variedades de pinhão manso. As sementes utilizadas no estudo foram provenientes de três regiões do Paraguai e de Minas Gerais e São Paulo. Os acessos de pinhão manso revelaram ampla variação na produção cuja média foi de 16 kg/ha de grãos no primeiro ano de cultivo.

Para Carnielli (2003), o pinhão manso produz 2 toneladas de óleo por hectare/ano no mínimo. Segundo Brasil (1985), citado por Arruda *et al.* (2004), em espaçamento 3x3, o rendimento anual de óleo pode atingir de 3,0 a 4,0 toneladas/hectare.

Os dados referentes ao rendimento agrícola do pinhão manso permitem o cálculo da quantidade de biodiesel a ser produzido pelas usinas de beneficiamento. A prensagem de uma tonelada de sementes de pinhão manso rende 277,5 litros de biodiesel, considerando-se 34% o teor de óleo e 75% a eficiência na extração (ACHTEN *et al.*, 2008, citado por LAPOLA, PRIESS e BONDEAU, 2009).

2.1.4 Pragas e doenças

O pinhão manso é uma planta pouco atacada por insetos, pois eles são repelidos pelo látex cáustico expelido pela planta quando ferida. Apesar de se tratar de uma planta rústica, fatores como a idade da planta, seu estado nutricional, a época do ano, as condições do clima e a presença de plantas hospedeiras interferem na ocorrência de pragas e doenças nas plantas.

Algumas ocorrências de pragas têm sido verificadas nos cultivos em várias partes do mundo, como (SATURNINO *et al.*, 2005, TOMINAGA *et al.*, 2007):

- Saúva (*Atta sexdens rubropilosa*)- Ataca principalmente as mudas novas;
- Formiga “Rapa-rapa”- Pode matar a planta alimentando-se da casca, da estaca ou da muda da planta;
- Ácaro-branco (*Polyphagotarsonemus latus*)- Ataca a ponta da planta e inibe o desenvolvimento das folhas e as inflorescências, paralisando seu crescimento;
- Ácaro vermelho (*Tetranychus sp.*)- Ataca as folhas maduras e na época da seca, causa a queda prematura das folhas;
- Tripes (*Selenothrips rubrocinctus*) (Figura 8a)- As larvas formam colônias que atacam as folhas e podem causar desflora e definhamento de frutos e sementes;
- Cupim- Destrói a casca e pode matar a planta em qualquer idade;
- Cigarrinha verde (*Empoasca sp.*) (Figura 8b)- Ataca as folhas provocando o amarelecimento e podem causar o abortamento das flores;
- Ninfas e adultos dos percevejos (*Pachycoris sp.*) (Figura 8c)- Danificam os frutos em diversos estágios de desenvolvimento.



Figura 8- Pragas: a- Tripes; b- Cigarrinha verde; c- Ninfas e adultos dos percevejos.

Fonte: TOMINAGA *et al.* (2007)

Peixoto (1973), citado por Arruda *et al.* (2004), defende que de todas as pragas, a mais prejudicial à planta é a cochonilha. O seu ataque, algumas vezes, é tão intenso que cobre por completo o tronco da planta, podendo matá-la.

Entre as doenças que atacam a cultura do pinhão manso pode-se citar (SATURNINO *et al.*, 2005, TOMINAGA *et al.*, 2007):

- Gomose (*Phytophthora sp.*)- Ataca a base do caule com sintomas de podridão e morte de ramos;
- Oídio (*Oidium hevea*) (Figura 9a)- Forma, nas partes verdes do pinhão, uma cobertura branca e pode causar a desflora;
- Ferrugem (Figura 9b) (*Phakopsora jatrophicola*)- Causa a ferrugem nas folhas e pode provocar a desflora das plantas;

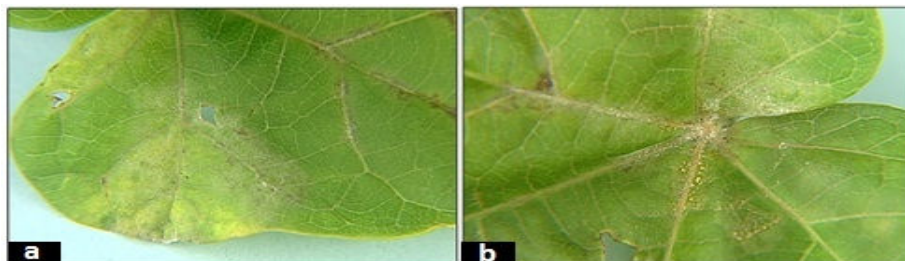


Figura 9- Doenças: a- Oídio; b- Ferrugem.

Fonte: TOMINAGA *et al.* (2007)

2.1.5 Principais usos do pinhão manso

Antes da última guerra mundial, o principal emprego do óleo de pinhão manso era na saboaria e na fabricação de estearina mas, devido às necessidades militares, começaram a serem estudadas outras possíveis utilizações (CORTESÃO, 1956).

O uso do pinhão manso foi bem sucedido com aplicações na conservação do solo pela grande deposição de matéria seca, reduzindo, dessa forma, a erosão e a perda de água por evaporação, evitando enxurradas e enriquecendo o solo com matéria orgânica decomposta (PEIXOTO, 1973, citado por DRUMOND, ARRUDA e ANJOS, 2008). Heller (1996) relata que em Cabo Verde, o pinhão manso foi plantado em áreas áridas para controle de erosão do solo, sendo uma área total de 1.386 ha plantados com árvores, onde 5,4% era pinhão manso.

Como o gado não come as folhas de *Jatropha* devido a sua toxicidade, em muitos países tropicais e subtropicais, este é plantado como cerca viva para marcar limites de propriedades e proteger jardins e campos de animais vagantes.

Várias partes da planta possuem valor medicinal. O látex da planta é usado como cicatrizante, purgante e tem propriedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureu*, *Echerichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans* (THOMAS, 1989, citado por HELLER, 1996).

As raízes são consideradas diuréticas e antileucêmicas e são eficazes também contra o reumatismo e possui poder anti-sifilítico. As folhas são utilizadas para combater doenças de pele. O óleo pode ser aplicado no tratamento de eczema, doenças de pele e reumatismo (NUNES, 2007).

Segundo Peixoto (1973), citado por Arruda *et al.* (2004), as sementes são utilizadas como purgativo, verificando-se casos de intoxicação em crianças e adultos quando ingeridas em excesso, o que pode ser perigoso e até fatal.

O óleo tem um efeito purgativo forte e também é amplamente utilizado para doenças de pele e para aliviar a dor, tais como as causadas por reumatismo (HELLER, 1996).

Há relatos do uso do óleo e sementes do pinhão manso em lamparinas, candeeiros e na iluminação pública. Durante a segunda guerra mundial, na África e na Ásia, o óleo foi usado como combustível em motores (SATURNINO *et al.*, 2005). Ainda, segundo a FAO (2010), o óleo tem sido usado para a produção de sabão nas comunidades rurais. Porém, Saturnino *et al.* (2005) relatam que, como a maioria das comunidades rurais passaram a ter energia elétrica e facilidades de adquirir sabões industriais, o uso do pinhão manso, nas últimas décadas, restringiu-se quase que exclusivamente ao uso medicinal.

A madeira, macia e oca, que é de baixa qualidade, era usada como fonte de lenha nas Ilhas de Cabo Verde devido à falta de outras espécies satisfatórias. Em Madagascar e Uganda, o pinhão manso é usado em fazendas de plantação de baunilha como suporte para esta planta trepadeira (FAO, 2010).

O fruto da *Jatropha curcas* contém um óleo viscoso que pode ser usado na produção de sabão, na indústria de cosméticos e na produção de biocombustível. Também, como toda árvore, ajuda na fixação de carbono atmosférico e intensifica o carbono do solo (OPENSHAW, 2000).

A torta do pinhão manso é um excelente adubo orgânico, rico em nitrogênio, fósforo e potássio e, se destoxicada, pode ser usada como excelente ração para aves, bovinos e peixes (PEIXOTO, 1973, citado por DRUMOND, ARRUDA e ANJOS, 2008).

2.2 Toxicidade

A toxicidade do pinhão manso está relacionada à presença de substâncias alergênicas, antinutricionais e fatores tóxicos que são encontrados em todas as partes da planta.

Segundo Pinto (2000), o termo antinutricional é utilizado para substâncias com capacidade de alterar as possibilidades de aproveitamento dos nutrientes contidos nos alimentos, isto é, os fatores antinutricionais tornam indisponíveis os nutrientes de um alimento ou parte desses, diminuem a sua digestibilidade e afetam sua eficiência nutritiva, podem diminuir o apetite e o desempenho produtivo dos animais e, em alguns casos, ser fatal quando utilizado por longo período.

De acordo com Francis, Makkar e Becker (2001), os fatores antinutricionais podem ser divididos em quatro grupos: a) fatores que afetam a utilização e digestão da proteína, como os inibidores de proteases, taninos e lectinas; b) fatores que afetam a utilização dos minerais, os quais incluem os fitatos, os pigmentos do gossipol, oxalatos e glicosilatos; c) antivitaminas; d) substâncias diversas, como as micotoxinas, mimosina, cianogênicos, nitrato, alcalóides, agentes fotossensibilizantes, fitoestrogênios e saponinas. Outro método de classificação dos fatores antinutricionais é de acordo com sua capacidade em resistir a altas temperaturas sendo termolábeis ou termoestáveis.

Quanto aos alergênicos, a presença destes na semente do pinhão manso torna o seu manuseio incômodo, mas não perigoso; os sintomas como vermelhidão e coceira podem ser desenvolvidos com o simples contato com a pele ou olhos (MENDONÇA e LAVIOLA, 2009). Maciel *et al.* (2009) caracterizaram a primeira proteína alergênica conhecida na semente de *Jatropha curcas*, denominada de Jat c 1 e pertencente à família das albuminas 2S. Segundo os autores, em ratos, este alergênico liga-se ao mastócito induzindo a liberação de histamina causando reações alérgicas.

A semente do pinhão manso contém propriedades tóxicas devido à presença de compostos como a lectina, inibidor de tripsina (IT), saponina, fitato e éster de forbol (EF) (MAKKAR e BECKER, 1997).

Cortesão (1956) relatou que a curcina, também conhecida como lectina, é o principal componente tóxico do pinhão manso, porém, Adolf, Opferkuch e Hecker (1984) mostraram que o principal fator responsável pela toxicidade é o 12-deoxi-16-hidroxiforbol-13-acilato, ésteres de diterpenos denominados ésteres de forbol. Mais tarde, Haas, Sterk e Mittelbach (2002) mostraram a presença de outros cinco diésteres de 12-deoxi-16-hidroxiforbol no óleo oriundo das sementes de *Jatropha curcas*.

Existe uma ampla faixa de variação do teor dos constituintes tóxicos e antinutricionais nas sementes.

Makkar, Aderibigbe e Becker (1998) determinaram os teores de éster de forbol em três plantas coletadas nos quintais das casas de agricultores do México. As sementes de uma das plantas são consumidas com muita frequência por seres humanos e por frangos e o teor de EF encontrado nesta foi de 0,03 mg/g. Na segunda semente, que possui um menor consumo na região, encontrou-se 0,09 mg/g de éster de forbol, e as sementes da terceira variedade, que não é consumida por provocar tontura, diarreia e vômitos, possui um teor de éster de forbol de 2,49 mg/g. De acordo com os autores, isso indica que a aceitação de sementes de *Jatropha* como alimento humano ou animal é afetado diretamente pelo conteúdo de ésteres de forbol.

Uma variedade de *Jatropha curcas* considerada não tóxica, encontrada no México, contém teor de éster de forbol de 0,11 mg/g. Há relatos de que o consumo destas sementes não torradas produz desconforto nos seres humanos e isto pode ser devido à presença de inibidor de tripsina e lectinas. Porém, após a torrefação, as sementes são consumidas como amendoins por seres humanos, sem qualquer efeito adverso aparente. No entanto, os autores ressaltam que deve ser realizado um estudo para verificar a ocorrência de câncer nas áreas onde essas sementes são consumidas, o que pode revelar, se houver, a influência do consumo de baixos níveis de ésteres de forbol como causa da doença (MAKKAR, ADERIBIGBE e BECKER, 1998).

Ferrari *et al.* (2009) analisaram 27 amostras de sementes de *Jatropha curcas* de diferentes zonas agroclimáticas brasileiras e observaram uma variação do teor de éster de forbol de 1,41 a 8,97 mg/g de semente. Ainda no Brasil, um levantamento realizado por Laviola, Mendonça e Ribeiro (2010) no banco de germoplasma da Embrapa Cerrados - DF, dos 11 acessos estudados verificou-se que quatro destes não continham EF e o maior teor deste encontrado nos grãos foi de 5,41 mg/g.

A intoxicação, tanto de humanos quanto de animais, pode ocorrer diretamente com o consumo das sementes do pinhão manso ou indiretamente através do consumo de produtos oriundos de animais contaminados (ADOLF, OPFERKUCH e HECKER, 1984).

Em humanos, há relatos de intoxicação aguda, por ingestão ou contato com as sementes e látex. Em geral, as intoxicações não são graves e os sintomas são relacionados com a irritação gastrointestinal devido à inflamação provocada pelo pinhão manso. A sintomatologia inicia-se após a ingestão de pelo menos 2 ou 3 sementes, com ardência na garganta entre 30 minutos a uma hora após a ingestão, vômitos acentuados, dor abdominal intensa, seguida de diarreia, levando a um quadro de desidratação, o que pode acarretar espasmos musculares, polidipsia, distúrbios respiratórios e hipotensão. Em casos mais raros, de intoxicação severa, ocorrem efeitos no sistema nervoso central e lesão renal. Não existe antídoto para a intoxicação, sendo recomendada lavagem estomacal, caso o tratamento se dê logo após a ingestão (MENDONÇA e LAVIOLA, 2009).

Em 2010, Singh, Singh e Mahendrakar relataram que quatro crianças, na faixa etária de 5 a 8 anos, foram levadas em um hospital da Índia com queixas de vômitos repetidos, dor abdominal e uma das crianças com diarreia e pupilas contraídas. Após relatos de consumo de uma semente preta, os exames mostraram que as crianças haviam ingerido sementes de *Jatropha curcas*. O início dos sintomas ocorreu de 1 a 2 horas após o consumo. As crianças passaram por uma lavagem estomacal e os sintomas desapareceram dentro de 6 a 8 horas.

Shah e Sanmukhani (2010) mostraram que a intoxicação por pinhão manso ocorre com um baixo consumo das sementes e a ação no organismo é rápida. No estudo de caso apresentado pelos autores, 5 adultos consumiram de 1 a 3 sementes de *Jatropha curcas* e dentro de 10 a 15 minutos, todos apresentavam dor abdominal e tiveram vômitos após 30 minutos da ingestão das sementes.

Chomchai *et al.* (2011) fizeram um levantamento dos casos de intoxicação por consumo de sementes de *Jatropha curcas* na Tailândia durante os anos de 2006 e 2009. Os autores verificaram que 75 crianças com idades entre 2 e 14 anos deram entrada em hospitais e os sintomas mais comuns foram náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal. Doze pacientes foram internados devido à desidratação causada por vômitos. Destes, 2 paciente tiveram alterações nas enzimas hepáticas em 24 e 48 horas após a ingestão. Como protocolo, os pacientes foram observados na emergência de 6 a 12 horas e os que apresentaram sintomas persistentes de náusea e vômito foram internados para observação e exames laboratoriais.

Em animais, diversos estudos demonstraram a toxicidade do pinhão manso. Em um estudo de intoxicação por sementes de *Jatropha curcas* realizado por Adam e Magzoub (1975), onze cabras foram alimentadas com sementes de pinhão manso em doses que variaram de 0,25 a 10 g/kg/dia. Todas as dosagens foram consideradas tóxicas com morte dos animais entre 2 e 21 dias de experimento. Os sinais clínicos de intoxicação observados foram a falta de apetite, consumo reduzido de água, diarreia, desidratação e olhos fundos. Exames realizados em animais sacrificados revelaram hemorragia no retículo, rins, baço e coração, congestão e edema no pulmão e excesso de líquido nas cavidades serosas.

Em outro estudo sobre intoxicação com sementes de *Jatropha curcas*, seis bezerros foram alimentados uma única vez com 2,5; 1,0 e 0,25 g de sementes/kg do animal e outros dois bezerros foram alimentados com 0,025 g de sementes/kg do animal durante 14 dias. O início das manifestações tóxicas nos seis bezerros que receberam uma alimentação única com

sementes de pinhão manso foi rápido, sendo que a morte ocorreu em um intervalo de 3 e 19 h após o consumo, nos bezerros que receberam doses de 2,5 e 0,25 g de sementes/kg do animal, respectivamente. Os dois bezerros que receberam doses diárias mais baixas mostraram sinais de intoxicação e morreram dentro de 10 a 14 dias. Foram observados sinais de diarreia, dispnéia, desidratação e perda de condição geral (AHMED e ADAM, 1979).

Goonasekera *et al.* (1995) investigaram o efeito abortivo da *Jatropha curcas* em ratos. Para a realização dos experimentos, as fêmeas fecundadas receberam diferentes doses de extratos dos frutos de pinhão manso, obtidos por extração com metanol, éter de petróleo e diclorometano. Os autores observaram um alto índice de interrupção de gravidez e houve a morte de alguns animais devido à intoxicação. A perda de peso corporal nos animais foi observada durante o período de dosagem com todos os extratos. No entanto, o aumento de peso foi observado após o término dos experimentos.

Gandhi, Cherian e Mulky (1995) estudaram o efeito de um extrato do óleo de pinhão manso em ratos e coelhos. Para os experimentos, o óleo foi obtido do albúmen de pinhão manso e um concentrado tóxico (2,4% do óleo) foi obtido a partir deste por extrações com metanol-água e éter etílico. Nos experimentos com ratos, estes receberam o extrato por via oral em diferentes concentrações. Os autores verificaram que a LD50 para o concentrado tóxico do óleo foi de 6 mL/kg e em doses de 9 e 13 mL/kg houve a morte de todos os animais. Para a verificação do potencial de irritação, o extrato foi aplicado na pele de coelhos e ratos e observou-se edema na região, sendo que no coelho após o edema ocorreu necrose e subsequente regeneração e nos ratos ocorreu a escamação severa e espessamento da pele.

Em um estudo sobre intoxicação de ovinos com a casca da semente de *Jatropha curcas*, realizado por Ferreira, Ramos e Maruo (2009), vinte ovinos foram alimentados com uma ração contendo diferentes concentrações de casca de *Jatropha curcas* por 10 dias. No final do experimento, todos os animais apresentavam condição corporal ruim (Figura 10a), onde foi observada redução de apetite, animal caquético e deprimido, pelagem opaca e quebradiça; diarreia e até a morte de um ovino (Figura 10b).

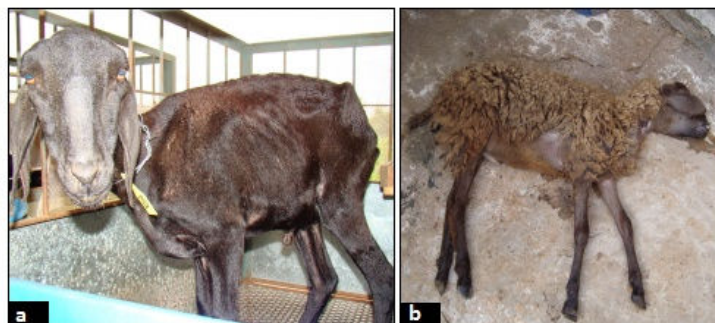


Figura 10- Intoxicação de ovinos: a- Animal raquético e deprimido; b- Ovino morto após ingerir casca da *Jatropha curcas*.

Fonte: FERREIRA, RAMOS e MARUO (2009)

Li *et al.* (2010) analisaram a dose letal de éster de forbol em ratos. Para a realização deste estudo, éster de forbol foi isolado a partir do óleo de *Jatropha curcas* e diferentes doses deste foram ministradas nos animais. Os efeitos foram observados por 19 dias e os autores verificaram que a LD50 foi de 27,34 mg de éster de forbol/kg de massa corporal e o LD5 e LD95 foram 18,87 e 39,62 mg/kg, respectivamente.

Em um trabalho realizado por Ferreira *et al.* (2012), diferentes porcentagens do pericarpo da *Jatropha curcas* contendo 0,38 mg/g de éster de forbol foi incluída na alimentação de ovinos. Os animais foram alimentados durante 23 dias com feno de capim

mombaça adicionado de 15%, 30% e 45% do pericarpo de *Jatropha curcas*. A inclusão do pericarpo na alimentação de ovinos provocou redução no consumo de alimento e no ganho de peso. Todos os animais alimentados com o pericarpo apresentaram intoxicação, caracterizada por diarreia, mucosas desidratadas, alopecia, bradipneia, respiração crepitante e tosse, a partir do 10º dia de tratamento. Houve a morte de 1 animal alimentado com 30% de epicarpo no 15º dia de tratamento. Ao final dos experimentos, as fezes dos animais alimentados com 15% de epicarpo possuíam características mais próximas do normal, enquanto que nos que se alimentaram com 30%, elas se encontravam mais secas e nos de 45% apresentavam-se com volume diminuído, ressecadas e amareladas, refletindo a severidade da desidratação e o comprometimento do sistema digestivo. Após o término dos experimentos, os animais foram sacrificados e durante a avaliação observou-se, em todos os animais, ascite, hidrotórax, hidropericárdio, edema pulmonar, congestão nos intestinos, mesentério e pulmões, aderências entre os pulmões e a parede torácica e aumento dos linfonodos mesentéricos.

Os estudos e relatos acima mostram a toxicidade da *Jatropha curcas*. O inibidor de tripsina e as lectinas são termolábeis e podem ser destruídos por aquecimento úmido, porém os ésteres de forbol são estáveis ao calor e, conseqüentemente, o tratamento térmico não é eficaz para a desintoxicação do pinhão manso (ADERIBIGBE *et al.*, 1997; MAKKAR e BECKER, 1999; AREGHEORE, BECKER e MAKKAR, 2003).

2.2.1 Comparação entre as variedades tóxica e não tóxica

Sabendo-se da toxicidade do pinhão manso e da existência de uma variedade considerada não tóxica, uma comparação foi realizada com o intuito de mostrar as diferenças e semelhanças tanto na produtividade quanto na composição destas sementes.

Makkar *et al.* (1997) avaliaram o teor de éster de forbol e a composição química (proteína, lipídio, cinza e fibra em detergente neutro (FDN)), de albúmens obtidos de sementes coletadas em diferentes países. Os resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2- Teor de éster de forbol e composição do albúmen de diferentes regiões

Origem das sementes	EF (mg/g) ^a	Proteína (%) ^b	Lipídio (%) ^b	FDN (%) ^b	Cinza (%) ^b
Cabo Verde, Fogo	1,50	25,6	55,5	4,7	3,4
Senegal, Santhie Ram	2,27	25,1	50,7	5,62	4,5
Senegal, Nioro Du Rip	1,69	28,9	46,7	5,4	4,4
Ghana, Nyankpala	1,29	31,1	42,9	6,1	4,7
Benin, Cotonou	1,71	30,1	48,2	6,1	4,8
Burkina Faso, Kongoussi	1,71	28,1	51,0	5,3	4,2
Quênia, Kitui	3,32	25,0	52,6	5,8	3,4
Tanzânia, Mombo	1,12	29,3	47,2	4,4	4,9
Burma, Sink Gaing,	0,87	29,6	50,0	5,7	3,9
Índia, Kangra	1,28	24,1	58,4	-	4,1
Índia, Kangra	1,10	23,2	55,0	4,5	4,4
Costa Rica, Rio Grande	1,15	19,0	59,1	-	4,5
México, Vera Cruz	1,02	23,7	56,6	5,5	3,6
Índia, Nasik	1,76	23,0	54,8	5,4	3,8
Nigéria, Ife	-	27,7	53,9	4,1	5,0
México, Papantla	Nd	27,2	58,5	3,8	4,3

a- Teor de éster de forbol; b- Valores calculados em base seca; nd- não detectado.

Fonte: MAKKAR *et al.* (1997)

A tabela 2 mostra uma variação na composição química do albúmen nas diferentes variedades de *Jatropha curcas*, porém, nenhuma relação entre essa variação e a diferença na toxicidade das sementes foi observada.

Makkar, Aderibigbe e Becker (1998) estudaram os potenciais nutritivos e as características tóxicas de variedades de *Jatropha curcas* de Nicarágua e Cabo Verde, ambas cultivadas em Manágua e da variedade não tóxica do México, coletada em Papantla.

Sabendo que o farelo de soja tratado termicamente é utilizado para alimentação com segurança, neste estudo, Makkar, Aderibigbe e Becker (1998) fizeram uma comparação entre os componentes tóxicos e antinutricionais presentes na torta de pinhão manso e no farelo de soja e os resultados são mostrados na Tabela 3.

Makkar, Aderibigbe e Becker (1998) observaram uma atividade de inibidor de tripsina, que variou entre 26,5 mg/g e 21,1 mg/g nas variedades do México e Nicarágua, respectivamente. Estes valores foram maiores do que os encontrados em farelo de soja tratado termicamente, 3,9 mg/g, porém, segundo os autores, os teores de inibidor de tripsina, no farelo de soja sem tratamento, variam de 18,6 a 30 mg/g. Estes dados mostram que, após um tratamento térmico, os valores de IT podem ser reduzidos a níveis próximos ou inferiores aos encontrados no farelo de soja.

Tabela 3- Fatores tóxicos e antinutricionais presentes nas tortas de *Jatropha curcas* e soja

Compostos	Variedades			
	Cabo Verde	Nicarágua	México	Farelo de soja
Inibidor de tripsina (mg/g)	21,3	21,1	26,5	3,9
Lectina (mg/mL) ^a	102	102	51,0	0,32
Saponina (%)	2,6	2,0	3,4	4,7
Fitato (%)	9,4	10,1	8,9	1,5
Éster de forbol (mg/g) ^b	2,70	2,17	0,11	-

^a -1/mínimo de amostra (mg) por mL de ensaio necessário para produzir aglutinação; b- Análise realizada no albúmen das sementes.

Fonte: MAKKAR, ADERIBIGBE e BECKER (1998)

A atividade de lectina nas tortas de *Jatropha curcas* foi maior do que no farelo de soja, porém o farelo utilizado no estudo passou por tratamento térmico, o que pode ter reduzido a atividade deste componente. De acordo com o método da hemaglutinação, utilizado para a determinação da lectina, os valores de 51 e 102 mg/mL são considerados próximos e devido a baixa variação deste composto nas sementes consideradas tóxicas e não tóxicas, os autores concluíram que a lectina não é o principal agente tóxico do pinhão manso (MAKKAR, ADERIBIGBE e BECKER, 1998).

A saponina, segundo os autores, não parece desempenhar um papel importante na toxicidade, pois os teores encontrados no farelo de soja e na variedade não tóxica do pinhão manso foram maiores do que o encontrado nas variedades tóxicas.

O conteúdo de fitato variou entre 8,9 e 10,1%, o que, segundo os autores, são valores considerados altos, porém apesar deste alto índice de fitato poder diminuir a disponibilidade de minerais, especialmente Ca^{2+} e Zn^{2+} , este composto não é considerado o responsável pela toxicidade do pinhão manso.

Ésteres de forbol foram encontrados em alta concentração nos albúmens das sementes tóxicas, enquanto uma quantidade muito baixa foi observada na variedade não tóxica e no farelo de soja este não foi encontrado.

A composição química das sementes (teor de proteína, lipídio, cinza, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina) e a energia bruta das

diferentes variedades estudadas por Makkar, Aderibigbe e Becker (1998) encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4- Composição do albúmen e casca de variedades de *Jatropha curcas*

Composição (%)	Variedade					
	Cabo Verde		Nicarágua		México	
	Albúmen	Casca	Albúmen	Casca	Albúmen	Casca
Composição da semente	62,7	37,3	62,7	37,3	63,5	36,5
Matéria seca	96,6	90,3	96,9	90,4	94,2	89,8
Proteína ^a	22,2	4,3	25,6	4,5	27,2	4,4
Lipídio ^a	57,8	0,7	56,8	1,4	58,5	0,5
Cinza ^a	3,6	6,0	3,6	6,1	4,3	2,8
FDN ^a	3,8	83,9	3,5	85,8	3,8	89,4
FDA ^a	3,0	74,6	3,0	75,6	2,4	78,3
Lignina ^a	0,2	45,1	0,1	47,5	0,0	45,6
Energia bruta (MJ/kg) ^a	30,7	19,3	30,5	19,5	31,1	19,5

a- Valores calculados em base seca;

Fonte: MAKKAR, ADERIBIGBE e BECKER (1998)

A Tabela 4 mostra que o albúmen é composto, principalmente, por lipídio e proteína, enquanto que na casca o principal composto encontrado são as fibras, indicando que esta tem um baixo valor nutricional, porém pode ser uma boa fonte de combustível devido a sua alta energia bruta. Não foram observadas grandes variações na composição química comparando-se a variedade tóxica com a não tóxica.

O baixo teor de umidade da casca e albúmen pode ser responsável, junto com a presença de antinutricionais e toxinas, pela não deterioração das sementes durante um longo período de armazenamento.

No trabalho realizado por Makkar, Aderibigbe e Becker (1998), a composição química das tortas também foi verificada. A torta foi obtida do albúmen em extração do óleo em soxhlet utilizando éter de petróleo como solvente. A extração foi realizada até a torta apresentar teor de óleo menor que 2%. A composição das tortas foi comparada com a de farelo de soja tratado termicamente e os resultados encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5- Composição da torta de diferentes variedades de *Jatropha curcas* e soja

Composição (%)	Variedades			
	Cabo Verde	Nicarágua	México	Farelo de soja
Proteína	56,4	61,2	63,8	45,7
Lipídio	1,5	1,2	1,0	1,8
Cinza	9,6	10,4	9,8	6,4
FDN	9,0	8,1	9,1	17,2
FDA	7,0	6,8	5,7	12,2
Lignina	0,4	0,3	0,1	0,0
Energia bruta (MJ/Kg)	18,2	18,3	18,0	19,4

Valores entre parênteses foram obtidos de torta livre de lipídio.

Fonte: MAKKAR, ADERIBIGBE e BECKER (1998)

O teor de proteína nas tortas variou de 56,4 a 63,8% nas variedades de Cabo verde e do México, respectivamente. Em comparação ao farelo de soja, a torta de *Jatropha curcas*

contém um maior teor de proteína, maior teor de cinza e um menor teor de fibra. E, segundo os autores, os resultados encontrados indicaram que as tortas de pinhão manso contêm um bom perfil de nutrientes quando comparado ao da soja. A variedade não tóxica do México apresentou maior teor de proteína em comparação com as variedades tóxicas.

Em um estudo realizado por Makkar e Becker (1997), carpas e tilápias foram alimentadas com a torta de pinhão manso da variedade tóxica de Cabo Verde. Não houve a morte dos animais, porém foram observados sintomas como perda de equilíbrio e nervosismo.

No mesmo estudo, peixes também foram alimentados por 7 dias com uma ração contendo o óleo desta mesma variedade de *Jatropha curcas*, sendo que o teor de éster de forbol na ração era de 2,5 mg/g. A ração foi toda consumida no primeiro dia e, aproximadamente, uma hora após o consumo de uma das duas primeiras porções da ração, a presença de muco foi observado. O muco encontrava-se na forma de um tubo fino, como se fosse o revestimento da célula intestinal e parecia estar cheio de alimentos, o que sugere irritação da membrana e efeito de toxinas purgativas. Após o primeiro dia, os peixes começaram a rejeitar a ração e o muco foi observado até a total rejeição do alimento. Os peixes estavam lentos e tinham uma tendência a permanecerem juntos. Após 7 dias, os peixes estavam pesando 9% menos que no início dos experimentos.

A fim de observar o papel do éster de forbol na toxicidade do pinhão manso, Makkar e Becker (1997) isolaram este componente do óleo obtido da variedade de Cabo Verde e o adicionou na ração dos peixes de forma que seu teor era de 2 mg/g. Os experimentos foram realizados durante 7 dias e os sintomas dos animais foram os mesmos dos observados nos experimentos onde o óleo foi adicionado à ração.

A variedade não tóxica encontrada no México também foi utilizada na alimentação de carpas no estudo realizado por Makkar e Becker (1997). Para os experimentos, a torta não tóxica foi misturada à ração padrão de modo que 50% da proteína presente na ração fosse proveniente da torta de pinhão manso. Os autores observaram que o ganho médio de massa corporal dos peixes tratados com a ração padrão e a ração contendo a torta foram de 12,3 e 10,1%, respectivamente. Apesar do ganho de peso dos peixes alimentados com a torta tenha sido comparável com os alimentados com a ração de controle, observou-se a presença de muco nas fezes, o que segundo os autores se deve, provavelmente, ao alto teor de lectina. A alimentação com a torta obtida da variedade não tóxica do pinhão manso não gerou nenhum sintoma associado com a alimentação realizada com a torta proveniente da variedade tóxica.

Inibidor de tripsina, lectinas e fitatos podem levar a efeitos adversos, mas não são responsáveis pela toxicidade aguda. Isso foi mais uma vez comprovado por Makkar e Becker (1997) quando a torta de pinhão manso da variedade não tóxica passou por um tratamento térmico (121 °C por 30 min e 66% de umidade) e foi utilizada na alimentação de ratos. O aumento do peso dos ratos alimentados com uma ração contendo a torta tratada termicamente foi significativamente maior do que o dos ratos alimentados com a torta sem passar por tratamento térmico e apenas 7% menor do que o aumento de peso dos ratos alimentados com caseína. Isso ocorreu pois o calor inativou o inibidor da tripsina e as lectinas e também aumentou a digestibilidade da proteína.

Makkar, Martínez-Herrera e Becker (2008) fizeram um estudo comparativo utilizando um genótipo tóxico de *Jatropha curcas*, oriundo de Coatzacoalcos e outro não tóxico, oriundo de Papantla, ambos do México. Os autores analisaram a variação do número de sementes por fruto, parâmetros físicos e composição química das sementes.

Os autores verificaram que 52% dos frutos do genótipo não tóxico continham três sementes enquanto que no outro genótipo, esse percentual foi de 58,3%, como mostrado na Tabela 6 (MAKKAR, MARTINEZ-HERRERA e BECKER, 2008).

Tabela 6- Variação do número de sementes por fruto dos genótipos tóxico e não tóxico

Genótipo	Porcentagem de frutos com:			
	1 semente	2 sementes	3 sementes	4 sementes
Tóxico	14,6	25,7	52,0	7,6
Não- tóxico	8,1	23,4	58,3	10,2

Fonte: MAKKAR, MARTINEZ-HERRERA e BECKER (2008)

A média do peso, teor de óleo e proteína encontrados nas sementes e no albúmen são mostrados na Tabela 7. O teor de éster de forbol foi obtido da torta residual da extração do óleo do albúmen em soxhlet utilizando éter de petróleo como solvente.

Tabela 7- Peso e teor de proteína, óleo e éster de forbol nos genótipos tóxico e não tóxico

	Semente		Albúmen	
	Tóxico	Não- tóxico	Tóxico	Não- tóxico
Peso (g)	0,78	0,72	0,48	0,46
% de óleo	35,32	36,35	57,05	56,70
% Proteína	16,52	17,75	26,67	27,65
Éster de forbol (mg/g) ^a	-	-	0,76	0,035

a- Analisado na torta obtida após a extração do óleo.

Fonte: MAKKAR, MARTINEZ-HERRERA e BECKER (2008)

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que, em uma extração com solvente, a quantidade de óleo obtido a partir de 1 tonelada de semente dos genótipos tóxico e não tóxico é 351 kg e 362 kg de óleo, respectivamente.

Os autores concluíram que a produção de óleo a partir das sementes do genótipo não tóxico não é inferior à do genótipo tóxico, que é amplamente utilizado em todo o mundo. Porém, existe a necessidade de se avaliar o rendimento das sementes em diferentes condições climáticas e acredita-se que os genótipos não tóxicos seriam mais propensos a pragas e doenças, pois não possuem os ésteres de forbol que são compostos de defesa da planta.

Apesar de ter sido observado uma alta produtividade no México, no Brasil, as avaliações agrônômicas, realizadas nos acessos não-tóxicos encontrados, têm verificado que estes materiais apresentam baixo desempenho quando comparados com os genótipos tóxicos (Figura 11a e 11b) (LAVIOLA *et al.*, 2009).

**Figura 11-** Variedades de pinhão manso: a- Genótipo tóxico; b- Genótipo não tóxico.

Fonte: LAVIOLA *et al.*, 2009)

2.2.2 Ésteres de forbol

Esta toxina foi descrita por Adolf, Opferkuch e Hecker (1984) como o principal composto tóxico do pinhão manso. São conhecidos seis diferentes tipos de éster de forbol nesta cultura, todos foram isolados a partir do óleo e possuem a mesma porção diterpeno, ou seja, 12-deoxi-16-hidroxi-forbol (HAAS, STERK e MITTELBAACH, 2002), mostrado na Figura 12.

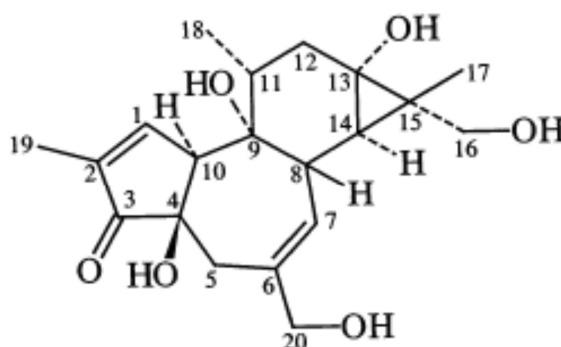


Figura 12- Estrutura molecular do 12-deoxi-16-hidroxi-forbol
Fonte: HAAS, STERK e MITTELBAACH (2002)

Este composto está presente em quase todas as partes da planta sendo que em maior quantidade no albúmen (MAKKAR e BECKER, 2009). Se a ausência do éster de forbol em uma variedade de pinhão manso for comprovada, esta passa a ser chamada de não-tóxica, embora os outros fatores tóxicos e antinutricionais estejam presentes.

De acordo com Goel *et al.* (2007), estes ésteres ocorrem nas famílias Euphorbiaceae e Thymelaceae e podem agir no organismo de forma aguda (resposta inflamatória intensa) ou crônica (indução de tumor).

Segundo Goel *et al.* (2007), além de promotores de tumor, os ésteres de forbol induzem uma notável diversidade de outros efeitos biológicos, como efeitos irritantes da pele, em baixa concentração. Essas reações ocorrem, pois estes compostos imitam a ação do diacilglicerol (DAG), ativador da proteína quinase C (PKC), que regula diferentes vias de tradução de sinais e outras atividades metabólicas, produzindo uma variedade de efeitos biológicos numa vasta gama de organismos.

Os ésteres de forbol são prejudiciais quando ingeridos ou em contato direto com a pele e, em baixas quantidades, este composto causa sérios danos à saúde. Por não serem compostos voláteis, acredita-se que a intoxicação se dá por contato direto ou consumo (GONÇALVES, MENDONÇA e LAVIOLA, 2009).

O éster de forbol, apesar de ser responsável pela toxicidade das sementes de pinhão manso, pode formar biocompostos potentes contra doenças de plantas e vetores de doenças.

As atividades inseticida e pesticida de extratos de *Jatropha curcas*, cujo efeito é atribuído à presença de forbol ésteres, foi relatada para *Helicoverpa armigera* (RATNADASS *et al.*, 2009), *Sesamia calamistis*, *Busseola fusca*, (MENGUAL, 1997, citado por MAKKAR e BECKER, 2009), *Sitophilus zeamays*, *Callosobruchus chinensis* (SOLSOLOY e SOLSOLOY, 1997, citado por MAKKAR e BECKER, 2009), *Manduca sexta*, *Aphis gossyii*, *Pectinophora gossypiella*, *Empoasca biguttula*, *Phthorimaea operculella*, *Culex sp.*, *Periplaneta americana*, *Blatella germanica*, e *Oncopeltus fasciatus* (WINK *et al.*, 1997).

Roach *et al.*, em 2012, mostraram que o extrato rico em éster de forbol poderia ser utilizado, com formulações adequadas, como agentes moluscidas, particularmente contra os caramujos vetores de esquistossomose. Rug e Ruppel (2000) também relataram a atividade

tóxica de extratos de *Jatropha curcas* em caramujo transmissor do *Schistosoma mansoni* e *S. haematobium*. Neste estudo, em comparação com os extratos aquosos, o extrato de metanol apresentou maior toxicidade contra os organismos testados. E, segundo os autores, esta planta pode tornar-se um componente acessível e eficaz no controle da esquistossomose.

2.3 O Óleo do Pinhão Manso

Diversos óleos vegetais têm sido testados para a produção de biodiesel, entre eles o proveniente do pinhão manso, que possui boa viscosidade, quando comparado com a mamona e melhor estabilidade à oxidação que a soja e a palma (TAPANES *et al.*, 2007 citado por TAGLIANI *et al.*, 2010).

Para a extração dos óleos vegetais, a prensagem é um método comumente empregado; as prensas do tipo *expeller* são amplamente utilizadas e apresentam vantagens, como: operação simples; não é necessário mão-de-obra qualificada para seu manuseio; é um sistema facilmente adaptável a diversos tipos de oleaginosas e pode ser instalado em pequenas propriedades rurais. Porém, este processo tem a característica de deixar um residual de óleo na torta (SINGH e BARGALE, 2000).

Outros métodos de extração utilizados fazem uso de solvente orgânico, fluido supercrítico ou o processo denominado misto, que se refere à combinação do sistema de prensagem com o sistema de extração por solvente. Esse processo pode ser utilizado em larga escala e ser adaptado para vários tipos de oleaginosas.

Pereira, Coelho e Mendes (2011) extraíram o óleo de pinhão manso por prensagem e soxhlet. Na extração por prensagem, o rendimento de óleo obtido das sementes foi de 16,7% enquanto que na extração em soxhlet, por 4 h, o rendimento foi de 39,6% utilizando-se hexano como solvente e de 42,6% quando o solvente utilizado foi o etanol.

Vários trabalhos foram encontrados na literatura envolvendo processos de separação de ácidos graxos e compostos presentes no óleo do pinhão-manso. A Tabela 8 mostra o percentual dos principais ácidos graxos encontrados no óleo em diferentes trabalhos.

Tabela 8- Principais ácidos graxos presentes no óleo do pinhão manso

Oléico	Principais ácidos graxos (%)			Referência
	Linoléico	Palmítico	Estearico	
45,60	39,00	11,80	2,51	Martínez-Herrera <i>et al.</i> (2006) ^a
42,30	35,48	14,69	7,04	Araújo, Moura e Chaves (2007) ^a
23,94	59,48	13,52	3,06	Teixeira (1987) ^b
28,74	52,22	15,21	2,79	Teixeira (1987) ^c
41,28	37,75	14,65	4,43	Pereira, Coelho e Mendes (2011) ^d
34,83	37,87	12,61	5,57	Pereira, Coelho e Mendes (2011) ^e
42,93	33,75	13,03	5,32	Pereira, Coelho e Mendes (2011) ^f
37,49	39,10	14,14	4,31	Pereira, Coelho e Mendes (2011) ^g
36,50	42,10	13,40	6,40	Makkar e Becker (2009) ^h
41,00	35,30	15,30	6,60	Makkar e Becker (2009) ⁱ

a - Sementes de diferentes regiões; b- Fruto verde; c- Fruto maduro; d- Extração por prensagem; e- Extração por Soxhlet usando hexano; f- Extração por Soxhlet usando etanol ; g- Extração por fluido supercrítico, condição operacional de 40 °C à pressão de 200 bar; h- Variedade não tóxica; i- Variedade tóxica.

Fonte: Teixeira (1987); Araújo, Moura e Chaves (2007); Martínez-Herrera *et al.* (2006); Makkar e Becker (2009); Pereira, Coelho e Mendes (2011)

As características do óleo podem mudar conforme o estágio de maturação das sementes, da variedade, das condições climáticas das regiões de cultivo e método de extração utilizado (TEIXEIRA, 1987; MARTÍNEZ-HERRERA *et al.*, 2006; PEREIRA, 2009).

2.4 Torta Residual Proveniente da Extração do Óleo

Da industrialização do pinhão manso obtém-se, como produto principal, o óleo e, como co-produto, a torta. Mendonça e Laviola (2009) afirmaram que no Brasil há mais de 15 mil hectares plantados com pinhão manso, com potencial de produção de mais de 30 mil toneladas de grãos/ano, o que gera na extração do óleo uma produção de, aproximadamente, 19,5 mil toneladas/ano de torta.

O co-produto, obtido com a extração do óleo das sementes de pinhão manso, constitui excelente adubo orgânico, rico em nitrogênio, fósforo e potássio (HELLER, 1996) e, além disso, a torta também contém um alto valor nutricional.

Um estudo que compara a composição química da torta obtida de duas variedades de pinhão manso em diferentes métodos foi realizado por Aderibigbe *et al.* (1997) e os resultados encontrados podem ser vistos na Tabela 9.

Tabela 9- Composição química da torta obtida de diferentes variedades e por diferentes métodos de extração do óleo

Composição Química (%)	Método de obtenção da torta			
	Cabo verde		Nicarágua	
	Soxhlet	Prensa	Soxhlet	Prensa
Proteína	56,4	45,8	61,2	46,6
Lipídio	1,5	23,2	1,2	24,9
Cinza	9,6	9,2	10,4	9,0
FDN ^a	9,0	7,0	8,1	6,2

a- Fibra detergente neutro

Fonte: ADERIBIGBE *et al.* (1997)

Neste trabalho, pode-se observar que a composição da torta pode variar de acordo com o método de obtenção e da variedade da semente utilizada, sendo os maiores teores de proteína obtidos na extração em soxhlet.

A variação da composição da torta, em função do método de obtenção, também pode ser verificado no trabalho realizado por Rakshit *et al.* (2008) onde as sementes passaram por dois diferentes processos. No primeiro procedimento, parte das sementes inteiras foi prensada e posteriormente extraída em soxhlet e, no segundo, as sementes foram descascadas e os albúmens moídos foram extraídos em soxhlet. Ambas as extrações em soxhlet foram feitas utilizando hexano como solvente. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10- Composição da torta obtida por diferentes processos

Composição Química (%)	Método de obtenção da torta	
	Prensa + Soxhlet	Soxhlet
Proteína	22,1	60,3
Lipídio	0,8	0,6
Cinza	10,2	9,0
Fibra bruta	14,1	4,0

Fonte: RAKSHIT *et al.* (2008)

Como pode-se observar na Tabela 10, a torta obtida da semente inteira por prensagem e posterior extração em soxhlet contém um teor de proteína inferior à torta obtida através do albúmen por soxhlet, isso ocorreu pois a casca contém um alto teor de fibra (86,4%), ao contrário do albúmen cujo principal constituinte é o óleo (60,8%) que foi removido na extração (MAKKAR, ADERIBIGBE e BECKER, 1998; SATURNINO *et al.*, 2005).

Xiao e Zhang (2011) também fizeram um estudo da composição química da torta obtida por prensagem e extração em soxhlet e os resultados encontrados são mostrados na Tabela 11.

Pode-se observar, na Tabela 11, uma variação no teor de proteína de 45,3% e 58,6% para a mesma variedade de pinhão manso, porém com a torta obtida por diferentes métodos. Na torta obtida por prensagem, o teor residual de óleo foi de 16,1%, enquanto que na torta obtida pelo óleo extraído por soxhlet esse teor foi de apenas 2,5%.

Tabela 11- Composição química da torta obtida por diferentes métodos de extração

Composição Química (%)	Método de obtenção da torta	
	Soxhlet- éter de petróleo	Prensa
Proteína	58,6	45,3
Lipídio	2,5	16,1
Cinza	10,3	10,4
FDN ^a	9,1	9,2

a- Fibra detergente neutro

Fonte: XIAO e ZHANG (2011)

A quantidade de aminoácidos essenciais presentes no pinhão manso foi avaliada por Makkar, Aderibigbe e Becker (1998) e comparada com os valores encontrados na semente de soja. Com exceção da lisina, todos os outros presentes na torta de *Jatropha curcas* são encontrados em maior quantidade do que a sugerida pela FAO em uma refeição para crianças de 3 a 5 anos de idade, como mostrado na Tabela 12.

Tabela 12- Comparação da composição de aminoácidos essenciais de torta de *Jatropha*

Aminoácidos essenciais	Variedades			Soja	FAO
	Tóxica	Tóxica	Não tóxica		
Cistina	2,24	1,76	1,58	1,64	2,50 ^a
Metionina	1,91	1,56	1,76	1,39	
Valina	5,19	5,24	5,30	4,72	3,50
Isoleucina	4,53	4,46	4,85	3,98	2,80
Leucina	6,94	7,03	7,50	7,61	6,60
Tirosina	2,99	2,79	3,78	4,94	6,30 ^b
Fenilalanina	4,34	4,52	4,89	5,76	
Histidina	3,30	3,20	3,08	3,03	1,90
Lisina	4,28	3,74	3,40	6,84	5,80
Treonina	3,96	3,71	3,59	3,85	3,40
Triptofano	1,31	1,23	-	0,88	1,10

a- cistina + metionina; b- tirosina + fenilalanina

Fonte: MAKKAR, ADERIBIGBE e BECKER (1998)

Em um trabalho realizado por Martínez-Herrera *et al.* (2006), os valores de aminoácidos essenciais em quatro variedades de pinhão manso de diferentes regiões do México mostraram um comportamento similar aos valores presentes na Tabela 11.

Xiao e Zhang (2011) observaram que em ambas as tortas obtidas por prensagem ou extração em soxhlet, além da lisina, a cistina também se encontrava em quantidade menor do que a indicada na referência da FAO.

Apesar do alto valor nutricional da torta, seu uso para alimentação animal ainda não é possível devido à sua toxicidade. De acordo com Makkar e Becker (2009), em média, 70% de todos os ésteres de forbol são removidos no óleo e o restante é encontrado na torta.

No estudo realizado por Makkar e Becker (1997), a torta foi obtida da extração de óleo do albúmen utilizando-se éter de petróleo como solvente, o percentual de óleo resultante na torta foi menor que 0,8%, porém 28% do total de éster de forbol continuou presente na torta de pinhão manso. Isto mostra que uma quantidade significativa de ésteres de forbol está presente neste co-produto mesmo este estando livre de óleo, o que contradiz afirmações que todos os ésteres de forbol são extraídos com a fração de óleo. A presença destes ésteres de forbol na torta de *Jatropha curcas* pode ser responsável pela não aceitação de uma alimentação rica em farinha de pinhão manso por animais ou por causar toxicidade.

Makkar *et al.* (1997) avaliaram a concentração dos compostos tóxicos e antinutricionais nas tortas provenientes de vários países. Neste estudo, as tortas foram obtidas pela extração em soxhlet utilizando o albúmen, os resultados encontram-se na Tabela 13.

Como pode-se verificar na análise da Tabela 13, o inibidor de tripsina variou de 18,4 a 27,5 mg/g; semelhantemente a este, as variações também foram significativas para saponinas e fitato. Não foram encontrados ésteres de forbol na torta obtida das sementes coletadas no México e a torta com maior índice deste foi a do Quênia com 3,32 mg/g.

Tabela 13- Fatores tóxicos de torta de pinhão manso proveniente de vários países

Origem	TI (mg/g)	Lectina ^b 1/(mg/mL)	Saponina (%)	Fitato (%)	Éster de forbol (mg/g)
Cabo Verde, Fogo	27,3	0,85	1,82	7,2	1,50
Senegal, Santhie Ram	23,6	0,85	2,21	8,2	2,27
Senegal, Nioro Du Rip	21,6	0,85	1,98	8,1	1,69
Ghana, Nyankpala	22,2	6,85	2,25	7,8	1,29
Benin, Cotonou	21,8	0,85	2,04	8,4	1,71
Burkina Faso	22,8	0,85	1,91	8,2	1,71
Quênia, Kitui	24,9	0,85	2,67	6,2	3,32
Tanzânia, Mombo	24,4	0,85	2,58	8,6	1,12
Burma, Sink Gaing,	25,3	0,85	2,04	7,5	0,87
Índia, Kangra	24,7	6,85	2,39	8,2	1,10
Índia, Kangra	27,5	6,85	2,02	8,2	1,28
Costa Rica, Rio Grande	26,3	6,85	2,72	9,6	1,15
México, Vera Cruz	24,5	6,85	2,06	8,6	1,02
Índia, Nasik	24,7	0,85	2,01	8,6	1,76
Cabo Verde ^a	21,3	2,88	2,60	9,4	2,17
Nicarágua, Managua	21,1	2,88	2,0	10,1	2,70
Nigéria, Ife	18,4	-	2,0	7,2	-
Cabo Verde, Fogo	26,5	1,7	3,4	8,9	nd

a- Variedade de Cabo Verde cultivada em Managua na Nicarágua; ^b-inverso do mínimo de amostra (mg) por mL de ensaio necessário para produzir aglutinação; nd- não detectado.

Fonte: MAKKAR *et al.* (1997)

Xiao e Zhang (2011) também fizeram um estudo comparativo em relação à composição dos constituintes tóxicos e antinutricionais na torta de *Jatropha curcas* obtida por diferentes métodos de extração do óleo. As sementes foram descascadas e depois de moído, o albúmen passou por dois diferentes métodos de extração do óleo, sendo eles prensagem e extração em soxhlet utilizando éter de petróleo como solvente. Os teores dos componentes tóxicos encontrados na torta de pinhão manso encontram-se na Tabela 14.

De acordo com os autores, os baixos teores de lectina e inibidor de tripsina na torta obtida por prensagem ocorreu devido à temperatura elevada (120 °C) utilizada nesse processo. O teor de éster de forbol, no entanto, pouco foi alterado nos diferentes métodos.

Tabela 14- Toxicidade da torta obtida por diferentes métodos de extração de óleo

Compostos tóxicos	Método de obtenção da torta	
	Soxhlet- éter de petróleo	Prensa
IT (mg/g) ^a	27,3	2,7
Lectina (mg/mL) ^b	38,8	1,5
Saponina (%)	2,9	2,6
Fitato (%)	11,1	11,6
Éster de forbol (mg/g)	3,1	2,9

a- inibidor de tripsina; b- inverso do mínimo de amostra (mg) por mL de ensaio necessário para produzir aglutinação.

Fonte: XIAO e ZHANG (2011)

2.5 Processos de Destoxificação

Como visto anteriormente, a torta de pinhão manso possui um alto valor nutricional, porém não pode ser aproveitada na alimentação devido à presença de fatores tóxicos e antinutricionais. A fim de se obter uma matéria prima, disponível em grande quantidade, como fonte de proteína, vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de remoção da toxicidade da torta.

Aderibigbe *et al.* (1997) avaliaram a influência de diferentes tratamentos térmicos em compostos antinutricionais da torta de pinhão manso. Neste estudo, as sementes da variedade de Cabo Verde, cultivada na Nicarágua, foram descascadas e os albúmens moídos, a torta foi obtida por prensagem (TP) e extração em soxhlet usando como solvente éter de petróleo (TS). No tratamento 1, adicionou-se água nas tortas TP e TS para a formação de uma pasta com 67% de umidade, em seguida colocou as amostras em um forno à temperatura de 100 °C por períodos de tempo que variaram de 10 a 90 minutos. A amostra foi então deixada em um freezer por 6 horas e liofilizada. Já no tratamento 2, um procedimento semelhante ao mencionado acima foi utilizado, porém as amostras TP e TS com uma umidade de 80% foram aquecidas a 130 °C e 160 °C durante 0, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos. No tratamento 3, as amostras passaram por um aquecimento da torta seca de 160 °C com intervalos de tempo de 20 a 120 minutos. No tratamento 4, as amostras que passaram pelo tratamento 1 com aquecimento de 100 °C durante 60 minutos passaram por um novo aquecimento de até 120 minutos resultando em uma combinação de tratamentos úmido e seco.

Os autores analisaram os teores de inibidor de tripsina (IT), saponina, fitato e lectina nas tortas que passaram pelos diferentes tratamentos. Em relação ao IT, os autores observaram que no tratamento 1, o melhor tempo para a sua remoção foi de 60 minutos. No segundo tratamento, com 80% de umidade, em ambas as tortas houve uma redução drástica do IT em 30 minutos de tratamento, sendo que na temperatura de 160 °C houve uma maior redução, sendo os teores finais de 1,1% e 0,8% na TP e TS, respectivamente. No aquecimento da torta

seca observou-se uma menor redução no teor de IT com o tempo, sendo que em 120 minutos de tratamento os valores encontrados foram 3,6 e 4,7%, na TP e TS, respectivamente. No tratamento 4, os autores também observaram a remoção dos IT após 60 minutos de tratamento. De acordo com os resultados, os autores concluíram que o IT pode ser parcialmente ou completamente desnaturada quando exposta a temperaturas elevadas.

Apesar de ser conhecida por ser termolábil, o teor de lectina tendia a aumentar com os tratamentos na torta. Segundo os autores, a maior aglutinação observada no aquecimento pode ser devido a alguns fatores como: presença de certas substâncias que aumentam com o tratamento térmico e que imitam a ação da lectina; presença de substâncias que inibem a ação de lectinas na torta não aquecida, sendo que nas amostras aquecidas estas porções se tornam inativas; presença de lectinas na forma ligada na torta não tratada e liberação destas com o tratamento térmico. Apesar do aumento no teor de lectina, a atividade observada na torta de *Jatropha curcas* tratada foi o mesmo encontrado no farelo de soja, 12,5 mg/mL.

Nenhum tratamento teve efeito sobre o teor de saponina na torta. Os valores obtidos neste trabalho mostraram a presença de níveis elevados de fitato que podem diminuir a disponibilidade de minerais, porém nenhum dos tratamentos térmicos estudados reduziu o nível de fitato. Alguns dos resultados obtidos são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15- Degradação ruminal de proteína, teores de IT, saponina, lectina e fitato

Amostras	DRP* (% N total)	Inibidor de tripsina (mg/g)	Saponina (%)	Lectina (mg/mL)*	Fitato (%)
TP	37,7	18,9	na	na	na
TS	43,3	21,3	2,6	66,7	9,4
TP ^a	66,5	4,5	na	50	na
TP ^b	55,2	4,5	na	na	na
TP ^{b'}	57,8	2,9	na	50	na
TP ^c	60,3	1,1	na	na	na
TP ^{c'}	57,0	0,4	na	50	na
TS ^a	67,4	5,8	2,5	12,5	8,7
TS ^b	73,3	3,8	2,6	12,5	9,8
TS ^{b'}	73,4	1,2	2,6	12,5	9,2
TS ^c	71,9	0,8	2,6	12,5	na
TS ^{c'}	72,1	0,3	2,6	12,5	9,4
TP ^d	55,8	0,4	na	na	na
TS ^d	51,1	2,5	2,5	12,5	9,8

*Degradação ruminal de proteína; ^a- amostra obtida pelo tratamento 1 (100°C, 60 min). ^b- amostra obtida pelo tratamento 2 (130 °C, 30 min). ^{b'}- amostra obtida pelo tratamento 2 (130 °C, 60 min). ^c- amostra obtida pelo tratamento 2 (160 °C, 30 min). ^{c'}- amostra obtida pelo tratamento 2 (160 °C, 60 min). ^d- amostra obtida pelo tratamento 4 (100 °C, 60 min; 160 °C, 30 min). na- não analisado. * mínimo de amostra (mg) por mL de ensaio necessário para produzir aglutinação.

Fonte: ADERIBIGBE *et al.* (1997)

Já Makkar e Becker (1999) utilizaram variedades não tóxicas de *Jatropha curcas L.* para alimentação de ratos e peixes. Neste trabalho, foram colhidos 5 kg de semente de pinhão manso, da região de Vera Cruz, no México. As sementes foram descascadas e o óleo dos albúmens foi extraído em extrator de soxhlet, usando como solvente éter de petróleo. Após a extração, a torta obtida foi dividida em 4 amostras. Uma das amostras não passou por nenhum tratamento e foi denominada amostra 'a'; as outras três amostras foram autoclavadas a 121 °C e a 66% de umidade, cada uma com um período de tempo diferente (15, 30 e 45 minutos) e, em seguida, foram liofilizadas e então denominadas de amostras 'b', 'c' e 'd',

respectivamente. Os teores de lectina e inibidor de tripsina foram analisados e os resultados encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16- Lectina e inibidor de tripsina presente nas amostras

	Amostra 'a'	Amostra 'b'	Amostra 'c'	Amostra 'd'
Lectina (mg/mL) ^a	51	1,2	0,21	nd
Inibidor de tripsina ^b	24,8	8,3	4,2	1,3

nd- Não detectado; ^a- inverso da quantidade mínima de torta (mg) por mL de ensaio para produzir aglutinação; b- mg de tripsina inibida/g amostra.

Fonte: MAKKAR e BECKER (1999)

Observa-se na Tabela 16 que, após 30 e 45 minutos de aquecimento da torta de *Jatropha curcas*, a lectina e o inibidor de tripsina apresentaram atividades drasticamente reduzidas. Depois de 15 minutos de aquecimento, a atividade da lectina no resíduo era desprezível e a atividade de inibidor de tripsina residual era de 34%.

Para a realização do experimento com ratos, estes foram previamente pesados e colocados individualmente em gaiolas. Foram formulados três diferentes rações utilizadas para a alimentação dos animais por 7 dias, a primeira contendo 10% de proteína oriunda de caseína e a segunda e a terceira contendo 10% de proteína das amostras 'a' e 'c', respectivamente. O peso dos ratos foi monitorado e sua variação encontra-se na Figura 13.

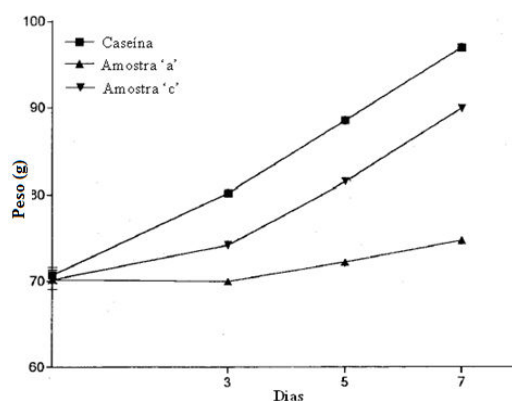


Figura 13- Variação do peso dos ratos alimentados com diferentes rações

Fonte: MAKKAR e BECKER (1999)

Makkar e Becker (1999) observaram que, ao término da experiência, a média do peso dos ratos alimentados com ração contendo amostra 'a' e amostra 'c' foi 23% e 7%, respectivamente, abaixo do peso dos ratos alimentados com caseína.

O consumo da ração contendo torta de pinhão manso aquecida não diferenciou significativamente do consumo da ração com caseína, mas a ingestão de ração contendo torta sem aquecimento foi 21% menor do que o observado nos animais alimentados com a caseína e o coeficiente de eficácia protéica (PER), ou seja, ganho de peso (g) pela quantidade de proteína ingerida (g), foi de 1,29, 3,02 e 3,52 para as rações 'a', 'c' e com caseína, respectivamente.

Segundo os autores, a redução do crescimento dos ratos que se alimentaram com torta tratada em relação aos que consumiram caseína, ocorreu devido a utilização de menores quantidades de proteína. E para os ratos que consumiram a torta sem aquecimento, a redução do ganho de peso foi devido tanto a ingestão reduzida de proteínas quanto ao baixo PER. O

maior consumo de ração e PER das proteínas nos animais alimentados com a torta 'c' foi devido à inativação de inibidor de tripsina e de lectina e o melhor aproveitamento da proteína pode também ser devido ao aumento da sua digestibilidade com o tratamento térmico.

Já para a alimentação das carpas, um total de 25 peixes foi dividido em 5 grupos, em aquários, denominados grupos 1, 2, 3, 4 e 5. Os peixes foram pesados individualmente no primeiro dia da experiência e cada um foi marcado através de sua barbatana. Os grupos foram alimentados com uma ração cuja formulação encontra-se na Tabela 17.

Tabela 17- Ingredientes e composição das rações utilizadas na alimentação dos peixes

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Ingredientes (%)					
Ração de peixe	50	25	25	25	25
Torta de <i>Jatropha</i>	-	23	23	23	23
Ração de trigo	42	42	42	42	42
Óleo de soja	4	6	6	6	6
Vitaminas	2	2	2	2	2
Minerais	2	2	2	2	2
Composição química (%)^a					
Proteína	35,7	35,3	35,6	35,6	35,5
Lipídio	9,4	9,2	8,9	9,0	9,3
FDN	4,0	4,2	4,0	3,9	4,3
Cinza	10,0	9,5	9,0	9,1	9,4
Energia bruta (MJ/kg)	17,7	17,3	17,8	17,1	17,6

^a - Em base seca

Fonte: MAKKAR e BECKER (1999)

O grupo 1 foi designado como grupo de controle, pois recebeu alimentação sem presença da torta de pinhão manso. No grupo 2, a torta misturada à ração foi a amostra 'a', e os grupos 3, 4 e 5 receberam em sua ração as amostras 'b', 'c' e 'd', respectivamente.

As carpas foram alimentadas com as rações durante 35 dias e as mudanças de peso dos peixes são mostradas na Figura 14.

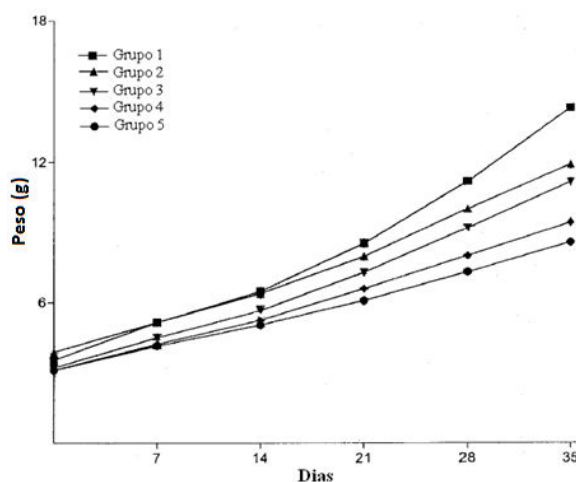


Figura 14- Variação do peso dos peixes alimentados com diferentes rações

Fonte: MAKKAR e BECKER (1999)

Ao contrário dos ratos, o aumento do peso dos peixes alimentados com torta de pinhão manso tratada termicamente foi menor do que no grupo que se alimentou de torta não tratada e o crescimento diminuiu com o aumento no tempo de tratamento térmico.

A lectina e o inibidor de tripsina são conhecidos por diminuir o desempenho de ganho de peso dos animais. Para Makkar e Becker (1999), as carpas usadas neste experimento não são sensíveis aos efeitos da lectina e do inibidor de tripsina. Como as carpas estavam em estágio inicial de crescimento, os autores acreditam que, nesta fase, pode haver algum mecanismo que compense o elevado teor destes antinutricionais visto que outros trabalhos mostram que carpas na fase adulta são sensíveis a estas substâncias.

Aregheore, Becker e Makkar (2003) estudaram diferentes tratamentos para a extração do éster de forbol e lectina presentes na torta de pinhão-manso. Para este estudo, as sementes da variedade de Cabo Verde, cultivada na Nicarágua, foram descascadas, moídas e o óleo extraído em soxhlet usando o éter de petróleo como solvente.

No tratamento 1, adicionou-se água destilada na torta para a obtenção de uma pasta com 66% de umidade, o frasco com a torta foi tampado com papel alumínio, a torta foi então autoclavada a 121 °C por 30 minutos, liofilizada e moída para posterior análise. No tratamento 2, a torta foi autoclavada a 121 °C por 30 minutos e lavada 4 vezes com metanol. No tratamento 3, adicionou-se à torta hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e esta foi autoclavada a 121 °C por 30 minutos e moída. No tratamento 4, adicionou-se à torta hidróxido de sódio 4% e, em seguida, esta foi lavada 2 vezes com metanol. Já no tratamento 5, adicionou-se à torta hidróxido de sódio 4% e, em seguida, esta foi lavada 4 vezes com água destilada.

A análise de éster de forbol foi realizada de acordo com Makkar *et al.* (1997). Cinco sementes pinhão manso foram pesadas e maceradas com uma pequena quantidade de areia utilizando um almofariz e pistilo. Adicionou-se 20 mL de diclorometano e a mistura foi macerada novamente durante, aproximadamente, 5 min. O material foi deixado sedimentar e a fase líquida foi filtrada. Retornou-se com o resíduo, retido no papel de filtro, para o almofariz com cerca de 20 ml de diclorometano e este foi macerado por 5 min. A fase líquida foi novamente filtrada e o resíduo recolhido do papel de filtro. Este procedimento de maceração foi repetido mais três vezes e o filtrado de todas as cinco extrações foram reunidos. O resíduo sólido foi submetido a ondas de ultrassons (105 W) durante 3 minutos na presença de cerca de 50 mL de diclorometano. Este foi, em seguida, filtrado e, este filtrado foi misturado com os filtrados obtidos a partir das últimas cinco extrações. O filtrado foi seco à vácuo na temperatura de 40 °C. O resíduo seco foi dissolvido em 5 mL de tetrahydrofurano, passado através de uma membrana de vidro de 0,2 µm e injetado (20 µL) no HPLC.

O HPLC utilizado consistiu de uma bomba (Hewlett Packard 1050), um detector de arranjo de fotodiodo (Hewlett Packard 1040a) e um injetor automático (Spark Holland-Basic Marathon). A coluna analítica utilizada foi de fase reversa C18 (LiChrospher 100, Merck) 250x4 mm d.i. (LiChroCART; Merck) protegida por uma pré-coluna contendo o mesmo material da coluna principal. Foram utilizados três solventes: (A) 1,75 ml de ácido o-fosfórico (85%) em 1 L de água destilada, (B) acetonitrila, e (C) tetrahydrofurano. O gradiente usado foi: 60% de A e 40% B no início, redução de A para 50% e aumento de B para 50% nos 30 min seguintes, diminuição de A para 25% e aumento de B para 75% nos próximos 15 min e aumento de B para 100% nos 15 min seguintes. A coluna foi então lavada com o C (aumentando para 100% de C nos 15 min seguintes) e, em seguida, a coluna foi novamente ajustada para as condições de partida (60% de A e 40% de B). A separação foi efetuada à temperatura ambiente e a taxa de fluxo foi de 1,3 mL/min. Os ésteres de forbol (4 picos) apareceram entre 41 e 48 min. Os picos foram integrados a 280 nm e os resultados expressos como equivalentes de forbol-12-miristato-13-acetato, que apareceu entre 52 e 53 min.

Na Tabela 18 encontram-se os resultados obtidos para o teor de éster de forbol e lectina nos diferentes tratamentos. A torta oriunda somente da extração, ou seja, sem passar por nenhum tratamento foi denominada de controle.

Os autores observaram que a torta que passou somente por tratamento térmico (tratamento 1) manteve a mesma concentração de éster de forbol da torta de controle, o que indica que este não é desnaturado por calor. Já a lectina apresentou concentração significativamente menor que a torta de controle.

Nos tratamentos químicos, a presença de lectina não foi observada e a concentração de éster de forbol foi reduzida, obtendo-se melhores resultados nos tratamentos 2 e 3.4 com extração de 95% e 93%, respectivamente.

Tabela 18- Teor de éster de forbol e lectina em diferentes tratamentos de destoxificação da torta de *Jatropha curcas*

Tratamentos	Éster de forbol (mg/g)	Lectina ^a (mg/ml)
Controle	1,78	102
1-121°C/30 min.	1,78	1,17
2-121°C/30 min + lavar 4 vezes com metanol	0,09	ne
3.1-NaOH 2,5% + NaOCl 10%	0,22	ne
3.2-NaOH 3,0% + NaOCl 10%	0,22	ne
3.3-NaOH 3,5% + NaOCl 10%	0,14	ne
3.4-NaOH 4,0% + NaOCl 10%	0,13	ne
3.5-NaOH 2,0%	0,89	ne
3.6-NaOH 2,5%	0,34	ne
3.7-NaOH 3,0%	0,29	ne
3.8-NaOH 3,5%	0,18	ne
3.9-NaOH 2,0% + NaOCl 15%	0,46	ne
3.10-NaOH 2,0% + NaOCl 20%	0,47	ne
3.11-NaOH 2,0% + NaOCl 25%	0,24	ne
4-NaOH 4,0% + lavar 2 vezes com metanol	nd	ne
5-NaOH 4,0% + lavar 4 vezes com água	nd	ne

^a - inverso da quantidade mínima da amostra em (mg/ml) do ensaio para produzir aglutinação; nd- não determinado; ne- não encontrado.

Fonte: AREGHEORE, BECKER e MAKKAR (2003)

A torta tratada com metanol teve um teor de proteína pura de 68%, enquanto a tratada com NaOH 4%+ NaOCl 10% teve 55%. Segundo os autores, o aumento do teor de proteína da torta tratada com metanol pode ter ocorrido devido a maior perda de componentes não protéicos nesta torta.

Aregheore, Becker e Makkar (2003) testaram a torta destoxificada em 20 ratos, separados em grupos e foram alimentados por 7 dias com rações contendo 16% de torta tratada e ração de controle, onde a caseína foi utilizada como fonte de proteína. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 19.

Os autores observaram um grande aumento de peso nos ratos alimentados com ração contendo caseína. Os ratos alimentados com a torta 1, onde a concentração de éster de forbol foi a menor obtida com os tratamentos, houve um aumento no peso dos ratos e estes não apresentaram sintomas de doenças, o que mostra que a concentração de 0,09 mg/g de éster é uma quantidade tolerável por estes animais. Já na torta 2, os resultados sugerem que a concentração de 0,13 mg/g de éster de forbol presentes na torta, que compunham 16% da ração, tem um efeito significativo na ingestão de alimentos e na taxa de crescimento de ratos.

A baixa ingestão alimentar dos ratos que se alimentaram com as tortas 2, 3 e 4 pode ser atribuída, segundo os autores, a fatores tais como gosto e cheiro pois, estas tortas continham um forte odor de NaOH.

Tabela 19- Resultado de experimentos com ratos

Rações	Peso inicial (g)	Peso Final (g)	Ingestão diária de alimentos (g)
Caseína	84,6 ± 2,2	129 ± 5,3	14,1 ± 1,8
Torta 1	85,8 ± 12,5	102,5 ± 15,3	13,6 ± 0,8
Torta 2	75,5 ± 10,1	56,8 ± 10,2	2,9 ± 0,5
Torta 3	84,9 ± 2,0	86,6 ± 2,0	2,1 ± 0,0
Torta 4	84,4 ± 2,1	79,8 ± 1,9	2,2 ± 0,1

Torta 1- 121 °C/30 min + lavar 4 vezes com metanol; Torta 2- NaOH 4,0% + NaOCl 10%; Torta 3- NaOH 4,0% + lavar 2 vezes com metanol; Torta 4- NaOH 4,0% + lavar 4 vezes com água.

Fonte: AREGHEORE, BECKER e MAKKAR (2003)

Martínez-Herrera *et al.* (2006) realizaram um estudo de destoxificação da torta de pinhão manso com amostras de regiões do México com características climáticas diferentes: Castillo de Teayo, no estado de Veracruz, com 1200 mm de chuva no ano; Pueblillo, Papantla, no estado de Veracruz, com 1500 mm de chuva anual; Coatzacoalcos, no estado de Veracruz, com 2500 mm de chuva no ano e Yautepec, no estado de Morelos, com 902 mm de chuva no ano. Trinta sementes de cada variedade foram colhidas, limpas a mão usando uma toalha de papel, rachadas individualmente sem dano e os albúmens foram moídos e desengordurados em um aparato de Soxhlet por 16 h, usando como solvente éter de petróleo.

Após a extração, as tortas, provenientes de cada variedade, foram secas e divididas em cinco porções iguais. A primeira porção, chamada de ‘a’ não passou por nenhum tratamento. A segunda porção, chamada ‘b’, foi tratada com uma solução 0,07% de NaHCO₃ em uma proporção de 1:5 (p/v) e colocada imediatamente a 121 °C por 25 minutos. Após a autoclavagem, a amostra foi liofilizada. A terceira porção foi extraída com etanol 90% por 2 horas em uma proporção de 1:10 (p/v) com uma agitação constante, o solvente foi removido por filtração e o resíduo foi liofilizado e designado de amostra ‘c’. A quarta porção recebeu tratamento similar a porção ‘c’ e depois misturou-se nesta uma solução 0,07% de NaHCO₃ na proporção de 1:5 (p/v), a porção foi então autoclavada a 121°C por 25 minutos, liofilizada para remoção da água residual e recebeu o nome de ‘d’. A quinta porção, designada de porção ‘e’, foi saturada com solução de NaHCO₃ 0,07% na proporção de 1:5 (p/v) por 30 minutos e, após isto, foi filtrada em um filtro de papel. O resíduo obtido foi então liofilizado e subsequentemente irradiado a 10 kGy. O teor de éster de forbol foi analisado de acordo com Makkar *et al.* (1997) utilizando-se metanol como solvente de extração.

Os resultados obtidos nos tratamentos para os fatores antinutricionais e tóxico encontram-se na Tabela 20. Martínez-Herrera *et al.* (2006) observaram que os IT eram facilmente inativados através do aquecimento úmido a 121 °C por 25 minutos, tratamentos ‘b’ e ‘d’. Os IT interferem no funcionamento das enzimas proteolíticas pancreáticas em não ruminantes, causando redução de crescimento e da digestibilidade das proteínas.

O nível de fitato não foi afetado pelos tratamentos ‘b’, ‘c’, e ‘d’ e só ligeiramente por ‘e’, como observado na Tabela 20. A quantidade de saponinas encontradas nas amostras foi baixa, porém, deve-se considerar que o método usado por Martínez-Herrera *et al.* (2006), para determinação de saponina não era específico. O tratamento ‘d’ diminuiu o conteúdo de saponina em, aproximadamente, 50%, o que segundo os autores, provavelmente, se deu devido a extração junto com o etanol, já que a saponina não é destruída por aquecimento.

Tabela 20- Efeito de diferentes tratamentos nos fatores antinutricionais, tóxicos e na digestibilidade de proteínas da torta de pinhão manso de diferentes regiões do México

Amostra	TI (mg/g) amostra ^f	Fitato (%)	Saponina (g/100g)	Lectina (mg/mL) ^g	EF (mg/g) ^h	DP (%) ⁱ
1 ^a	36,0	8,76	2,14	1,46	nd	80,6
1b	0,68	9,88	1,96	12,2	nd	86,4
1c	34,5	10,1	1,40	1,51	nd	79,7
1d	0,58	11,9	1,29	12,2	nd	87,2
1e	37,8	7,81	1,30	6,79	nd	80,9
2 ^a	36,4	8,54	2,41	0,35	nd	79,6
2b	0,53	9,11	2,77	5,89	nd	87,0
2c	34,5	10,5	1,51	0,38	nd	80,3
2d	0,58	11,4	1,18	11,8	nd	87,2
2e	33,2	7,07	1,37	6,75	nd	80,4
3 ^a	34,0	8,55	2,85	1,41	3,85	78,6
3b	0,66	8,92	3,00	11,6	0,95	87,1
3c	30,6	10,7	1,42	0,75	0,16	80,0
3d	0,57	12,0	1,07	23,2	0,08	87,0
3e	34,3	6,04	1,72	6,78	3,16	79,7
4 ^a	33,1	9,27	2,32	1,46	nd	79,6
4b	0,54	9,72	2,98	5,99	nd	87,3
4c	36,0	10,4	1,06	1,52	nd	80,5
4d	0,61	11,3	1,14	22,2	nd	86,5
4e	36,5	8,12	1,76	6,82	nd	79,5

1.Castillo de Teayo.; 2. Pueblillo, Papantla; 3. Coatzacoalcos; 4. Yautepec, Mor; a - amostra não tratada; b - NaHCO₃ 121°C/25 min; c - etanol 90%; d - etanol 90% + NaHCO₃ 121 °C/25 min; e - irradiação; nd, não detectado; ^f - mg de tripsina inibida/g amostra; ^g -mínimo de amostra (mg) por mL de ensaio necessário para produzir aglutinação; ^h - Éster de forbol; ⁱ - Digestibilidade de proteína.

Fonte: MARTÍNEZ-HERRERA *et al.* (2006)

A torta proveniente das sementes da região de Pueblillo teve a maior atividade de lectina (0,35 mg/mL). O tratamento ‘d’ foi o melhor na remoção deste componente, reduzindo a atividade da lectina em todas as amostras testadas.

De acordo com a Tabela 20, os ésteres de forbol só foram encontrados na amostra proveniente de Coatzacoalcos e em alta concentração, 3,85 mg/g. Para esta toxina, Martínez-Herrera *et al.* (2006) observaram que os tratamentos ‘c’ e ‘d’ diminuíram sua concentração em 97,9% e 95,8%, respectivamente, considerando que tratamentos ‘b’ e ‘e’ resultaram em uma redução de só 75,3% e 17,9%, respectivamente. Segundo Martínez-Herrera *et al.* (2006), o éster de forbol é moderadamente polar e, por isso, apresentam afinidade com etanol e metanol. O uso de etanol, segundo estes autores, tem a vantagem de ser não tóxico quando comparado com o metanol.

Como observado por estes autores, o tratamento ‘e’, com radiação, poderia servir como um possível método de processo adicional para inativar ou remover certos fatores antinutricionais. Porém, a baixa irradiação, níveis de dose de 10 kGy, mostraram só um baixo efeito nos níveis de éster de forbol, fitato, saponina e lectina nas amostras de *Jatropha curcas*. Um aumento nos níveis de irradiação poderia ter um efeito mais pronunciado.

Os valores mais baixos da digestibilidade da proteína *in vitro* foram observados para as amostras sem tratamento. Esta baixa digestibilidade pode ser devido ao elevado teor de inibidores de tripsina presentes nas tortas de *Jatropha curcas*. Todas as amostras que foram submetidas aos tratamentos b e d tiveram uma melhora na sua digestibilidade em cerca de 6-7%. Esse aumento, observado após os tratamentos térmicos, é atribuído à desnaturação da proteína e inativação dos inibidores de tripsina (MARTÍNEZ-HERRERA *et al.*, 2006).

As amostras tratadas acima não foram testadas em animais para verificar sua viabilidade. Porém, segundo Mendonça e Laviola (2009), os métodos utilizados possuem um elevado custo, o que pode inviabilizá-los economicamente.

Chivandi *et al.* (2006) submetem a torta a um processo de destoxificação e observaram os efeitos da utilização desta na alimentação de porcos. Para a realização do experimento, sementes foram descascadas e os albúmens foram moídos. O material passou por um processo de extração que ocorreu durante 8 horas a uma temperatura de 30 °C, usando como solvente o hexano. A torta foi, então, seca a sombra e passou por uma extração com etanol (95%) a uma temperatura de 35 °C. Em seguida, esta foi aquecida a 90 °C durante 30 minutos para recuperação do etanol. A torta foi então umedecida até 20% e extrusada para a redução do óleo residual. A torta foi então re-extraída com hexano a 30 °C. Após estes processos, a torta foi aquecida a uma temperatura de 121 °C por 30 minutos e posta ao ar para secar. O éster de forbol foi determinado de acordo com Makkar *et al.* (1997).

Segundo os autores, a torta de *Jatropha curcas* teve resultado negativo para a presença de saponinas e lectinas. Para o éster de forbol, o residual na torta foi de 0,80 mg/g sendo a concentração inicial de 6,50 mg/g.

No experimento com animais, 30 porcos foram divididos em 5 grupos, onde cada um foi alimentado com uma ração, durante 4 semanas, com diferentes quantidades de torta de pinhão manso como mostrado na Tabela 21.

Os porcos foram alimentados duas vezes ao dia com um total de 1 kg/dia/animal e esta quantidade foi aumentando semanalmente. Chivandi *et al.* (2006) observaram, a partir do 14º dia de experimento, a ocorrência de diarreia persistente com presença de sangue no 23º dia. Durante a terceira semana, alguns porcos dos grupos 2 e 5 desenvolveram uma irritação de pele particularmente ao redor das orelhas. Houve uma mortalidade de 20% dos porcos ao final do experimento, sendo 1 porco nos grupos 2 e 3 e 2 porcos nos grupos 4 e 5. Os resultados das análises na carcaça dos porcos forneceram características semelhantes. As carcaças estavam pálidas e com presença de úlceras, foram achados pontos de hemorragia e o ceco estava com coágulos de sangue.

Tabela 21- Alguns componentes da ração dos porcos

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Torta na ração (%)	0	1,3	2,5	3,7	5,0
Proteína (%) ^a	0	6,25	12,50	18,75	25,00
Lipídeo (%)	4,61	4,44	4,81	5,00	5,39
Cinza (%)	4,75	5,76	5,02	5,09	5,32

^a- Porcentagem de proteína da ração substituída por proteína de torta de pinhão manso.

Fonte: CHIVANDI *et al.* (2006)

Os autores concluíram que, os efeitos adversos e severos causados nos porcos alimentados com a torta de *Jatropha curcas* indicam que o procedimento de destoxificação não removeu ou neutralizou completamente os fatores tóxicos presentes.

Rakshit *et al.* (2008) estudaram a destoxificação da torta de uma variedade de pinhão manso encontrada na Índia e testaram esta em ratos. Para a obtenção da torta estudada, duas

metodologias foram utilizadas; na primeira, as sementes foram descascadas, os albúmens foram moídos e o óleo extraído com hexano até uma concentração inferior a 1%, a torta resultante foi denominada de torta A. Em outro processo, as sementes inteiras foram prensadas e extraídas também com hexano e denominada de torta B. Para a destoxificação, as tortas A e B foram tratadas com uma solução aquosa de 2% NaOH ou 2% Ca(OH)₂ ambas na proporção de 1:1 (p/v). Após esta adição misturou-se bem as amostras até formar uma pasta grossa e estas foram mantidas por 30 minutos a temperatura ambiente. O material foi então autoclavado a 121 °C por 30 minutos. As tortas foram diluídas em água na proporção de 1:5 (p/v) e mantidas por 1 hora, após isto, estas foram filtradas em um pano de musselina e o resíduo foi seco a 90 °C.

A composição química das tortas obtidas neste estudo encontra-se na Tabela 22. Em suas análises, os autores verificaram que a torta obtida do albúmen das sementes (Torta A) e a torta oriunda de sementes inteiras (Torta B) continham um teor de proteína de 60,3% e 22,1%, respectivamente. Segundo Rakshit *et al.* (2008), essa diferença no teor de proteína ocorreu, principalmente, devido a grande quantidade de casca presente na torta 'b', o que contribuiu para o aumento do teor de fibra nesta torta.

Tabela 22- Composição química das tortas de pinhão manso

Composição (%)	Torta A	Torta B
Proteína	60,3	22,2
Fibra	4,0	14,1
Cinza	9,0	10,2
Lipídeo	0,6	0,8

Fonte: RAKSHIT *et al.* (2008)

O teor de éster de forbol foi determinado de acordo com Makkar *et al.* (1997) utilizando-se metanol como solvente de extração e os resultados encontram-se na Tabela 23.

Pode-se observar que na torta a, o EF presente era de 135 mg% e o melhor método de extração foi obtido com tratamento com NaOH, onde foi observada uma redução de 90% do componente tóxico. Já na torta obtida por sementes inteiras, o teor de éster de forbol, que era inicialmente de 74,0 mg%, foi reduzido em 89% com o tratamento utilizando Ca(OH)₂.

As tortas tratadas com NaOH e Ca(OH)₂ foram testadas em ratos. Neste experimento, 42 ratos foram divididos em 7 grupos e foram alimentados com diferentes rações cuja formulação encontra-se na Tabela 23, sendo que todas as rações foram formuladas para conter 10% de proteína.

Tabela 23- Teor de éster de forbol nas tortas e composição das rações para os ratos

Ingredientes (%)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7
	Caseína	Torta A	Torta B	Torta C	Torta D	Torta E	Torta F
Torta	11,48	17,50	32,08	17,82	17,67	35,77	34,44
Amendoim	10,00	9,91	9,87	9,86	9,86	9,71	9,73
Vitaminas	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sais	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Milho	75,52	69,58	55,17	69,31	69,47	51,51	52,83
EF (mg%)	135,0	74,0	16,0	13,6	8,1	14,0	13,5

Torta C- Torta A tratada com Ca(OH)₂; Torta D- Torta A tratada com NaOH; Torta E- Torta B tratada com Ca(OH)₂; Torta F- Torta B tratada com NaOH; *Teor de éster de forbol das tortas.

Fonte: RAKSHIT *et al.* (2008)

Os ratos foram pesados no início e término dos experimentos e os valores obtidos, juntamente com a quantidade de éster de forbol consumida, encontram-se na Tabela 24.

Tabela 24- Peso dos ratos no início e final do experimento e éster de forbol consumido

Grupo	Amostra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	EF consumido (mg/rato)
1	Caseína	36,5	50,1	0
2	Torta 'a'	36,8	25,7	9,024
3	Torta 'b'	36,5	22,2	1,73
4	Torta 'c'	36,7	28,2	1,087
5	Torta 'd'	36,3	28,5	0,699
6	Torta 'e'	36,8	28,6	0,652
7	Torta 'f'	36,5	27,8	0,830

Torta 'c' - Torta 'a' tratada com Ca(OH)_2 ; Torta 'd' - Torta 'a' tratada com NaOH; Torta 'e' - Torta 'b' tratada com Ca(OH)_2 e; Torta 'f' - Torta 'b' tratada com NaOH

Fonte: RAKSHIT *et al.* (2008)

Rakshit *et al.* (2008) observaram que os ratos alimentados com a ração contendo caseína tiveram um aumento de peso de 13,6 g, por outro lado houve uma perda de peso significativa nos ratos que consumiram as rações que continham a torta. Isso pode ser explicado pelo consumo de alimento, pois os ratos que se alimentaram com a ração contendo caseína, ou seja, os animais do grupo 1, consumiram 5,24 g/dia de ração, enquanto que os animais dos grupos 2 e 3 consumiram 1,84 g/dia e 0,91 g/dia, respectivamente.

Os ratos alimentados com rações contendo a torta não tratada tinham uma menor ingestão de alimento. Porém, os ratos alimentados com Ca(OH)_2 mostraram ingestão alimentar melhor em comparação com ratos alimentados com NaOH.

A mortalidade dos ratos durante o experimento encontra-se na Tabela 25. Os resultados indicaram que a mortalidade dos animais não está somente relacionada à toxicidade do éster de forbol, mas, também, pode ter sido pela quantidade de casca ou componentes antinutricionais presentes na torta b, pois como pode-se observar nas Tabelas 24 e 25, os ratos que consumiram uma maior quantidade de éster de forbol, tiveram um maior tempo de vida em relação ao grupo onde o consumo deste foi menor.

Tabela 25- Mortalidade dos ratos durante o experimento

Grupo	Dias											
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	4	2	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	3	3	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	3
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	2
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	2
7	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1	1	1

Fonte: RAKSHIT *et al.* (2008)

A aparência física dos ratos alimentados com rações cuja torta passou por tratamento era melhor que a dos ratos alimentados com a torta sem nenhum tratamento, porém, nos ratos alimentados com a ração tratada com Ca(OH)_2 , esta era comparável com o grupo alimentado

com caseína, o que indica melhor desempenho do tratamento com Ca(OH)_2 em relação ao tratamento com NaOH . Todos os ratos exibiram dificuldade nas funções motoras e diarreia.

Gaur (2009) avaliou a remoção de EF da torta de pinhão manso utilizando extração em soxhlet e extração assistida por ultrassom, utilizando diferentes solventes puros e em misturas.

Acredita-se que ondas de ultrassom quebram as interações intra-moleculares da amostra sólida. Na utilização deste método para a extração do éster de forbol, a autora utilizou quatro diferentes solventes, sendo eles hexano, metanol, etanol e álcool isopropílico.

Para a extração com solvente puro em ultrassom utilizou-se o hexano. Neste experimento, 10 g de albúmen de pinhão-manso moído foi extraído com 100 mL de hexano em um banho de ultrassom por 30 minutos e a torta gerada foi centrifugada e filtrada. A extração foi repetida por mais 3 vezes e a torta foi seca em temperatura ambiente.

Nos experimentos com misturas de solventes utilizou-se hexano e metanol; hexano e etanol e hexano e isopropanol nas proporções de 9:1, 8:2 e 7:3. Para estes experimentos, 10 g de torta foi extraída em banho ultra-sônico por 30 min com 100 mL de solvente e depois lavada com a mesma mistura de solventes para a remoção do óleo residual.

Para a extração em soxhlet foram realizados quatro experimentos: 1- extração com hexano por 24 horas seguido de duas extrações com metanol 24 horas; 2- extração com hexano por 24 horas seguido de duas extrações com isopropanol por 24 horas; 3- extração com hexano por 24 horas seguido de etanol 48 horas; 4- extração com hexano por 24 horas seguido de metanol 72 horas. Após as extrações, as tortas foram deixadas em tabuleiro até a total evaporação do solvente resultante.

Para a análise de éster de forbol aproximadamente 1 g de torta foi pesado e levado para a centrífuga (3500 rpm) com 5 mL de metanol por 20 min. O sobrenadante foi recolhido e o resíduo foi extraído mais três vezes na centrífuga com 5 mL de metanol. Os extratos foram reunidos e levados ao rotaevaporador até o volume ser reduzido a 1 mL. O extrato concentrado foi filtrado em membrana de 0,2 μm e analisado em um HPLC equipado com um detector de arranjo de fotiodo. Utilizou-se coluna C18 (Microsorb- MV 100-5, 15 cm x 4.6 mm i.d., 5 μm). As fases móveis utilizadas foram: A (20% água) e B (80% acetonitrila). A separação foi efetuada à temperatura de 25 °C em taxa de fluxo de 1 mL/min.

O teor de éster de forbol presente no albúmen moído utilizado para as extrações era de 6,05 mg/g de amostra. Na torta extraída em ultrassom, utilizando hexano puro como solvente, a concentração final de éster de forbol foi de 4,3 mg/g, tendo ocorrido a extração de 29%.

Os resultados obtidos para as misturas de solventes em extração com ultrassom encontram-se na Tabela 26.

Tabela 26- Teor de éster de forbol em extração com ultra-som com diferentes solventes

Solventes	Concentração	Concentração de éster de forbol (mg/g)
Hexano-metanol	9:1	2,10
	8:2	4,80
	7:3	2,85
Hexano-etanol	9:1	2,30
	8:2	2,87
	7:3	2,70
Hexano-isopropanol	9:1	2,93
	8:2	3,07
	7:3	3,03

Fonte: GAUR (2009)

Como pode-se observar na Tabela 26, o melhor resultado foi obtido utilizando como solvente a mistura hexano-metanol na proporção 9:1, com uma redução de 65% do éster de forbol presente na matéria prima. Apesar da redução da toxicidade, Gaur (2009) afirma que a extração assistida com ultra-som não foi eficiente para a destoxificação da torta de *Jatropha curcas*, pois a concentração desejada de 0,11 mg/g de éster de forbol (teor encontrado na variedade de pinhão manso não tóxica do México) não foi alcançada.

Os resultados da extração de éster de forbol obtidos com as extrações em soxhlet encontram-se na Tabela 27.

Tabela 27- Concentração final de éster de forbol em torta extraída no soxhlet

Extração	Éster de forbol (mg/g)
Hexano (24h) + metanol (24h)+ metanol (24h)	0,15
Hexano (24h) + isopropanol (24h) + isopropanol (24h)	1,50
Hexano (24h) + etanol (48h)	0,32
Hexano (24h) + metanol (72h)	0,06

Fonte: GAUR (2009).

Gaur (2009) concluiu que a extração em soxhlet com hexano por 24 horas seguida por metanol por 72 horas foi eficiente na destoxificação da torta de pinhão manso, pois a quantidade final de éster de forbol presente na torta (0,06 mg/g) é menor do que 0,11 mg/g.

O etanol apresentou bons resultados na extração em ultrassom quando utilizado em grande concentração e também na extração em soxhlet com remoção de 95% do éster de forbol presente.

Devappa, Makkar e Becker (2010) estudaram a obtenção de uma fração rica em éster de forbol como um co-produto do óleo de pinhão manso. O concentrado obtido neste componente pode ser utilizado em aplicações agrícolas. Neste estudo, as sementes foram prensadas para a obtenção do óleo e este foi centrifugado para remoção de resíduos. O óleo foi extraído usando metanol; etanol; 2% diclorometano (DCM) em metanol; 2% de tetrahidrofurano (THF) em metanol e 2% DCM e THF em metanol.

O teor de éster de forbol foi determinado de acordo com Makkar *et al.* (1997) utilizando-se metanol como solvente de extração. A porcentagem de éster de forbol extraída com cada solvente e número de extrações encontram-se na Figura 15.

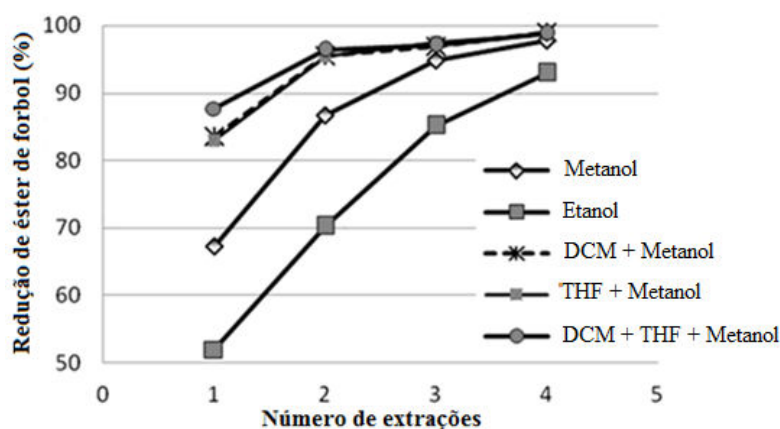


Figura 15- Porcentagem extraída de éster de forbol com os diferentes solventes.

Fonte: DEVAPPA, MAKKAR e BECKER (2010)

Os autores observaram que a mistura de solvente com metanol, DCM e THF, extraiu 87% do éster de forbol na primeira extração, já o metanol misturado ao DCM extraiu 83,5%, o metanol misturado ao THF extraiu 83% e os solventes etanol e metanol extraíram 67,3% e 52%, respectivamente. Para os autores, embora a mistura de solventes tenha sido eficaz na redução do éster de forbol do óleo, eles não são satisfatórios para uso industrial, pois o processo torna a recuperação do solvente complexa. Sendo assim, para a utilização de um único solvente, o metanol teve um melhor desempenho quando comparado com o etanol.

O concentrado de éster de forbol foi testado em caramujos da espécie *Physa fontinalis* e o LD₁₀₀ encontrado foi de 1 mg/L de solução de éster de forbol, o que mostra sua aplicabilidade como pesticida agrícola.

Kumar, Makkar e Becker (2010) também estudaram a destoxificação da torta de pinhão manso. Sementes de *Jatropha curcas* da Índia foram descascadas manualmente e o óleo do albúmen foi extraído em um extrator de Soxhlet usando, como solvente, o éter de petróleo. A torta obtida sofreu tratamento com solvente e, posteriormente, foi autoclavada a 121 °C por 15 minutos. O teor de éster de forbol na torta não tratada de pinhão manso era de 1,8 mg/g. No entanto, após o tratamento, este composto não foi detectado. Inibidor de tripsina e lectina também não estavam presentes na torta tratada e o teor de fitato era de 9,3%.

Foram formuladas três rações para a alimentação de carpas, a ração de controle, isenta de torta de *Jatropha curcas*; a ração de feijão de soja, contendo 510 g de soja por kg de ração; e a torta contendo 381 g/kg de torta de pinhão manso. A formulação das rações utilizadas no estudo encontra-se na Tabela 28.

Tabela 28- Formulação das rações utilizadas na alimentação de carpas

Ingredientes (g/kg)	Rações		
	Controle	Pinhão manso	Soja
Ração de peixe	505	126	126
Farelo de soja	-	-	510
Torta de Pinhão manso	-	381	-
Farelo de trigo	415	368	219
Lisina	-	4	-
Óleo de girassol	40	73	73
Vitamina	20	20	20
Mineral	20	20	20
Fitase (FTU/Kg)	-	500	500

Fonte: KUMAR, MAKKAR e BECKER (2010)

Kumar, Makkar e Becker (2010) observaram uma boa aceitabilidade das rações, o peso dos peixes aumentou 4 a 5 vezes em 6 semanas, os peixes alimentados com a torta de *Jatropha curcas* tiveram um desenvolvimento semelhante aos alimentados com a ração de controle e superior aos alimentados com farelo de soja e não houve morte dos peixes durante o experimento. Logo, o processo de destoxificação foi eficaz comprovando, com a ração utilizada, que a torta de pinhão-manso é um alimento rico em proteína e pode ser utilizada, quando destoxificada na alimentação.

Trabalhos realizados por Kumar *et al.* (2010) e por Kumar *et al.* (2011), onde a torta destoxificada como em Kumar, Makkar e Becker (2010) foi utilizada, verificou-se que a substituição de 50% da proteína de ração de peixe pela oriunda da torta de pinhão manso é uma quantidade ideal para a alimentação de carpa sem sacrificar o crescimento e a saúde dos peixes.

Xiao *et al.* (2011) avaliaram diferentes métodos de destoxificação da torta de pinhão manso em uma variedade encontrada na China. Neste estudo, as sementes foram descascadas e o albúmen triturado foi desengordurado utilizando uma extrusora a 90 °C e, posteriormente, o óleo foi extraído com éter de petróleo. Os métodos de destoxificação utilizados foram: 1) A torta foi tratada com 5 mg/g de celulase e 10 mg/g de pectinase a 50 °C, por 1 hora e o hidrolisado foi centrifugado e, em seguida, liofilizado e denominado de ‘Torta a’; 2) A torta do tratamento 1 foi lavada com metanol 60% a 50 °C por 1 hora e denominada de Torta ‘b’; 3) A torta do tratamento 1 foi lavada com etanol 65% a 50 °C por 1 hora e denominada de Torta ‘c’; 4) A torta foi lavada apenas com metanol 90% por 2 horas a 50 °C e denominada de ‘Torta d’; 5) A torta foi lavada com etanol 90% por 2 horas a 50 °C e denominada de Torta ‘e’. Os solventes utilizados nos tratamentos 2, 3, 4 e 5 foram removidos por centrifugação e o resíduo liofilizado. A torta sem passar por nenhum tratamento foi denominada de controle. Para determinação dos ésteres de forbol por HPLC os autores utilizaram a metodologia descrita por Makkar *et al.* (1997). Os resultados obtidos de toxicidade são mostrados na Tabela 29.

Tabela 29- Efeito dos diferentes tratamentos sobre a toxicidade da torta de pinhão manso

	Tratamentos					
	Controle	Torta a	Torta b	Torta c	Torta d	Torta e
EF (mg/g)	2,88	2,47	0	0	0,98	1,16
IT (mg/g)	3,15	2,93	2,55	2,47	3,09	3,12
Lectina (mg/mL) ^f	3,43	3,41	1,49	1,35	1,46	1,62
Saponina (g/100g)	2,67	2,62	1,14	0,93	1,58	1,46
Fitato (%)	10,04	9,11	7,01	6,85	7,28	8,83

Torta a-Tratamento com enzimas; Tortas b e c- Tratamento com enzimas + metanol 60% e etanol 65%, respectivamente; Tortas d e e- Tratamento com metanol e etanol 90%, respectivamente. IT- inibidor de tripsina; EF- Éster de forbol; ^f -mínimo de amostra (mg) por mL de ensaio necessário para produzir aglutinação

Fonte: XIAO *et al.* (2011)

O teor de EF na torta controle foi de 2,88 mg/g. Os autores evidenciaram que os melhores resultados foram obtidos nas tortas que passaram por tratamento enzimático seguido de tratamento com metanol e etanol. Em ambas as tortas ‘b’ e ‘c’, 100% do EF foi removido. Porém, quando a torta foi tratada somente com enzimas ou com etanol e metanol 90%, o processo não foi eficiente na remoção da toxicidade. Comparando-se a eficiência do metanol e do etanol pode-se afirmar que o melhor resultado foi obtido utilizando-se metanol como solvente de extração.

Para os autores, apesar de 2 dos tratamentos terem removido todo o EF presente na torta, o tratamento de etanol 65% é mais económico e viável do ponto de vista toxicológico do que o tratamento com metanol. Além disso, a ‘torta c’ apresentou um alto teor de proteína (74,86%).

Segundo Mendonça e Laviola (2009), a Embrapa Agroenergia também vem desenvolvendo métodos de destoxificação da torta, focando em processos simples e de baixo custo para serem viáveis economicamente para produtores de pequeno e médio porte.

Em uma das linhas de pesquisa, os estudiosos buscam a identificação de materiais genéticos cujos grãos não apresentem toxidez (éster de forbol) e a posterior incorporação desta característica em cultivares comerciais. Com o mesmo objetivo, a Petrobras, em colaboração com a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, está caracterizando um

banco de germoplasma de pinhão manso a fim de selecionar as melhores variedades para a realização de um melhoramento genético da espécie.

Outra estratégia utilizada na tentativa de destoxificação da torta é por processos biológicos.

Joshi, Mathur e Khare (2011) estudaram a utilização da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* na degradação de éster de forbol da torta de pinhão manso. No experimento, 5 mL de água destilada foram adicionadas a 5 g de torta e a mistura foi autoclavada. Após a preparação do substrato, este foi inoculado e incubado a 30 °C e 65% de umidade. Os autores observaram a completa degradação dos ésteres de forbol em nove dias de experimento.

Kasuya *et al.* (2012) estudaram a bio-destoxificação da torta de pinhão manso. O fungo utilizado no experimento foi o *Pleurotus ostreatus*. Para os experimentos, 1,5 kg da torta foi autoclavada a 121 °C por 2 horas e depois de frio, este substrato foi inoculado com 75 g de miscélio e incubado a 25 °C. Após 15 dias de inoculação, o fungo colonizou completamente o substrato, o que mostra sua capacidade de se desenvolver na presença de ésteres de forbol e fatores antinutricionais. Após 45 dias de incubação houve uma degradação de 99% do éster de forbol presente no substrato. Para o experimento com animais, 4 rações contendo 0, 7, 14 e 20% de torta de pinhão manso foram utilizadas na alimentação de caprinos. As rações foram formuladas para conter uma média de 12% de proteína bruta.

A Tabela 30 mostra a média de ganho de peso diário dos caprinos alimentados com as diferentes rações.

Segundo os autores, a inclusão de 20% de torta de *Jatropha curcas* bio-desintoxicada por *Pleurotus ostreatus* mostrou ser uma promessa como um suplemento alimentar animal, pois não resultou em mudanças nos parâmetros do sangue e não foi observado sintomas clínicos de envenenamento.

Tabela 30- Média de ganho de peso diário dos caprinos

Variável	Quantidade de torta			
	0%	7%	14%	20%
Ganho de peso (g/dia)	58,76	45,34	62,50	83,19

Fonte: KASUYA *et al.* (2012)

Phengnuam e Suntornsuk (2013) investigaram a destoxificação da torta de *Jatropha curcas* por fermentação em estado sólido e submersa, utilizando duas estirpes de *Bacillus*, sendo elas *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. Na fermentação em estado sólido utilizou-se 10 g de torta com um teor de umidade de 70%, durante 7 dias, enquanto que a fermentação submersa foram utilizados 10 g de torta em 100 mL de água destilada durante 5 dias. As fermentações foram incubadas nas condições ótimas de cada estirpe. Após o período de incubação, os resultados mostraram que a *Bacillus licheniformis* com a fermentação submersa foi o método mais eficaz na degradação dos compostos tóxicos e antinutricionais. O teor de éster de forbol, fitato e inibidor de tripsina foram reduzidos em 62%, 42% e 75%, respectivamente, enquanto que a lectina não foi modificada.

A revisão bibliográfica mostrou o alto valor nutricional da torta de *Jatropha curcas* e o potencial para utilização deste co-produto na alimentação de animal. A toxicidade do pinhão manso é devido à presença de fatores tóxicos e antinutricionais, sendo principal componente tóxico é o éster de forbol. Os trabalhos vistos mostraram que a lectina e o inibidor de tripsina são removidos por tratamento térmico, mas o éster de forbol não é afetado por este. Muitos trabalhos estão sendo realizados na tentativa de destoxificar a torta de pinhão manso, na maioria deles os métodos químicos são empregados. Os solventes etanol, metanol, NaOH e NaHCO₃ se mostraram eficientes na extração do éster de forbol.

Os trabalhos discutidos na revisão bibliográfica mostraram que o método químico pode ser usado na remoção do éster de forbol. Porém, os métodos obtidos se mostraram complexos, com diferentes etapas no processo, alto tempo de extração ou grande volume de solvente empregado. Diante disso, este trabalho avalia a influência de diferentes condições de extração de EF com os solventes que já se mostraram promissores na destoxificação da torta.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

As sementes de pinhão manso, cultivadas na região da cidade de Janaúba, foram doadas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e armazenadas em saco plástico na temperatura ambiente até a preparação das amostras. A Figura 16 mostra as sementes cedidas para os experimentos.



Figura 16- Sementes de pinhão manso doadas pela EPAMIG

As sementes de pinhão manso foram prensadas para a obtenção da torta utilizando-se uma extratora radial tubular, com capacidade de 50 kg/h (SCOTTECH), mostrada na Figura 17.



Figura 17- Prensa utilizada para a obtenção da torta

Após a prensagem, armazenou-se o material em saco plástico, na geladeira, para posteriores experimentos. O fluxograma do processo de obtenção da torta é apresentado na Figura 18.

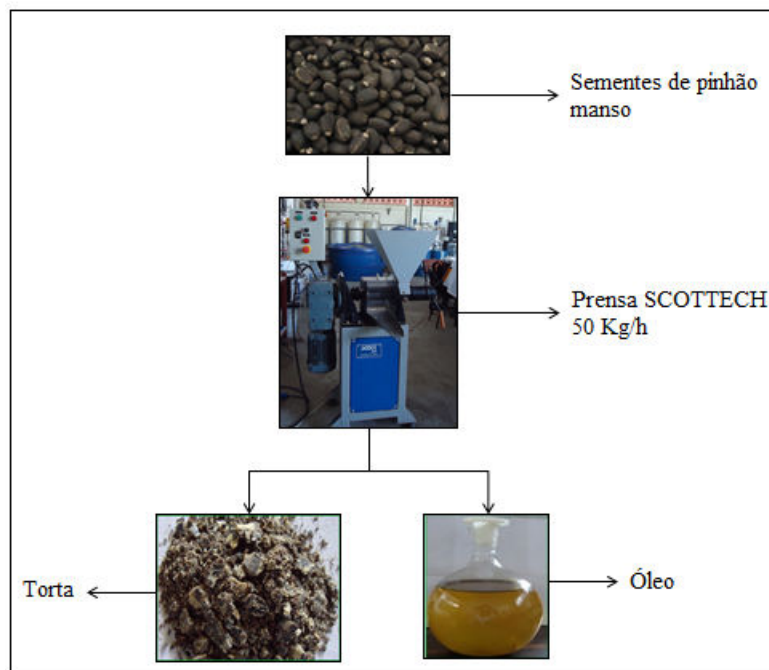


Figura 18- Fluxograma de obtenção da torta

Os solventes utilizados foram de grau analítico adquiridos da VETEC QUÍMICA FINA LTDA (Rio de Janeiro, Brasil), sendo eles:

Ácido clorídrico; Ácido sulfúrico; Bicarbonato de sódio; Etanol; Hidróxido de sódio; Metanol.

3.2 Metodologia Experimental

O método utilizado na tentativa de destoxificação da torta de pinhão manso foi a extração em soxhlet. A extração ocorreu em diferentes condições de operação como tempo, solvente e relação de soluto/solvente (sol/solv). Nesta etapa experimental, colocou-se a torta em um cartucho de celulose e este foi alimentado no extrator. Utilizou-se o cartucho número 43 e o tamanho do balão foi determinado de acordo com a relação soluto/solvente desejada. O equipamento foi aquecido em manta (Fisatom 300-52E) e permaneceu sob refluxo por um tempo pré determinado.

No processo de extração em soxhlet o solvente contido no balão evapora e se condensa sobre o material sólido devido à presença de um condensador no final do extrator. A passagem do solvente pelo material faz com que ocorra a extração. O solvente, juntamente com as substâncias extraídas, retorna para o balão e entra novamente em ebulição recomeçando o ciclo.

Após a extração, o material contido no balão seguiu para o rota-evaporador (Fisatom, modelo, 803; Bomba de vácuo: Newpump, NOF-650) para a recuperação do solvente e concentração do soluto. O material extraído e concentrado no balão após a remoção do solvente foi pesado (Shimadzu, AUX-220) e armazenado na geladeira. A torta tratada com solvente orgânico foi seca em temperatura ambiente e a tratada com solvente inorgânico foi seca em estufa a 40 °C (Sterilifer, SX1.2 DTME) e após a secagem todas as tortas foram armazenadas em frascos âmbar na geladeira para posteriores análises. A Figura 19 mostra a realização do tratamento proposto para a destoxificação da torta e a Figura 20 mostra o fluxograma completo do processo.

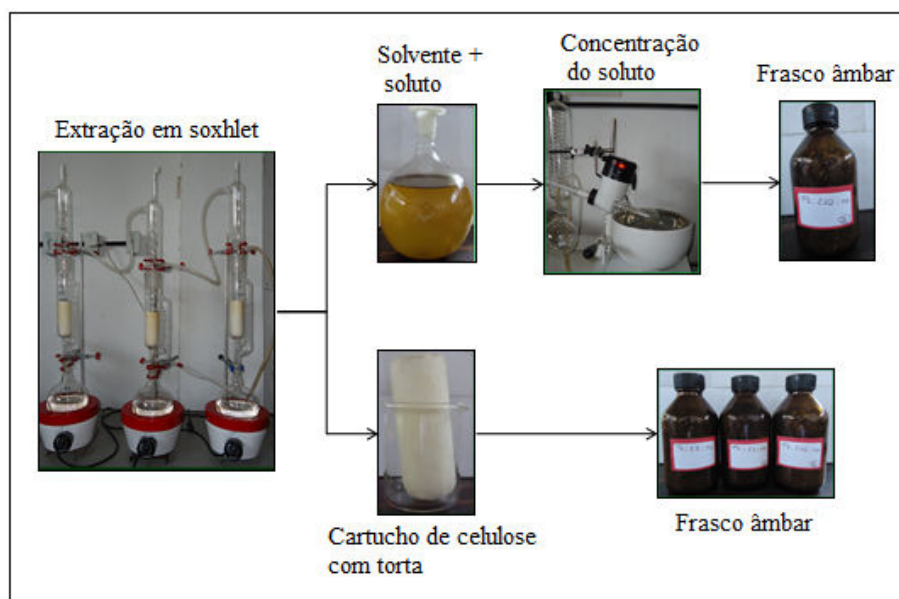


Figura 19- Tratamento de destoxificação

Os solventes utilizados na extração do éster de forbol foram escolhidos por apresentarem bons resultados em trabalhos disponíveis na literatura, sendo eles, metanol, etanol e solução 0,07% bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (AREGHEORE, BECKER e MAKKAR, 2003; MARTÍNEZ-HERRERA et al., 2006; GAUR, 2009; DEVAPPA, MAKKAR e BECKER, 2010). O etanol também foi escolhido pois como o método patenteado de destoxificação utiliza metanol como solvente (KUMAR, MAKKAR e BECKER, 2010) e este é considerado tóxico, viu-se a necessidade de estudar um solvente com propriedades parecidas, porém atóxico.

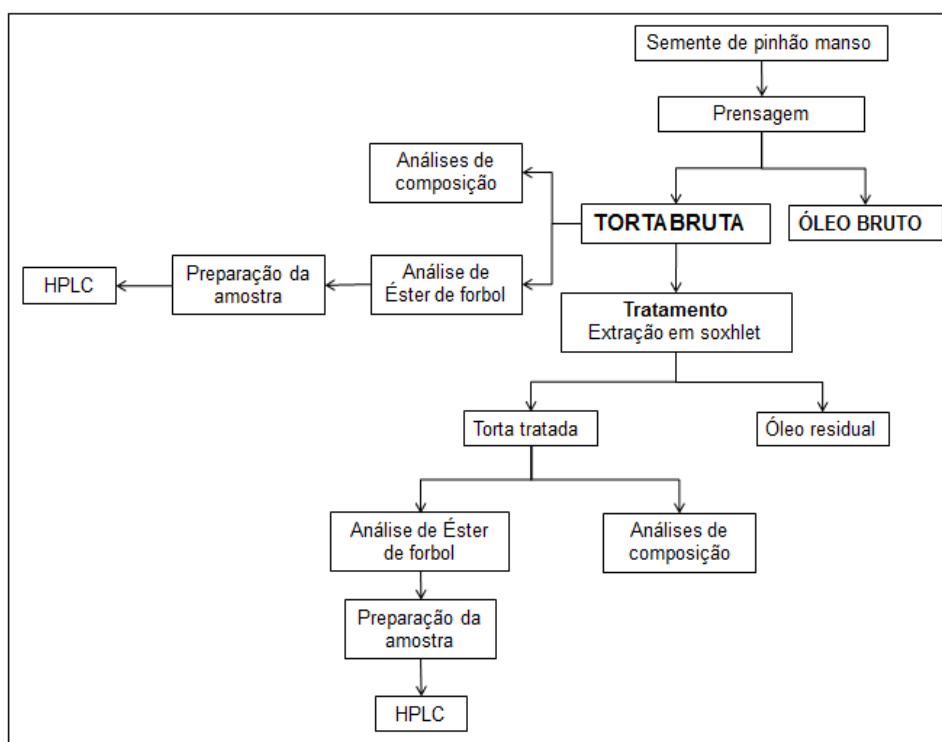


Figura 20- Fluxograma completo do processo utilizado.

3.2.1 Preparação da amostra para análise de teor de éster de forbol

As amostras foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Makkar *et al.* (1997) utilizando-se metanol como solvente. Aproximadamente, 2 g de cada amostra de torta (bruta e quimicamente tratadas) foram pesadas e maceradas com almofariz e pistilo por 5 minutos em 20 mL de metanol. Deixou-se o material sedimentar e a fase líquida foi filtrada. O resíduo, retido no papel de filtro, foi levado novamente para o almofariz, foi macerado por 5 minutos com 20 mL de metanol e a fase líquida foi novamente filtrada. Este procedimento de extração foi repetido mais três vezes e os filtrados de todas as cinco extrações foram reunidos. O resíduo das extrações foi levado a um banho de ultrassom durante 3 minutos na presença de 50 mL de metanol. Após o ultrassom, filtrou-se o material e o filtrado foi reunido com o obtido nas cinco extrações anteriores. Secou-se o solvente em rota-evaporador a 40 °C e pesou-se o material resultante. O material seco foi dissolvido em metanol de HPLC, filtrado em um filtro de vidro de 0,2 µm e injetado (20 µL) em HPLC.

3.3 Planejamento Experimental

Os experimentos foram realizados de acordo com o delineamento central composto rotacional (DCCR) onde as variáveis independentes estudadas foram: tempo de extração variando de 1 a 8 h, razão de mistura soluto/solvente variando de 1:5 a 1:15 p/v e na extração utilizando metanol e etanol como solventes avaliou-se, também, a concentração de metanol na mistura com etanol variando de 0 a 100%.

Utiliza-se planejamento de experimento quando se tem vários fatores (variáveis independentes) que influenciam no processo e, por isso, as mesmas são alteradas de forma a se avaliar seus efeitos sobre as respostas. A escolha do planejamento adequado depende do número de variáveis envolvidas no processo. No caso de duas ou três variáveis é mais recomendado o uso de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) que é constituído por 2^k pontos fatoriais (± 1) + $2k$ pontos axiais ($\pm \alpha$) + um número arbitrário de pontos centrais (0), sendo k o número de variáveis (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Os níveis dos pontos axiais foram definidos de acordo com Rodrigues e Iemma (2009) e são do tipo $\alpha = (2^k)^{1/4}$, onde k é o número de variáveis estudadas.

As variáveis dependentes foram analisadas estatisticamente para um nível de confiança de 95% e a superfície de resposta foi obtida pela equação de segunda ordem (Eq. 1).

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^k a_i x_i + \sum_{i=1}^k a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k a_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

Onde:

y = resposta predita;

x = fatores;

a_0, a_i, a_{ii}, a_{ij} = coeficientes de regressão da interseção, lineares, quadráticos e de interação, respectivamente.

O desvio relativo médio entre os valores preditos e experimentais foram calculados através da Equação 2.

$$D = \frac{100}{n} \times \sum_{i=1}^n \frac{|Ve - Vp|}{Ve} \quad (2)$$

Onde:

D= desvio;

n= número de ensaios;

Ve= valor experimental;

Vp= valor predito pelo modelo.

3.3.1 Planejamento utilizando mistura de metanol e etanol como solvente

Para os experimentos onde o solvente estudado foi a mistura de etanol e metanol, ou seja, 3 variáveis independentes foram analisadas, o planejamento experimental consistiu-se de 17 ensaios, sendo 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 centrais. Os níveis codificados e reais utilizados encontram-se na Tabela 31.

Tabela 31- Níveis codificados e reais do DCCR usando mistura de etano e metanol

Ensaio	Nível codificado das variáveis			Nível real das variáveis		
	Tempo (x ₁)	Sol/solv (x ₂)	Metanol (x ₃)	Tempo (h)	Sol/solv (p/v)	Metanol (%)
Pontos fatoriais						
1	-1	-1	-1	2,4	1:7	20
2	+1	-1	-1	6,6	1:7	20
3	-1	+1	-1	2,4	1:13	20
4	+1	+1	-1	6,6	1:13	20
5	-1	-1	+1	2,4	1:7	80
6	+1	-1	+1	6,6	1:7	80
7	-1	+1	+1	2,4	1:13	80
8	+1	+1	+1	6,6	1:13	80
Pontos axiais						
9	- $\alpha(-1,68)$	0	0	1	1:10	50
10	+ $\alpha(+1,68)$	0	0	8	1:10	50
11	0	- $\alpha(-1,68)$	0	4,5	1:5	50
12	0	+ $\alpha(+1,68)$	0	4,5	1:15	50
13	0	0	- $\alpha(-1,68)$	4,5	1:10	0
14	0	0	+ $\alpha(+1,68)$	4,5	1:10	100
Pontos centrais						
15	0	0	0	4,5	1:10	50
16	0	0	0	4,5	1:10	50
17	0	0	0	4,5	1:10	50

3.3.2 Planejamento utilizando solução de NaHCO₃ 0,07% como solvente

Para os experimentos onde o solvente estudado foi a solução 0,07% NaHCO₃, apenas 2 variáveis independentes foram analisadas. O planejamento experimental consistiu de 11 ensaios, sendo 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 centrais. Os níveis codificados e reais utilizados encontram-se na Tabela 32.

Tabela 32- Níveis codificados e reais do DCCR usando solução 0,07% NaHCO₃

Ensaio	Nível codificado das variáveis		Nível real das variáveis	
	Tempo (x ₁)	Sol/solv (x ₂)	Tempo (h)	Sol/solv (p/v)
Pontos fatoriais				
1	-1	-1	2	1:6,45
2	+1	-1	7	1:6,45
3	-1	+1	2	1:13,55
4	+1	+1	7	1:13,55
Pontos axiais				
5	- α (-1,41)	0	1	1:10
6	+ α (+1,41)	0	8	1:10
7	0	- α (-1,41)	4,5	1:5
8	0	+ α (+1,41)	4,5	1:15
Pontos centrais				
9	0	0	4,5	1:10
10	0	0	4,5	1:10
11	0	0	4,5	1:10

3.4 Caracterização da Torta de Pinhão Manso

Para caracterização da torta de pinhão manso as análises de umidade, cinza e lipídeo foram realizadas no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis (DEQ/UFRRJ). A análise de proteína foi realizada no Laboratório de análise de solos (IA/UFRRJ). A análise para determinar fibra solúvel e insolúvel foi realizada no Laboratório de Nutrição- Professor Armando Sabaa Srur (UFRJ).

3.4.1 Análise de umidade

A determinação da umidade foi realizada utilizando-se a metodologia AOCS Bc 2-49 (AOCS, 1990). Pesaram-se 3 g das amostras em cadinhos de porcelana previamente tarados e pesados. Os cadinhos foram levados para estufa a 105 °C (Sterilifer, SX1.2 DTME) e colocados para resfriar no dessecador. O material foi pesado e o procedimento foi repetido até a obtenção de peso constante.

3.4.2 Cinza

A cinza representa a matéria mineral presente nos alimentos, ou seja, é o resíduo inorgânico após a queima da matéria orgânica. Para a determinação do teor de cinzas foi utilizado o método AOAC 942.05 (2000). Pesaram-se 3 g de torta em cadinhos de porcelana previamente tarados e pesados. O material foi incinerado em mufla a 550 °C por 12 horas. Os cadinhos foram levados ao dessecador para resfriar e depois foram pesados. A determinação do peso das cinzas foi feito pelo método gravimétrico.

3.4.3 Lipídeo

A determinação da fração lipídica das amostras foi utilizado o método de soxhlet, método AOCS Bc 3-49 (AOCS, 1993) . Pesaram-se 10 g de torta no cartucho de celulose e este foi alimentado no extrator. Em um balão previamente tarado e pesado adicionou-se,

aproximadamente, 250 mL de éster de petróleo. O balão foi aquecido em manta de aquecimento e mantido sob refluxo por 8 horas. Após a extração, o solvente foi evaporado em rota-evaporador (Fisatom, modelo, 803; Bomba de vácuo: Newpump, NOF-650) e pesou-se o óleo residual.

3.4.4 Proteína

As proteínas são extremamente importantes na nutrição porque fornecem aminoácidos essenciais ao organismo. A metodologia utilizada foi a preconizada por Tedesco *et al.* (1995). O N foi feito por digestão sulfúrica e sua destilação pelo destilador Kjeldahl, ou seja, capturado pelo ácido bórico e destilado por ácido sulfúrico a 0,025N. Neste método, o nitrogênio (N) total, isto é, o N protéico e não protéico é convertido em proteína bruta. Para a conversão do N em proteína utilizou-se o fator de correção de 6,25.

3.4.5 Fibra solúvel e insolúvel

As fibras podem ser classificadas de acordo com a sua solubilidade. As fibras solúveis incluem as gomas, mucilagens, a maioria das pectinas e algumas hemiceluloses. As fibras insolúveis incluem a celulose, lignina, hemicelulose e algumas pectinas. Embora em concentrações diferentes, a maioria dos alimentos contém uma combinação dos dois tipos de fibras (Instituto Adolfo Lutz, 2005).

Para a determinação da fibra solúvel, 50 mL de água destilada foi adicionada em 3 g de torta. A mistura foi levada para uma chapa aquecedora até entrar em ebulição e filtrada a vácuo. O filtrado foi acidificado com solução de HCl (1:1 v/v) a pH de, aproximadamente, 2,5, o material foi deixado em repouso por alguns minutos e novamente filtrado. Adicionou-se 50 mL de etanol ao filtrado e este foi deixado em repouso por 7 dias. O material foi então filtrado a vácuo em cadinho filtrante com algodão de vidro e levado para a estufa por 24 h a 105 °C. Após a estufa, o cadinho foi levado ao dessecador para resfriar, pesado, levado a mufla por 24h a 550 °C e depois de resfriado foi pesado novamente. O teor de fibra solúvel foi determinado pela diferença de peso obtido após estufa e mufla.

Para a determinação da fibra insolúvel, 3 g de torta foram pesados e levados para o aparelho digestor de fibras com 100 mL de solução de H₂SO₄ (0,255 N) por 30 minutos. O material foi filtrado em cadinho filtrante com algodão de vidro e o material retido no cadinho foi levado novamente ao digestor com 100 mL de solução de NaOH (0,313 N) por 30 min. O material foi novamente filtrado em cadinho filtrante e o cadinho levado à estufa por 8 h. Após a estufa o cadinho foi levado ao dessecador para esfriar e depois de pesado foi levado à mufla por 24 h, deixado no dessecador para esfriar e novamente pesado. A fibra insolúvel foi determinada pela diferença de peso obtido após estufa e mufla.

3.5 Determinação do Teor de Éster de Forbol por HPLC

Para a determinação do teor de éster de forbol nas amostras realizou-se uma cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se um HPLC (LC-20AT, Shimadzu, Japan) composto por bomba quaternária e detector de arranjo de diodos ajustado em 280 nm ((DAD, SPD-M20A). Utilizou-se coluna analítica C8 (250 mm x 4 mm, 5 µm, Altech), operado a temperatura ambiente. A fase móvel utilizada foi MeOH: 2% THF (B): H₂O(A) a 1,3 mL/min. O gradiente usado foi: 60% A e 40% B no começo, aumentando o B para 50% em 10 min. Após 20 e 25 min. a fase B foi aumentada para 80 e 90%, respectivamente, voltando ao ponto inicial, 40%, no tempo de 30 min. Os quatro picos dos ésteres de forbol apareceram entre 20 e 28 min. Os ésteres de forbol na torta foram determinados utilizando-se como equivalente o

forbol-12-miristato 13-acetato que apareceu entre 20 21 min. (Sigma Aldrich Co). A análise foi realizada no Instituto de Química/UFRRJ.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse capítulo são apresentados todos os resultados referentes à composição das tortas e a eficiência do processo de extração do éster de forbol nos planejamentos estudados.

Os planejamentos serão discutidos separadamente e, em ambos, as variáveis analisadas estatisticamente são porcentagem extraída de éster de forbol e teor de proteína (variáveis dependentes). Estas variáveis foram escolhidas devido a sua importância no produto final, uma vez que, o objetivo da destoxificação é a obtenção de um produto livre de toxicidade e com alto valor nutricional.

4.1 Resultados Obtidos do Tratamento com Mistura de Metanol e Etanol

4.1.1 Caracterização da torta de pinhão manso

A Tabela 33 mostra a matéria seca, o teor de lipídeo, cinza e fibra, em base seca, nas tortas após a extração em soxhlet, utilizando a mistura de metanol e etanol como solvente e na torta não tratada (torta bruta).

Os dados foram expressos em base seca para que pudessem ser comparados com os resultados encontrados na literatura, visto que, a maioria deles, foi obtida dessa maneira.

Tabela 33- Composição das tortas de pinhão manso bruta e tratada com metanol e etanol

Ensaio	Matéria seca (%)	Cinza (%) ^a	Fibra (%) ^a	Lipídeo (%) ^a
Torta tratada				
1	90,19	6,48	46,49	5,77
2	88,56	7,37	47,08	3,14
3	90,57	6,99	44,38	1,94
4	88,47	7,10	42,90	2,13
5	89,44	6,55	44,70	10,35
6	87,87	7,14	42,86	6,61
7	93,31	6,54	43,91	8,86
8	90,42	6,66	43,22	7,20
9	90,37	6,14	45,94	16,55
10	90,07	7,52	43,16	6,43
11	89,40	7,71	42,54	7,77
12	90,70	6,94	44,42	6,45
13	89,04	6,64	43,76	1,85
14	90,19	7,50	42,03	6,90
15	89,94	6,47	47,12	9,84
16	90,37	6,47	47,24	9,93
17	89,23	6,53	47,60	9,50
Torta bruta				
	89,60	6,58	47,67	19,16

^a-Em base seca

Os resultados mostram que, após o tratamento em soxhlet, o teor de matéria seca não se alterou. As tortas, após o tratamento, continham de 88,47 a 90,70% de matéria seca, enquanto que, na torta bruta, esse teor era de 89,60%. Martínez-Herrera *et al.* (2006) estudaram tortas obtidas de diferentes variedades de pinhão manso em um processo de

destoxificação e as tortas analisadas continham um teor inicial entre 90,2 e 93,6% de matéria seca e, após os tratamentos, esse teor foi de 88,7 a 97,8%. Kumar, Makkar e Becker (2010), após destoxificar a torta de pinhão manso com o uso de solvente orgânico, verificaram que o teor de base seca era de 94,5%. De acordo com Aderibigbe *et al.* (1997) o teor de umidade presente na casca e no albúmen de pinhão manso é inferior a 10 e 5%, respectivamente e esse baixo teor, pode ser, em parte, responsável pela não deterioração das sementes durante longos períodos de armazenamento. A mesma explicação foi dada por Saturnino *et al.* (2005) onde o teor de umidade encontrado na semente de pinhão manso foi de 9,5%.

A cinza, neste trabalho, variou de 6,14 a 7,71% nas tortas tratadas, sendo que na torta bruta esse valor foi de 6,58%. Em estudos realizados em tortas obtidas pelo albúmen, Makkar e Becker (1997) encontraram um teor de cinza de 9,9% e Martínez-Herrera *et al.* (2006), analisando o efeito de um tratamento químico utilizado para destoxificar a torta, encontraram um teor de cinza que variou de 9,8 a 10,8% nas tortas brutas e de 8,8 a 12,4% nas tratadas. Rakshit *et al.* (2008) estudaram uma torta obtida por sementes inteiras prensadas e, posteriormente, extraídas em soxhlet e uma torta obtida de albúmen extraído em soxhlet e os valores de cinza obtidos foram de 10,2 e 9,0%, respectivamente. Teores de cinza próximos ao obtido neste trabalho foram observados por Souza *et al.* (2009) que analisaram a torta de pinhão manso obtida pela prensagem das sementes inteiras (5,94% de cinza) e Xiao *et al.* (2011) que, analisando a torta obtida pela extração do óleo do albúmen e tratada com etanol e metanol por 2 horas, encontraram um teor de 6,74 e 7,07%, respectivamente.

A fibra alimentar variou de 42,03 a 47,60% nas tortas tratadas e na torta bruta o valor encontrado foi de 47,67%, sendo que, aproximadamente, 99% da fibra alimentar é composta por fibra insolúvel. 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). De acordo com Makkar *et al.* (1997), a semente de pinhão manso é constituída de, aproximadamente, 37,8% de casca, cujo teor de fibra é de, aproximadamente, 87%. Como a torta estudada neste trabalho foi obtida a partir da semente inteira, ou seja, com casca, o alto teor de fibra encontrado pode ser explicado devido à presença desta na torta. Souza *et al.* (2009), analisando a torta de pinhão manso obtida por dupla prensagem das sementes inteiras, encontraram um teor de fibra alimentar de 36,68%.

O teor de lipídeo na torta bruta foi de 19,16% e nas tratadas esse teor variou de 16,55 a 1,85%. A redução do teor de lipídeo, após os tratamentos, ocorreu devido à extração deste pelo metanol e etanol. Um resultado semelhante ao da torta bruta foi encontrado por Xiao e Zhang (2011), onde a torta obtida por prensagem continha um teor final de lipídeo de 16,1%. Souza *et al.* (2009), utilizando uma dupla prensagem como método de extração, também obtiveram um alto teor de lipídeo residual de 14,2%.

4.1.2 Influência das variáveis na porcentagem de éster de forbol extraída

O cromatograma obtido em HPLC para o padrão forbol-12-miristato 13-acetato encontra-se no anexo 1. A análise do teor de éster de forbol na torta bruta mostrou uma concentração de 3,6 mg de EF/g de torta e o cromatograma obtido encontra-se no anexo 2. Makkar *et al.* (1997), estudando a torta obtida pelo albúmen das sementes de 18 diferentes variedades de pinhão manso, encontraram uma variação de 0,87 a 3,32 mg/g e uma das tortas estudadas estava livre dessa toxina. No Brasil, em um estudo realizado com 27 sementes oriundas de diferentes regiões, os teores de EF variaram de 1,41 a 8,97 mg/g. Destas 27 sementes estudadas, 6 eram da região de Janaúba, a mesma utilizada neste estudo e, entre essas, o teor de EF encontrado variou de 2,12 a 4,25 mg/g (Ferrari *et al.*, 2009).

A porcentagem de éster de forbol extraída (%EF) e o teor final de EF nos ensaios do planejamento utilizando-se etanol e metanol são mostrados na Tabela 34.

Tabela 34- Porcentagem extraída e teor final de éster de forbol com metanol e etanol

Ensaio	Variáveis independentes			Variável dependente	
	Tempo (h)	Sol/solv (p/v)	Metanol (%)	%EF (%)	Teor de EF (mg/g)
Pontos fatoriais					
1	2,4	1:7	20	84,80	0,55
2	6,6	1:7	20	94,56	0,20
3	2,4	1:13	20	91,17	0,32
4	6,6	1:13	20	95,23	0,17
5	2,4	1:7	80	95,46	0,16
6	6,6	1:7	80	94,70	0,19
7	2,4	1:13	80	87,10	0,46
8	6,6	1:13	80	89,30	0,38
Pontos axiais					
9	1	1:10	50	91,68	0,30
10	8	1:10	50	97,30	0,10
11	4,5	1:5	50	84,14	0,57
12	4,5	1:15	50	91,39	0,31
13	4,5	1:10	0	92,20	0,28
14	4,5	1:10	100	89,70	0,37
Pontos centrais					
15	4,5	1:10	50	83,44	0,60
16	4,5	1:10	50	83,29	0,60
17	4,5	1:10	50	83,28	0,60

Como pode-se observar na Tabela 34, a melhor condição de extração do éster de forbol ocorreu no ensaio 10 (8 h, 1:10 p/v e 50% de metanol), onde 97,30% deste composto tóxico foi removido. Como o teor de EF na torta bruta era de 3,6 mg/g, pode-se concluir que, após o tratamento, na melhor condição analisada, o teor final do EF na torta foi de 0,10 mg/g. O cromatograma da torta obtida neste experimento encontra-se no anexo 3.

De acordo com Makkar e Becker (1997), a torta de *Jatropha curcas* com 0,11 mg/g de EF é considerada não tóxica. Aregheore, Becker e Makkar (2003), utilizando um tratamento onde a torta foi lavada 4 vezes com metanol 92%, o EF foi reduzido para 0,09 mg/g. Neste estudo, os ratos foram alimentados com uma ração contendo a torta destoxificada e nenhum sintoma de doenças foi verificado. Martínez-Herrera *et al.* (2006) trataram a torta com etanol 90% e 0,07% de NaHCO₃ e o teor de EF foi reduzido para 0,08 mg/g. Gaur (2009) conseguiu remover 99% do EF utilizando extração em soxhlet por 72 h com metanol, sendo o teor final na torta de 0,06 mg/g. Em outro estudo, realizado por Xiao *et al.* (2011), uma a torta de pinhão manso, que continha um teor inicial de éster de forbol de 2,88 mg/g, foi destoxificada, sendo o EF totalmente removido, após um tratamento com enzimas e posterior extração com etanol 65% e metanol 60% por 2 horas. Para os autores, apesar de ambos os solventes terem sido eficazes na destoxificação, o etanol é mais recomendado devido a toxicidade do metanol.

Todos os tratamentos estudados removeram mais de 83% do éster de forbol presente na torta de pinhão manso, porém somente o tratamento 10 reduziu o teor de EF a um nível inferior a 0,11 mg/g.

Assim como na maioria dos ensaios deste trabalho, Martínez-Herrera *et al.* (2006), também não obteve sucesso utilizando etanol na destoxificação da torta, neste estudo, a torta foi tratada com etanol 90% na razão 1:10 p/v por 2 h e o teor de éster extraído foi de 95,84%. Gaur (2009), utilizando metanol e etanol em ultrassom, também não conseguiu reduzir a

toxina a um nível inferior a 0,11 mg/g e, em Soxhlet, um experimento realizado com duas extrações com metanol por 24 horas e um outro experimento com extração com etanol por 48 horas também não foram capazes de remover todo o éster sendo o teor final de 0,15 e 0,32 mg/g, respectivamente. Em um estudo de destoxificação da torta de *Jatropha curcas* realizado por Xiao *et al.* (2011) um tratamento com etanol 90% e metanol 90% por 2 horas foi realizado, porém os autores só conseguiram reduzir o EF em 65,98 e 59,72%, respectivamente.

Na análise da triplicata do ponto central, o coeficiente de variação encontrado foi de 0,11%, indicando a repetibilidade do processo.

A influência das três variáveis estudadas na extração de EF foi estatisticamente analisada para um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Os coeficientes de regressão lineares (L), quadráticos (Q) e das interações entre as variáveis, assim como o erro padrão e a significância estatística (p-valor) estão listados na Tabela 35.

A Tabela 35 mostra que todos os parâmetros lineares e quadráticos das três variáveis, bem como suas interações foram significativos ($p \leq 0,05$). Os parâmetros lineares (L), das variáveis tempo e razão soluto/solvente, apresentaram efeitos positivos sobre a extração de éster de forbol, indicando que o aumento destes fatores contribui para a remoção da toxina. A concentração de metanol no solvente e as interações entre as variáveis mostraram um efeito negativo na resposta, indicando que a elevação destes fatores reduz a extração do EF presente na torta.

Tabela 35- Coeficientes de regressão, erro padrão e significância estatística para a extração de EF

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	p-valor
Constante*	83,33	0,05	0,0000
X _{1(L)} *	1,81	0,02	0,0002
X _{1(Q)} *	3,95	0,03	0,0000
X _{2(L)} *	0,40	0,02	0,0036
X _{2(Q)} *	1,57	0,03	0,0003
X _{3(L)} *	-0,25	0,02	0,0093
X _{3(Q)} *	2,69	0,03	0,0001
X ₁ X ₂ *	-0,34	0,03	0,0084
X ₁ X ₃ *	-1,55	0,03	0,0004
X ₂ X ₃ *	-2,60	0,03	0,0001

* Fator estatisticamente significativo (95 % de confiança)

Substituindo os termos significativos na Equação 1 obteve-se o modelo que descreve a superfície de resposta da porcentagem de éster de forbol extraída. Essa pode ser predita através da Equação 3.

$$\begin{aligned} \%EF = & 83,33 + 1,81x_1 + 3,95x_1^2 + 0,40x_2 + 1,57x_2^2 - 0,25x_3 + 2,69x_3^2 - 0,34x_1x_2 \\ & - 1,55x_1x_3 - 2,60x_2x_3 \end{aligned} \quad (3)$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,88 e o desvio relativo médio entre os valores experimentais e preditos foi de 1,25%. A tabela 36 mostra a análise de variância.

Tabela 36- Análise de variância da porcentagem de EF extraído com metanol e etanol

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F-calculado
Regressão	326,32	9	36,26	6,09
Residual	41,65	7	5,95	
Falta de ajuste	41,63	5	8,33	
Erro puro	0,02	2	0,01	
Total	367,97	16		

$R^2=0,88$; F-tabelado=0,30

Sendo o valor de F-calculado (6,09) maior que o de F-tabelado (0,30), mostrando que o modelo é válido e apropriado para representar as relações entre os parâmetros selecionados.

Sendo o modelo válido, as superfícies de resposta e as curvas de contorno foram geradas (Figuras 21, 22 e 23) para uma melhor visualização da influência do tempo, razão de soluto/solvente e mistura metanol/etanol sobre a extração do éster de forbol.

A Figura 21 mostra a influência das variáveis tempo e razão soluto/solvente na resposta. Utilizando-se longos períodos de extração (de 7 a 8 h), o processo é eficiente para a remoção da toxina em todas as razões de soluto/solvente utilizadas. Porém, quando o processo ocorre em um tempo de 1 a 2 h, é necessária uma relação de soluto/solvente de 1:13-1:15 p/v para que o processo seja eficiente.

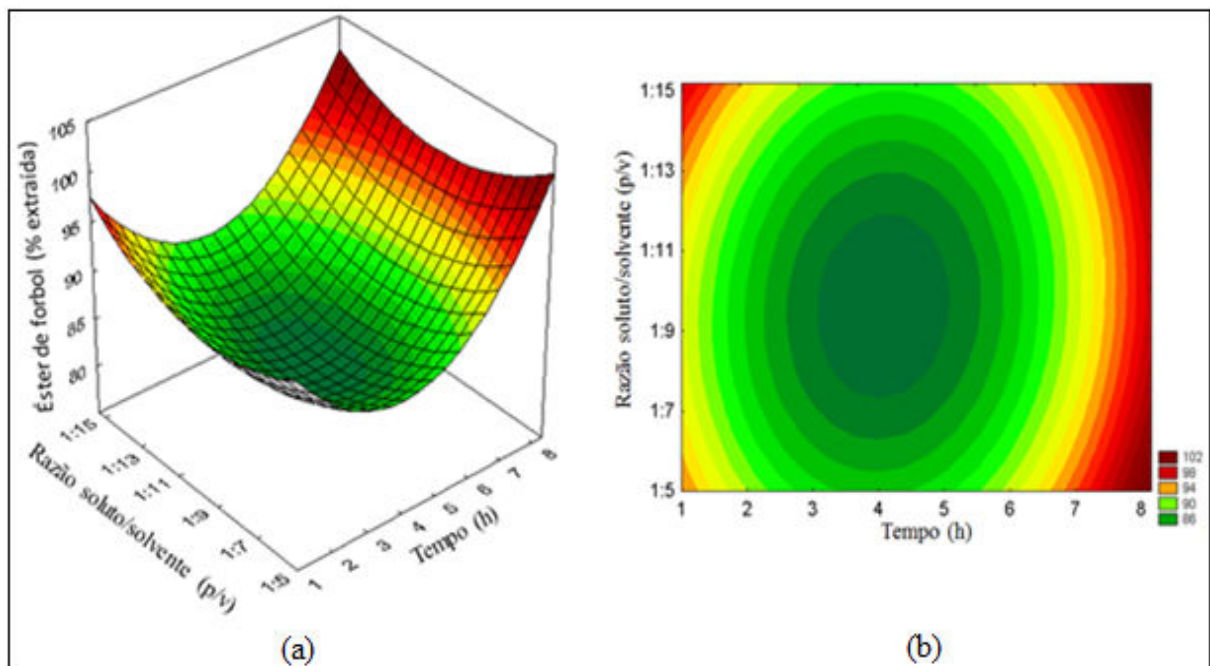


Figura 21- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) da extração do éster de forbol em função do tempo e da razão soluto/solvente.

Analisando a Figura 22, que mostra a influência das variáveis tempo e concentração de metanol na remoção do éster de forbol, pode-se verificar que, tanto o metanol quanto o etanol, são eficazes na remoção da toxicidade da torta de pinhão manso. Utilizando-se uma mistura rica em metanol (80 a 100%), uma alta remoção de éster de forbol pode ser obtida com uma extração de apenas 1 h de duração ou em uma extração de 8 h. Porém, quando o solvente utilizado é uma mistura rica em etanol, um maior tempo de extração é necessário. Isso pode ocorrer pois, além do éster de forbol ter uma maior afinidade pelo metanol, este solvente tem

uma menor temperatura de ebulição se comparado com o etanol, sendo necessário um menor tempo de aquecimento para sua evaporação.

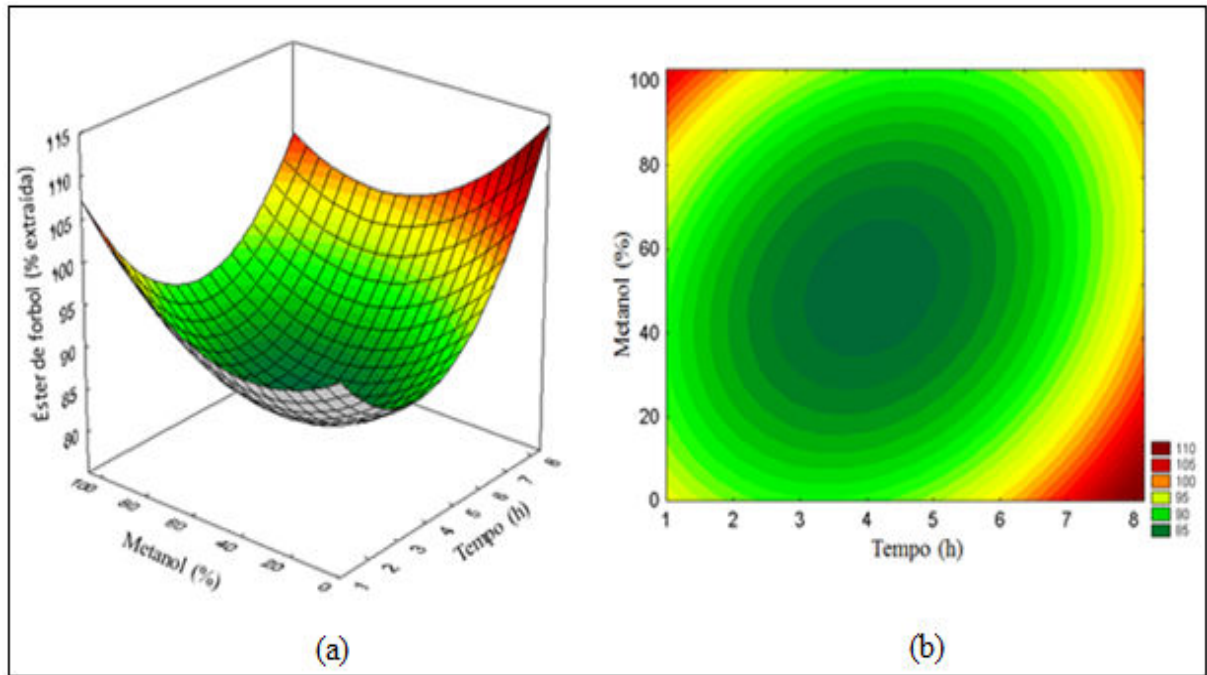


Figura 22- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) da extração do éster de forbol em função do tempo e influência da mistura de metanol/etanol.

A influência das variáveis concentração de metanol e razão soluto/solvente é mostrada na Figura 23.

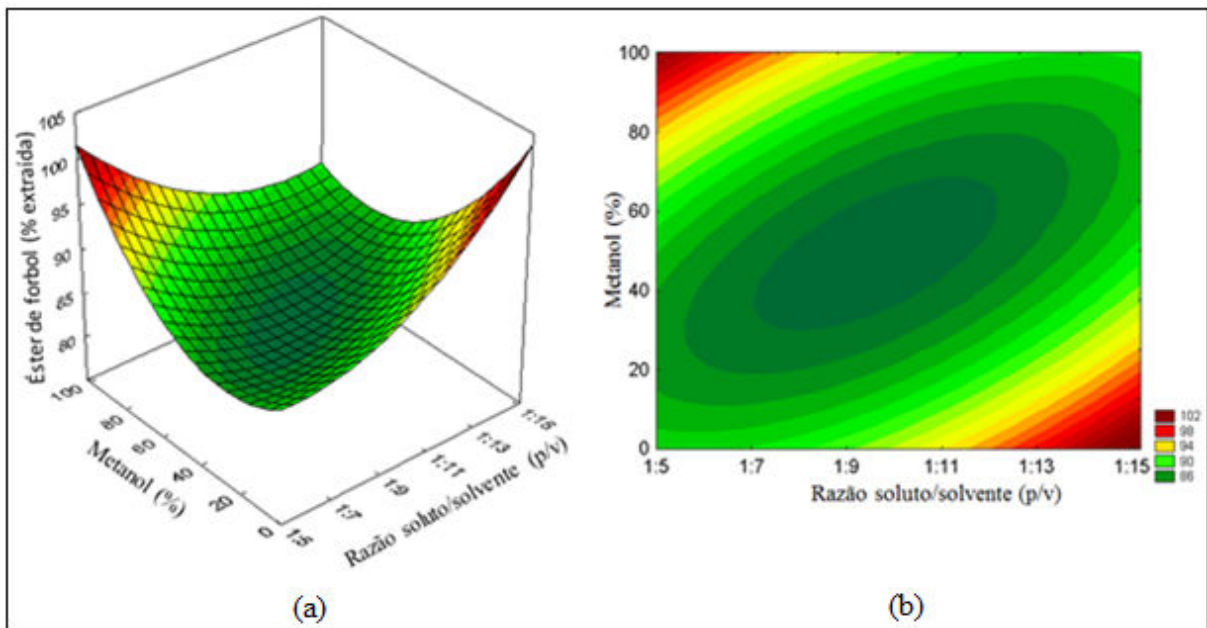


Figura 23- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) da extração do éster de forbol em função da mistura de metanol/etanol e da razão soluto/solvente.

Os melhores resultados de remoção do éster de forbol são observados quando a extração é realizada com uma mistura rica em metanol como solvente (80 a 100%) e em baixa razão soluto/solvente (1:5 a 1:8 p/v); ou utilizando-se uma mistura rica em etanol (80 a 100%), porém com uma alta razão soluto/solvente (1:13-1:15 p/v). Esse comportamento do processo também indica uma maior afinidade do éster de forbol com o metanol, sendo necessário um menor volume de solvente para que a remoção desta toxina ocorra.

4.1.3 Influência das variáveis no teor de proteína

O teor de proteína presente nas tortas de pinhão manso após os tratamentos químicos com os solventes orgânicos encontram-se na Tabela 37.

Tabela 37- Teor de proteína obtido nas tortas tratadas com metanol e etanol

Ensaio	Variáveis independentes			Variável dependente
	Tempo (h)	Sol/solv (p/v)	Metanol (%)	Teor de proteína (%)
Pontos fatoriais				
1	2,4	1:7	20	17,93
2	6,6	1:7	20	17,93
3	2,4	1:13	20	18,05
4	6,6	1:13	20	18,37
5	2,4	1:7	80	15,67
6	6,6	1:7	80	18,39
7	2,4	1:13	80	16,69
8	6,6	1:13	80	16,78
Pontos axiais				
9	1	1:10	50	15,43
10	8	1:10	50	16,67
11	4,5	1:5	50	15,76
12	4,5	1:15	50	15,72
13	4,5	1:10	0	20,29
14	4,5	1:10	100	15,33
Pontos centrais				
15	4,5	1:10	50	15,26
16	4,5	1:10	50	16,42
17	4,5	1:10	50	15,73

O teor de proteína variou de 15,26 a 20,29%, sendo que na torta bruta o valor encontrado foi de 14,01%.

De acordo com Xiao e Zhang (2011), o teor de proteína presente na torta é influenciado pelo processo de obtenção desta. Os autores analisaram tortas, oriundas do albúmen das sementes, obtidas por extração em soxhlet e prensagem. A torta obtida na extração com solvente continha um alto teor de proteína (58,6%) enquanto que na torta oriunda da prensagem esse teor foi menor (45,3%). Segundo os autores, essa diferença ocorreu devido ao alto percentual de óleo residual no albúmen extraído com solvente em comparação com o prensado, que foi de 2,5% e 16,1%, respectivamente.

Martínez-Herrera *et al.* (2006) também observaram o mesmo comportamento em um estudo, onde comparou o teor de proteína presente no albúmen de diferentes sementes de pinhão manso com o da torta obtida através deles por extração em soxhlet. A média do teor de

proteína encontrado nos albúmens foi de 32,8%, enquanto que na torta esse teor foi de 63,1%; por outro lado, o teor de óleo presente no albúmen (56,6%) foi drasticamente reduzido após a extração em soxhlet (0,5%).

Em outro estudo que analisa a variação do teor de proteína na torta de pinhão manso, Rakshit *et al.* (2008) utilizaram tortas obtidas por diferentes processos; um utilizando a prensagem das sementes com casca e outro realizando a extração em soxhlet a partir do albúmen. O teor de proteína na torta obtida por prensagem foi de 22,1%, enquanto que na obtida por soxhlet foi de 60,3%. Segundo os autores, esta variação no teor de proteína foi, principalmente, devido à grande quantidade de casca, que contribuem para o alto teor de fibra na torta prensada.

Analisando a Tabela 37, observou-se que todos os experimentos influenciaram positivamente no teor de proteína e o melhor resultado foi obtido em um tempo de extração de 4 h e 30 min, com uma razão de soluto/solvente de 1:10 p/v e utilizando etanol puro como solvente. Porém, utilizando-se as mesmas condições de tempo e relação soluto/solvente, porém com uma mistura de metanol e etanol 50%, o menor teor de proteína foi obtido, o que mostra a influência do solvente no processo de extração.

Na análise da triplicata do ponto central, o coeficiente de variação encontrado foi de 3,68%. A influência das três variáveis estudadas no teor de proteína foi estatisticamente analisada para um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Os coeficientes de regressão, o erro padrão e a significância estatística (p-valor) estão listados na Tabela 38.

Como pode-se observar na Tabela 38, apenas a porcentagem de metanol na mistura com etanol é uma variável significativa na análise do teor de proteína ($p \leq 0,05$). O efeito linear da concentração de metanol na mistura com etanol é negativa, mostrando que a elevação deste fator causa uma diminuição no teor de proteína na torta final.

Tabela 38- Coeficientes de regressão, erro padrão e significância estatística do teor de proteína obtido no tratamento com metanol e etanol

Fatores	Coefficientes	Erro padrão	p-valor
Constante*	15,74	0,33	0,0005
X _{1(L)}	0,38	0,16	0,1361
X _{1(Q)}	0,29	0,17	0,2382
X _{2(L)}	-0,01	0,16	0,9600
X _{2(Q)}	0,18	0,17	0,4142
X _{3(L)} *	-0,96	0,16	0,0259
X _{3(Q)} *	0,91	0,17	0,0343
X ₁ X ₂	-0,29	0,21	0,2951
X ₁ X ₃	0,31	0,21	0,2688
X ₂ X ₃	-0,14	0,21	0,5620

* Fator estatisticamente significativo (95% de confiança)

Substituindo os termos significativos na Equação 1 obteve-se o modelo que descreve a superfície de resposta do teor de proteína (P) na torta tratada (Equação 4).

$$P = 15,74 - 0,96x_3 + 0,91x_3^2 \quad (4)$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,79 e o desvio relativo médio entre os valores experimentais e preditos pelo modelo foi de 3,72%. A análise de variância (ANOVA) é mostrada na Tabela 39. Sendo o valor de F-calculado (12,33) maior que o de F-tabelado

(0,05), demonstrando que o modelo é válido e apropriado para representar as relações entre os parâmetros selecionados.

Tabela 39- Análise de variância do teor de proteína utilizando-se etanol e metanol

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F-calculado
Regressão	20,72	2	10,36	12,33
Residual	11,77	14	0,84	
Falta de ajuste	6,21	5	1,24	
Erro puro	0,68	2	0,34	
Total	32,49	16		

$R^2=0,79$; $F\text{-tabelado}=0,05$

As superfícies de resposta e as curvas de contorno foram geradas de acordo com o modelo formado para o processo (Figuras 24 e 25).

A superfície de resposta e a curva de contorno, que mostram a interação entre as variáveis, razão soluto/solvente e concentração de metanol na mistura utilizada como solvente (Figura 24), prova que, como mostrado na Tabela 38, a concentração de metanol causa um efeito negativo na resposta, ou seja, os melhores resultados são obtidos quando o metanol está presente em menor quantidade.

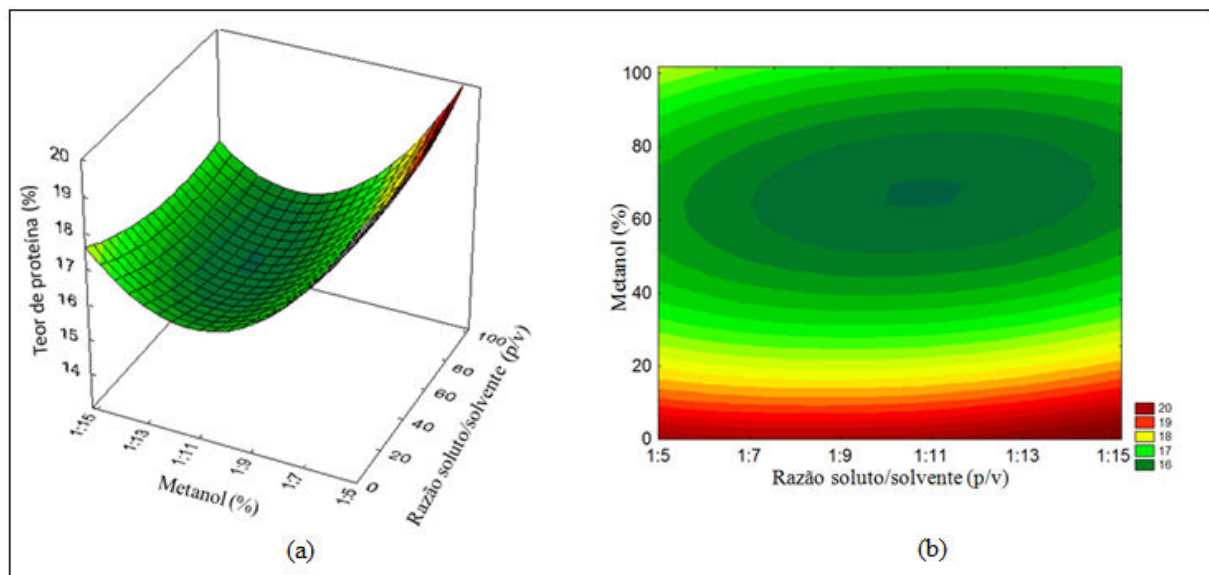


Figura 24- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) do teor de proteína em função da mistura de metanol/etanol e da razão soluto/solvente.

Na curva de contorno e superfície de resposta que mostram o efeito da interação do tempo e concentração de metanol no processo de extração (Figura 25 a e b), o mesmo comportamento da Figura 24 é observado, ou seja, o uso de uma mistura contendo menos metanol como solvente aumenta o teor final de proteína. Porém, utilizando-se um tempo muito elevado de extração (8 h) é possível um aumento no valor nutricional da torta utilizando-se o metanol como solvente de extração.

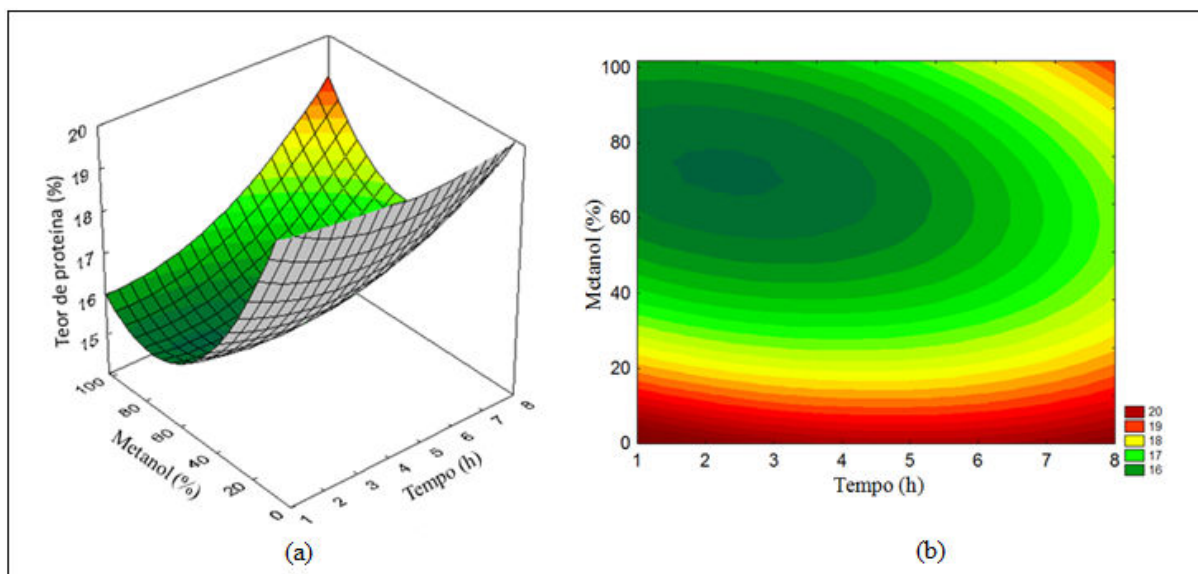


Figura 25- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) do teor de proteína em função da mistura de metanol/etanol e do tempo.

Como mostrado acima, o único fator que influencia no teor de proteína é a concentração de metanol, e essa influência é negativa tanto na proteína, quanto na extração de éster de forbol. Portanto, para se obter as melhores condições de operação para as 2 respostas, ou seja, aumentar, simultaneamente, o teor de proteína e a extração de EF, o etanol é o solvente mais apropriado para se utilizar no processo. Por outro lado, sabendo-se que o efeito das demais variáveis na extração de EF é positivo e de acordo com as Figuras 22 e 23, para a utilização de etanol como solvente um maior tempo de extração e uma maior razão de soluto/solvente devem ser utilizados.

4.2 Resultados Obtidos do Tratamento com NaHCO_3 0,07%

4.2.1 Caracterização da torta de pinhão manso

A Tabela 40 mostra os teores de cinza, fibra e lipídeo das tortas de pinhão manso tratadas e bruta. Os teores foram obtidos em base úmida.

Como pode-se observar, os tratamentos não influenciaram no teor de cinza sendo a variação de 5,21-5,91% nas tortas tratadas e na torta bruta, o valor encontrado foi de 5,65%.

O teor de lipídeo variou de 14,12 a 16,71% nas tortas tratadas, enquanto que na torta bruta o teor de lipídeo foi de 17,17%, como o bicarbonato de sódio não tem afinidade com o óleo, houve uma menor redução no teor de lipídeo, em comparação com o tratamento utilizando metanol e etanol.

Pode-se observar uma redução no teor de fibra alimentar nas tortas tratadas em relação à torta bruta. Essa redução pode ter ocorrido, pois o bicarbonato de sódio pode ter quebrado algumas ligações químicas da fibra. Martínez-Herrera *et al.* (2006) estudaram uma solução 0,07% de NaHCO_3 para a destoxificação da torta de pinhão manso e observaram que o teor de fibra total não foi alterado após o tratamento.

Tabela 40- Composição das tortas de pinhão manso bruta e tratada quimicamente com NaHCO_3 0,07%

Ensaio	Cinza (%)	Fibra (%)	Lipídeo (%)
Torta tratada			
1	5,81	34,94	16,09
2	5,91	36,24	15,36
3	5,71	33,42	14,12
4	5,80	33,70	14,15
5	5,90	34,78	16,00
6	5,88	32,24	16,71
7	5,47	32,66	14,32
8	5,21	32,87	16,31
9	5,87	36,62	15,58
10	5,68	35,71	15,26
11	5,56	36,28	15,95
Torta bruta			
	5,65	42,71	17,17

4.2.2 Influência das variáveis na porcentagem de éster de forbol extraída

A porcentagem de éster de forbol extraída (%EF) e os teores finais de éster de forbol nas tortas tratadas utilizando-se a solução 0,07% de NaHCO_3 são mostrados na Tabela 41.

Tabela 41- Porcentagem extraída e teor final de EFl com a solução 0,07% de NaHCO_3

Ensaio	Variáveis independentes		Variável dependente	
	Tempo (h)	Sol/solv (p/v)	%EF (%)	Teor de EF (mg/g)
Pontos fatoriais				
1	2	1:6,54	41,28	2,11
2	7	1:6,54	49,78	1,81
3	2	1:13,55	24,49	2,72
4	7	1:13,55	77,09	0,82
Pontos axiais				
5	1	1:10	66,46	1,21
6	8	1:10	64,44	1,28
7	4,5	1:5	64,49	1,28
8	4,5	1:15	56,98	1,55
Pontos centrais				
9	4,5	1:10	54,14	1,65
10	4,5	1:10	42,62	2,07
11	4,5	1:10	48,61	1,85

Como pode-se observar na Tabela 41, a melhor condição de extração dos EF foi no tempo de 7 h e razão soluto/solvente de 1:13,55 p/v, onde a remoção foi de 77,09%. Porém, sabendo-se que o teor de EF na torta bruta é de 3,60 mg/g, pode-se afirmar que a torta tratada de acordo com o ensaio 4 contém um teor final de EF de 0,82 mg/g, indicando que, nos

intervalos analisados, o planejamento utilizando a solução 0,07% de NaHCO_3 não é eficiente para a destoxificação da torta de pinhão manso.

O coeficiente de variação encontrado na análise da triplicata do ponto central foi de 11,89%. A influência das variáveis estudadas na extração de EF foi estatisticamente analisada para um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Os coeficientes de regressão, o erro padrão e a significância estatística (p-valor) estão listados na Tabela 42.

Tabela 42- Análise de variância da extração dos EF utilizando NaHCO_3 0,07%

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	p-valor
Constante*	48,46	3,33	0,0047
$X_{1(L)}$	7,28	2,04	0,0701
$X_{1(Q)}$	4,76	2,42	0,1884
$X_{2(L)}$	-0,01	2,04	0,9956
$X_{2(Q)}$	2,41	2,42	0,4256
X_1X_2	11,03	2,88	0,0620

* Fator estatisticamente significativo (95% de confiança)

A Tabela 42 mostra que o tempo e a razão soluto/solvente não são significativos na extração de éster de forbol ($p \leq 0,05$). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,49. O baixo coeficiente de variação indica que o modelo não deve ser usado para fins preditivos, somente como indicadores de tendência.

Como nenhuma variável foi significativa o modelo não pôde ser obtido e a análise de variância não foi realizada.

4.2.3 Análise dos resultados em relação ao teor de proteína

A influência do tratamento utilizando o solvente inorgânico no teor de proteína também foi analisada. Os teores de proteína presente nas tortas de pinhão manso após o tratamento químico encontram-se na Tabela 43.

Tabela 43- Teor de proteína obtido nas tortas tratadas com NaHCO_3

Ensaio	Variáveis independentes		Variável dependente
	Tempo (h)	Sol/solv (p/v)	Teor de proteína (%)
Pontos fatoriais			
1	2	1:6,54	17,39
2	7	1:6,54	14,92
3	2	1:13,55	17,23
4	7	1:13,55	17,10
Pontos axiais			
5	1	1:10	15,42
6	8	1:10	18,52
7	4,5	1:05	15,56
8	4,5	1:15	16,78
Pontos centrais			
9	4,5	1:10	15,42
10	4,5	1:10	14,97
11	4,5	1:10	15,83

O teor de proteína variou de 14,92 a 18,52% sendo que na torta bruta esse teor era de 14,01%. Assim como no planejamento utilizando solventes orgânicos, os tratamentos com bicarbonato de sódio também influenciaram positivamente no teor de proteína, sendo que, no ensaio 6 (8 h e 1:10 p/v) o maior valor final deste composto foi obtido.

Na análise dos pontos centrais encontrou-se um coeficiente de variação de 2,79%. Os coeficientes de regressão, o erro padrão e a significância estatística (p-valor), obtidos na análise estatística realizada para um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$), encontram-se na Tabela 44.

Tabela 44- Coeficientes de regressão, erro padrão e significância estatística do teor de proteína obtido nos tratamentos realizados com NaHCO_3

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	p-valor
Constante*	15,41	0,25	0,0003
X _{1(L)}	0,35	0,15	0,1496
X _{1(Q)}	0,74	0,18	0,0546
X _{2(L)}	0,34	0,15	0,1529
X _{2(Q)}	0,34	0,18	0,2002
X _{1X₂}	0,83	0,22	0,0607

* Fator estatisticamente significativo (95% de confiança)

A análise estatística mostrou que, assim como para a extração de EF, nenhuma das variáveis analisadas foram significativas no teor de proteína presente nas tortas tratadas. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,61.

Como nenhuma variável foi significativa o modelo não pôde ser obtido e a análise de variância não foi realizada.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

A torta de pinhão manso possui um alto valor nutricional, porém é considerada tóxica devido a presença do éster de forbol. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi estudar um método químico para destoxificação deste co-produto. A torta bruta de pinhão manso apresentou um elevado teor de EF (3,60 mg/g). Uma remoção de 97,30% da toxicidade foi alcançada usando uma mistura contendo 50% em metanol, tempo de extração de 8 h e razão soluto/solvente de 1:10 p/v, sendo a torta final considerada atóxica, com 0,10 mg de EF/g de torta, o que comprovou a eficácia do método estudado.

Nos experimentos em que metanol e etanol foram utilizados como solventes de extração, a metodologia apresentou repetibilidade com um baixo desvio padrão dos pontos centrais para ambas as variáveis dependentes analisadas. A análise estatística mostrou que para um nível de confiança de 95%, todas as variáveis foram significativas para a extração de éster de forbol, porém para o teor de proteína, somente a concentração de metanol teve significância. Houve uma boa correlação entre os valores preditos e experimentais e a análise de variância indicou que os modelos são significativos ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$) e apropriados para representar as relações entre os parâmetros selecionados para as duas respostas.

Para a extração de EF, as superfícies de resposta e as curvas de contorno mostraram que a destoxificação pode ser realizada utilizando-se uma mistura rica em metanol, com um baixo tempo de extração e razão soluto/solvente. Além disso, o etanol também se mostrou eficiente na extração de EF, porém para a utilização desse solvente, um maior tempo de extração e maior razão soluto/solvente são necessários.

Para se obter um maior teor de proteína no produto final, aumentando assim seu valor agregado, observou-se que uma menor concentração de metanol deve ser utilizada no solvente, tendo o metanol um efeito negativo na resposta.

Os experimentos realizados com a solução 0,07% de NaHCO_3 não foram eficientes para a remoção da toxicidade da torta de pinhão manso, sendo que na melhor condição analisada apenas 77,09% da toxina foi removida, o que resultou em um teor final de 0,82 mg/g de EF na torta.

A análise estatística mostrou que nenhuma das variáveis analisadas foram significativas na extração de EF e no teor de proteína final das tortas para o planejamento utilizando o solvente inorgânico.

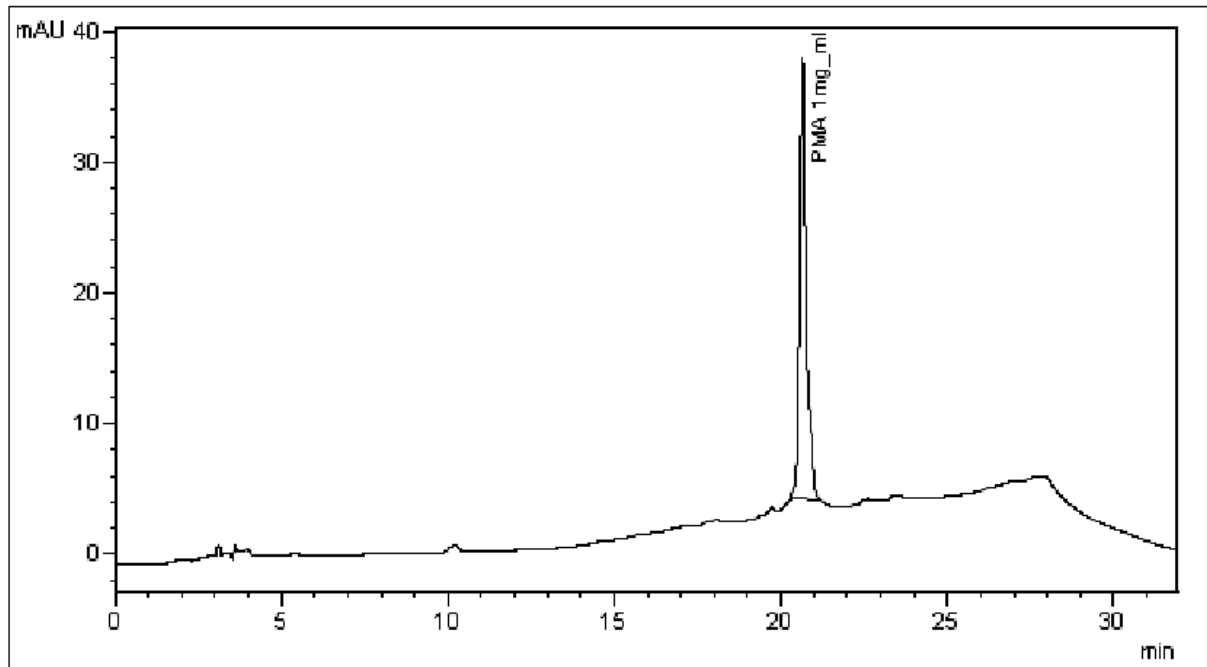
Diante dos resultados encontrados, propõe-se como sugestões:

- Otimizar o processo realizando um estudo econômico para verificar se o mais elevado teor de proteína obtido com a torta destoxificada com etanol compensa os maiores custos que ocorrem em função do maior tempo de extração e maior volume de solvente necessário no processo;
- Analisar a influência da toxicidade do metanol no produto final;
- Fazer um estudo utilizando a torta destoxificada como aditivo na ração de animais;
- Estudar novos planejamentos com o objetivo de analisar as regiões que apresentaram melhores resultados nas superfícies de resposta e curvas de contorno;

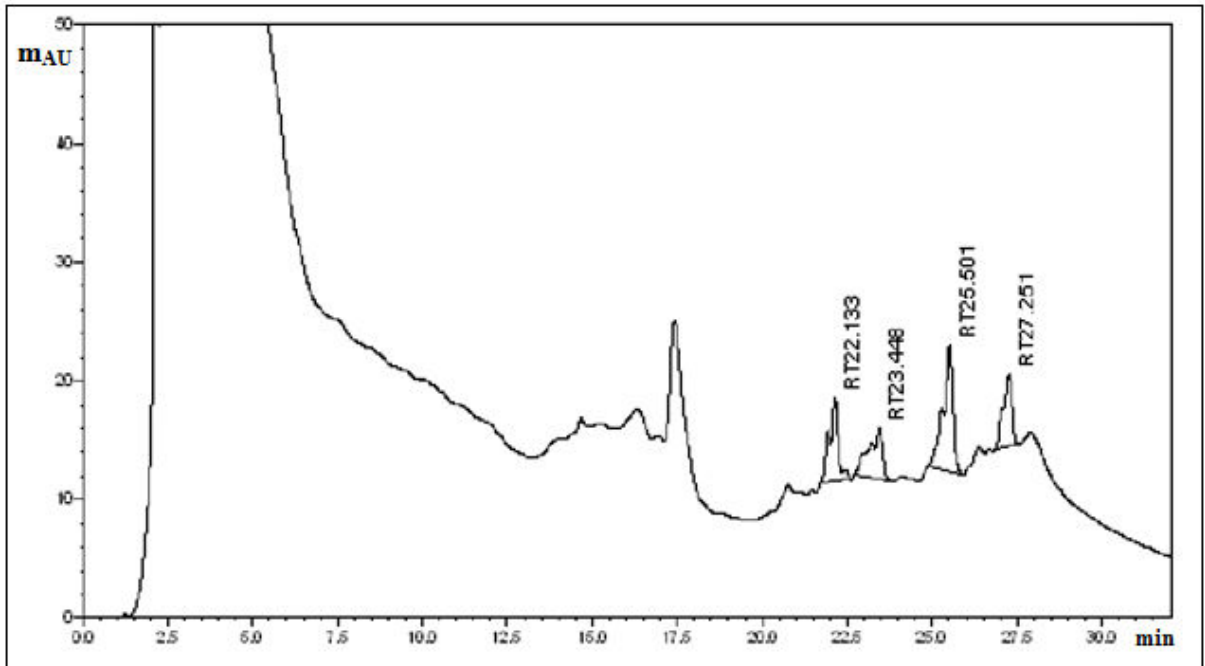
- Realizar um novo tratamento nas tortas obtidas nos tratamentos aqui apresentados, visando estudar a eficiência de duas ou mais bateladas e realizar um estudo econômico para se verificar a viabilidade do processo.

6 ANEXOS

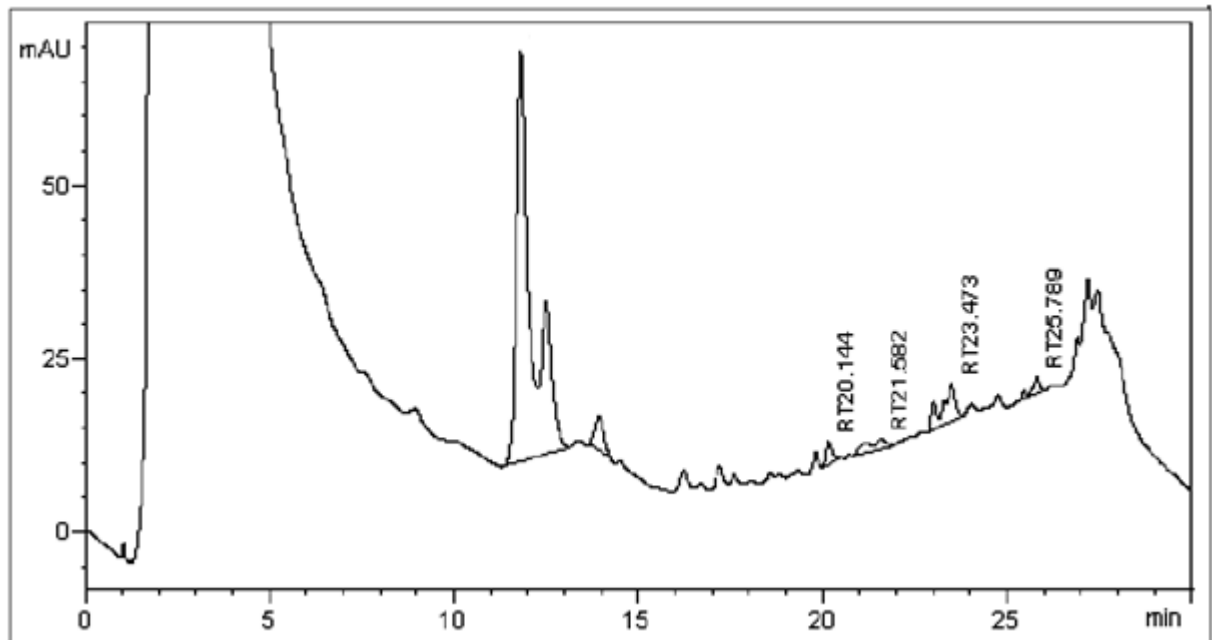
Anexo 1: Cromatograma obtido em HPLC para o padrão forbol-12-miristato 13-acetato



Anexo 2: Cromatograma obtido em HPLC para a torta bruta



Anexo 3: Cromatograma obtido em HPLC para o ensaio 10 do planejamento que utilizou mistura de metanol e etanol como solvente



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, S. E. I; MAGZOUN, M. Toxicity of *Jatropha curcas* for goats. **Toxicology**, v. 4, n. 3, p. 388-389, 1975.

ADERIBIGBE, A. O.; JOHNSON, C. O. L. E.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; FOIDL, N. Chemical composition and effect of heat on organic matter- and nitrogen-degradability and some antinutritional components of *Jatropha* meal. **Animal Feed Science Technology**, v. 67, p. 223-243, 1997.

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

AHMED, O. M. M.; ADAM, S. E. I. Effects of *Jatropha curcas* on calves. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 16, p. 476-482, 1979.

ALVES, J. M. A.; SOUSA, A. de A.; SILVA, S. R. G da, LOPES, G. N.; SMIDERLE, O. J.; UCHÔA, S. C. P. Pinhão-manso: uma alternativa para produção de biodiesel na agricultura familiar da Amazônia brasileira. **Agroambiente On-line**, Boa Vista, v. 2, n. 1, p. 57-68, 2008.

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

AOCS- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices. 4. ed. Champaign, 1990. v. 2.

AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices. 4.ed. Champaign, 1993. v. 3.

ARAÚJO, F.D. S.; MOURA, C. V. R.; CHAVES, M. H. Caracterização do óleo e biodiesel de pinhão manso (*Jatropha curcas* L). In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: MCT/ABIPTI, 2007.

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

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido Nordeste. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 789-799, 2004.

CARNIELLI, F. **O combustível do futuro**. 2003. Disponível em: www.ufmg.br/boletim/bul1413>. Acesso em: fev. de 2013.

CASTRO, C. M., DEVIDE, A. C. P., ANACLETO, A. H., Avaliação de acessos de pinhão manso em sistema de agricultura familiar. **Revista Tecnologia e Inovação Agropecuária**. São Paulo. APTA. 2008.

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

CHOMCHAI, C.; KRIENGSUNTHORNKIJ, W.; SIRISAMUT, T.; NIMSOMBOON, T.; RUNGRUENG, W. SILPASUPAGORNWONG, U. Toxicity from ingestion of *Jatropha curcas* ('saboo dum') seeds in thai children. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 42, n. 4, p. 946-950, 2011.

CORTESÃO, M. **Culturas tropicais**: plantas oleaginosas. Lisboa: Clássica, 1956. 231 p.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha* oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 1125-1133, 2010.

DRUMOND, M. A.; ARRUDA, F. P.; ANJOS, J. B. **Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008. 15 p. (Embrapa Semi-Árido. Documentos, 212).

FAO. ***Jatropha*: A smallholder bioenergy crop, the potential for pro-poor development**. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. v. 8, p.1-114, 2010.

FERRARI, R. A.; CASARINI, M. B.; MARQUES, D. A.; SIQUEIRA, W. J. Avaliação da composição química e de constituintes tóxico em acessos de pinhão-manso de diferentes origens. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, n. 4, p. 309-314, 2009.

FERREIRA, O. R.; BRITO, S. S.; LIMA, F. G.; MARIANO SOUZA, D. P.; MENDONÇA, S.; RIBEIRO, J. A. A.; MAIORKA, P. C.; ARAÚJO, V. L.; NEIVA, J. N. M.; FIORAVANTE, M. C. S.; RAMOS, A. T.; MARUO, V. M. Toxicidade do pericarpo da *Jatropha curcas* em ovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 3, p. 559-567, 2012.

FERREIRA, O. R.; RAMOS, A. T.; MARUO, V. M. Intoxicação em ovinos pela casca da *Jatropha curcas*: Aspectos clínicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS DE PINHÃO MANSO, 1., 2009, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa, 2009.

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

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

GAUR, S. **Development and evaluation of an effective process for the recovery of oil and detoxification of meal from *Jatropha curcas***. 2009. 68 f. Thesis (Master of science in chemical engineering), Missouri University of Science and Technology, Rolla, 2009.

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

GONÇALVES, S. B.; MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. **Substâncias tóxicas, alergênicas e antinutricionais presentes no pinhão manso e seus derivados e procedimentos adequados ao manuseio**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2009. 5 p. (Embrapa Agroenergia. Circular técnica, 01).

GOONASEKERA, M. M.; GUNAWARDANA, V. K.; JAYASENA, K.; MOHAMMED, S. G.; BALASUBRAMANIAM, S. Pregnancy terminating effect of *Jatropha curcas* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 117-123, 1995.

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

HELLER, J. **Physic nut. *Jatropha curcas* L.** Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Rome: International Plant Genetic Resources Institute-IPGRI, 1996. 66 p.

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

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

KASUYA, M. C. M.; LUZ, J. M. R.; PEREIRA, L. P. S.; SILVA, J. S.; MONTAVANI, H. C.; RODRIGUES, M. T. Bio-Detoxification of *Jatropha* Seed Cake and Its Use in Animal Feed. In: ZHEN, F. (Org.). **Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications**. 1ed. Rijeka: InTech, 2012. p. 309-330.

KUMAR, V.; MAKKAR, H. P.; BECKER, K. Dietary inclusion of detoxified *Jatropha curcas* kernel meal: effects on growth performance and metabolic efficiency in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Fish Physiology and Biochemistry**, online first, 2010.

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

KUMAR, V.; KHALIL, W. K. B.; WEILER, U.; BECKER, K. Influences of incorporating detoxified *Jatropha curcas* kernel meal in common carp (*Cyprinus carpio* L.) diet on the expression of growth hormone- and insulin-like growth factor-1-encoding genes. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, p. 97-108, 2011.

LAPOLA, D. M.; PRIESS, J. A.; BONDEAU, A. Modeling the land requirements and potential productivity of sugarcane and *Jatropha* in Brazil and India using the LPJmL dynamic global vegetation model. **Biomass & Bioenergy**, v. 33, p. 1087-1095, 2009.

LAVIOLA, B. G.; BHERING, L. L.; ALBRECHT, J. C.; MARQUES, S. S.; MARANA, J. C. Caracterização morfoagronômica do banco de germoplasma de pinhão manso resultados do 1º ano de avaliação In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS DE PINHÃO MANSO, 1., 2009, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa, 2009.

LAVIOLA, B. G.; MENDONÇA, S.; RIBEIRO, J. A. A. Caracterização de acessos de pinhão-manso quanto a toxidez. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA E I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 4., 2010, João Pessoa. **Anais...** Campina grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 1617-1622.

LI, CAI-YAN; DEVAPPA, R. K.; LIU, JIAN-XIN; LV, JIAN-MIN; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 620-625, 2010.

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

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

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Potential of *J. curcas* seed meal as a protein supplement to livestock feed, constraints to its utilization and possible strategies to overcome constraints. In: GÜBITZ, G. M.; MITTELBACH, M; TRABI, M. **Biofuel and industrial products from *Jatropha curcas***. Austria: Dbv-Verlag University of Graz, 1997. p. 190-205.

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

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

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SPORER, F.; WINK, M. Studies on Nutritive Potential and Toxic Constituents of Different Provenances of *Jatropha curcas*. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 45, p. 3152-3157, 1997.

MAKKAR, H. P. S.; MARTÍNEZ-HERRERA, 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.

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

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

NUNES, C. F. **Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

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

PEREIRA, C. S. S. **Avaliação de diferentes tecnologias na extração do óleo do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química)- Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

PEREIRA, C. S. S.; COELHO, G. L. V.; MENDES, M. F. Avaliação de diferentes tecnologias na extração do óleo do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Revista de Ciências da Vida**, v. 31, n. 2, p. 61-74, 2011.

PHENGNUAM, T.; SUNTORNSUK, W. Detoxification and anti-nutrients reduction of *Jatropha curcas* seed cake by *Bacillus* fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 115, n. 2, p. 168-172, 2013.

PINTO, L. G. Q. **Efeito da presença dos taninos nas rações para peixes de águas quentes**. 2000. 62 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

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

RATNADASS, A.; TOGOLA, M. Cissé, B.; VASSAL, J. M. Potential of sorghum and physic nut (*Jatropha curcas*) for management of plant bugs (*Hemiptera: Miridae*) and cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) on cotton in an assisted trap-cropping strategy. **Journal of SAT Agricultural Research**, v. 7, p. 1-7, 2009.

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

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. 2ª. ed. Campinas: Cárita Editora, 2009. 358 p.

RUG, M.; RUPPEL, A. Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against intermediate snails and larvae of schistosomes. **Trop Med Int Health**, v. 5, p. 423-430, 2000.

SATO, M.; BUENO, O. C.; ESPERANCINI, M. S.; FRIGO, E. P. A cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.): Uso para fins combustíveis e descrição agrônômica. **Revista Varia Scientia**, v. 07, n. 13, p. 47-62, 2009.

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

SHAH, V.; SANMUKHANI, J. Five cases of *Jatropha curcas* poisoning. **Journal of the Association of Physicians of India**. v. 58, p. 243-244, 2010.

SINGH, J.; BARGALE, P. C. Development of a small capacity double stage compression screw press for oil expression. **Journal of food engineering**, v. 43, p. 75-82, 2000.

SINGH, R. K.; SINGH, D.; MAHENDRAKAR, A. G. *Jatropha* poisoning in children. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 66, p 80-81, 2010.

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.

TAGLIANI, M. C., ZUFFELLATO-RIBAS, K. C., LAVIOLA, B. G., WENDLING, I. **Uso de ácido indol butírico na miniestaquia de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2010. 7 p. (Embrapa Agroenergia. Comunicado técnico, 04).

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A. BOHNEN, S. J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 147 p. (Boletim Técnico, 5).

TEIXEIRA, J. P. F. Teor e composição do óleo de sementes de *Jatropha SSP*. **Revista Bragantia**, Campinas, v. 46, n. 1, 1987.

TOMINAGA, N.; KAKIDA, J.; YASUDA, E. K; SOUSA, L. A. de; RESENDE, P. R.; SILVA, N. D. **Cultivo de pinhão-manso para produção de biodiesel**. Viçosa: CPT, 2007. 220 p.

WINK, M., C. KOSCHMIEDER, M. SAUERWEIN; F. SPORER. Phorbol esters of *Jatropha curcas* - Biological activities and potential applications. In: GÜBITZ, G. M.; MITTELBACH, M; TRABI, M. **Biofuel and industrial products from *Jatropha curcas***. Austria: Dbv-Verlag University of Graz, 1997. p. 160-166.

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**, 2011.

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