

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ALLINE MARIÁ SCHUMANN

**Compostos bioativos no pinhão manso e na mamona:
potencial de utilização de seus subprodutos na alimentação de ovinos**

Piracicaba

2017

ALLINE MARIÁ SCHUMANN

**Compostos bioativos no pinhão manso e na mamona:
potencial de utilização de seus subprodutos na alimentação de ovinos**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear
na Agricultura da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e
no Ambiente**

Orientador: Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla

Piracicaba

2017

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Schumann, Aline Mariá

Compostos bioativos no pinhão manso e na mamona: potencial de utilização de seus subprodutos na alimentação de ovinos / Aline Mariá Schumann; orientador Adibe Luiz Abdalla. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

99 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Análise de alimentos para animal 2. Biodiesel 3. Metabólitos secundários
4. Nutrição animal 5. Subprodutos para animais 6. Sustentabilidade I. Título

CDU 591.53.063 : 636.087.2

Dedico

A minha querida tia Roseli Catarina Schumann Lerenó (*in memoriam*), quem sempre admirei.

Obrigada por todo amor, incentivo e dedicação.

Ofereço

Aos meus pais, Rogério C. Schumann e Ivani Schumann, sem vocês essa conquista, assim

como todas em minha vida, não seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar, iluminar e proteger meu caminho.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e ao Programa de Pós-Graduação do CENA pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla pela orientação, oportunidade, ensinamentos, paciência e confiança ao longo dessa importante etapa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de estudo.

Ao Dr. Helder Louvandini por ter acreditado em mim e sempre incentivado a realização desse trabalho.

À Dra. Alessandra C. Romero pelo auxílio com as análises e pelas discussões e sugestões que certamente contribuíram para o enriquecimento desse trabalho, além da valiosa amizade.

À Dra. Patricia Louvandini e ao Dr. Eduardo A. Bressan pelo auxílio com as análises e pela prontidão para esclarecer todas dúvidas.

Ao Dr. Ronaldo C. Lucas e Dr. Roberto C. F. F. Pompeu por terem concedido a torta de mamona utilizada nesse estudo

Ao prof. Dr. Marcos V. Folegatti e a Rio Pardo Bioenergia AS pela doação das sementes de pinhão manso.

À Dra. Sonia M. S. Piedade pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos profs. Drs. Valdemar L. Tornisielo, Antonio V. O. Figueira, Regina T. R. Monteiro e Geraldo Bortoletto Júnior pela disponibilização de equipamentos para realização desse trabalho.

À Dra. Andressa S. Natel e ao Me. Gabriel Sakita pelas discussões, assistência na condução dos experimentos e por sempre estarem dispostos a ajudar.

A todos os funcionários da biblioteca, em particular a Marília, pelo apoio e auxílio desde o primeiro contato.

Aos técnicos do LANA, Regina Peçanha, Lécio Castilho, Joaquim Everaldo dos Santos e Karinna Scotton.

Aos colegas de Pós-Graduação do LANA: Ana Cláudia K. S. Issakowicz, Adibe L. Abdalla Filho, Carina Nazato, Dinesh Kumar, Egon Hion, Érika B. Canova, Felipe Ortiz, Gleison Souza, Juliano Issakowicz, Letícia A. Faria, Linander Campos, Paulo Tavares, Patrícia Righeto, Sammy Emanuelle, Tairon Pannuzo, e Thiago Bompadre. Obrigada pela ajuda sempre que necessária e pelos bons momentos compartilhados.

As minhas queridas amigas Eliana V. Geremia, Sarah Tenelli, Nathalia Arruda e Nathalia Cavichioli, por estarem comigo nos momentos felizes e difíceis.

À minha família por todo amor e incentivo: meus pais Rogério C. Schumann e Ivani Schumann, meu irmão Gregorry Schumann, meus primos Cristina, Carolina e Paulo Schumann Lereno, e ao meu tio Mario Lereno.

Ao Pitt pelo amor sincero e companheirismo de tantos anos.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

Muito obrigada!!

RESUMO

SCHUMANN, A. M. **Compostos bioativos no pinhão manso e na mamona: potencial de utilização de seus subprodutos na alimentação de ovinos.** 2017. 99 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

A produção de biodiesel vem crescendo ao longo dos anos e com ela o interesse por matérias-primas alternativas para produção. O pinhão manso e a mamona são consideradas promissoras pelo elevado teor de óleo nas sementes e potencial de utilização dos seus subprodutos na alimentação animal. Entretanto, o uso desses subprodutos é limitado devido à presença de ésteres de forbol (EF) no pinhão manso e de ricina na mamona. Nesse sentido, objetivou-se mensurar o teor de EF e ricina nos subprodutos do pinhão manso e da mamona, respectivamente, assim como avaliar o potencial de utilização desses subprodutos na alimentação de ovinos. O estudo foi desenvolvido em três experimentos. No experimento I os EF foram quantificados nas sementes e frações da semente de pinhão manso, assim como nas tortas e óleos após prensagem a frio das respectivas sementes e albumens. Os resultados mostraram que as tortas possuem perfil nutricional interessante para a dieta de ruminantes e que os EF foram concentrados no óleo após a prensagem, sugerindo que tortas com menor teor de óleo residual apresentem menores concentrações de EF. No experimento II, torta de mamona (TM) e torta de pinhão manso (TPM), destoxificada ou não, foram avaliadas em dois níveis de substituição ao farelo soja, 25 e 35% TPM e 25% e 50% TM, sobre os parâmetros de degradabilidade e fermentação ruminal *in vitro*. Após 24 horas de incubação foi observado que inclusão da TM e TPM, destoxificada ou não, não afetou a produção de gases total, a produção de N-NH₃ e ácidos graxos de cadeia curta total (AGCC), indicando que a fermentação ruminal não foi afetada. Contudo, houve redução na concentração dos isoácidos com a inclusão de 50% de TM destoxificada, 35% de TPM e 25% de TPM destoxificada. A produção de metano foi reduzida com a inclusão de 35% de TPM não destoxificada, indicando que a presença de EF pode ter alterado a população de bactérias metanogênicas no líquido ruminal. No experimento III foi avaliada a substituição parcial do farelo de soja pela TM destoxificada sobre a eficiência de utilização dos nutrientes, microbiota ruminal e emissão de metano entérico de ovinos alimentados com esse subproduto. Os animais que receberam a dieta com TM destoxificada consumiram em média 0,59 mg de ricina kg⁻¹ de peso corporal dia⁻¹ e não apresentaram sintomas clínicos de intoxicação sequer alterações nos níveis séricos de enzimas relacionadas a função hepática e renal. A inclusão da TM destoxificada não influenciou no consumo dos animais, porém reduziu a digestibilidade dos nutrientes. A inclusão da TM destoxificada não alterou a síntese microbiana no rúmen, balanço de nitrogênio, parâmetros de fermentação ruminal e população microbiana em relação ao tratamento controle, com exceção do acetato, que aumentou com a inclusão da TM destoxificada, mas não refletiu sobre a emissão de metano ruminal. Apesar do potencial de substituição da torta de mamona destoxificada, a redução na digestibilidade aparente de alguns nutrientes podem refletir na redução do desempenho e aumento da produção de metano por kg de produto animal.

Palavras-chave: Subprodutos do biodiesel. Compostos tóxicos. Alimentação animal. Fermentação ruminal. Metano. Microbiota ruminal.

ABSTRACT

SCHUMANN, A. M. **Bioactive compounds in jatropha curcas and castor beans: potential of utilization of by-products in sheep feeding.** 2017. 99 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

Biodiesel production has been growing over the years and with it the interest for alternative raw materials for production. Jatropha and castor beans are considered to be promising because of the high oil content in seeds and potential of utilization of its by-products in animal feeding. However, these by-products usage is limited due to the presence of phorbol esters (PE) in jatropha and ricin in castor bean. In this sense, the objective was to measure PE and ricin content in by-products of jatropha and castor bean, respectively, as well as to evaluate the potential of utilization of these by-products in sheep feeding. The study was developed in three experiments. In the experiment I, PEs were quantified in seeds and fractions of jatropha seed, as well as in cakes and oils after cold-pressing of respective seeds and albumens. The results showed that the cakes have an interesting nutritional profile for ruminant diet and PEs were concentrated in the oil after pressing, suggesting that cakes with lower residual oil content showed lower PE concentrations. In the experiment II, castor cake (CC) and jatropha cake (JC), detoxified or not, were evaluated at two substitution levels of soybean meal, 25 and 35% of JC and 25% and 50% of CC, on the degradability and ruminal fermentation parameters *in vitro*. After 24 hours of incubation, it was observed that inclusion of CC and JC, detoxified or not, did not affect the total gas production, N-NH₃ and total short chain fatty acids (SCFAs) production, indicating that ruminal fermentation was not affected. However, there was a reduction in isoacid concentration with the inclusion of 50% of detoxified CC, 35% of CC and 25% of detoxified JC. Methane production was reduced with the inclusion of 35% of non-detoxified JC, indicating that the presence of PE may have changed methanogenic bacteria population in the ruminal fluid. In the experiment III was evaluated the partial substitution of soybean meal by detoxified CC on the nutrient use efficiency, ruminal microbiota and enteric methane emission from sheep fed with this by-product. Animals that received diet with detoxified CC consumed on average 0.59 mg of ricin kg⁻¹ body weight day⁻¹ and did not showed clinical symptoms of intoxication even changes in serum levels of enzymes related to liver and renal function. The inclusion of detoxified CC did not influence animal consumption, but it reduced the digestibility of nutrients. The inclusion of detoxified CC did not change rumen microbiota synthesis, nitrogen balance, ruminal fermentation parameters and microbial population in relation to the control treatment, with exception of acetate, which increased with detoxified CC inclusion, but did not reflect on ruminal methane emission. Despite the potential of replacement of detoxified castor cake, the reduction in apparent digestibility of some nutrients may reflect in performance reduction and increase in methane production per kg of animal product.

Keywords: By-products of biodiesel. Toxic compounds. Animal feeding. Ruminal fermentation. Methane. Rumen microbiota.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Biodiesel como fonte de energia renovável.....	15
2.2	Pinhão manso e mamona como fontes alternativas para produção de biodiesel.....	16
2.3	Utilização dos subprodutos do biodiesel na alimentação de ruminantes	16
2.3.1	Pinhão manso.....	17
2.3.1.1	Ésteres de forbol	18
2.3.2	Mamona	19
2.3.2.1	Ricina.....	21
2.3.3	Processos de destoxificação	22
	Referências.....	25
3	CONTEÚDO DE ÉSTERES DE FORBOL NAS SEMENTES E NAS FRAÇÕES DAS SEMENTES DE PINHÃO MANSO (<i>Jatropha curcas</i> L.)	33
3.1	Introdução.....	35
3.2	Material e Métodos.....	36
3.2.1	Diversidade genética entre as amostras.....	36
3.2.2	Caracterização física das sementes	37
3.2.3	Obtenção das frações das sementes	37
3.2.4	Obtenção do óleo e torta	37
3.2.5	Preparo das amostras.....	38
3.2.6	Composição bromatológica	38
3.2.7	Extração e quantificação dos ésteres de forbol.....	38
3.2.8	Quantificação dos ésteres de forbol	39
3.2.9	Análise estatística	39
3.3	Resultados e Discussão.....	40
3.3.1	Diversidade genética	40
3.3.2	Características físicas das sementes.....	41
3.3.3	Composição bromatológica	42
3.3.4	Teor de ésteres de forbol em sementes, frações da semente e em tortas de pinhão manso..	45
3.4	Conclusão	48
	Referências.....	49

4 DEGRADABILIDADE <i>IN VITRO</i> E PRODUÇÃO DE GASES DE DIETAS CONTENDO TORTA DE PINHÃO MANSO (<i>Jatropha curcas</i> L.) E MAMONA (<i>Ricinus communis</i> L.).....	55
4.1 Introdução	57
4.2 Material e Métodos	58
4.2.1 Preparação das dietas.....	58
4.2.2 Animais.....	60
4.2.3 Preparo do inóculo	60
4.2.4 Ensaio <i>in vitro</i> de produção de gases.....	60
4.2.5 Degradabilidade ruminal e características de fermentação	61
4.2.6 Quantificação de ricina e ésteres de forbol.....	63
4.2.7 Análise estatística.....	64
4.3 Resultados e Discussão	64
4.4 Conclusão	70
Referências	70
5 EFICIÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE NUTRIENTES POR OVINOS ALIMENTADOS COM DIETA CONTENDO TORTA DE MAMONA DESTOXIFICADA EM SUBSTITUIÇÃO AO FARELO DE SOJA.....	75
5.1 Introdução	77
5.2 Material e Métodos	78
5.2.1 Ensaio de digestibilidade aparente.....	80
5.2.2 Estimativa da síntese de proteína microbiana por derivados de purina	81
5.2.3 Balanço de nitrogênio.....	82
5.2.4 Emissão de metano entérico.....	82
5.2.5 Parâmetros ruminais.....	83
5.2.6 Parâmetros sanguíneos.....	85
5.2.7 Quantificação de ricina	85
5.2.8 Análise estatística.....	85
5.3 Resultados e Discussão	86
5.4 Conclusão	94
Referências	95
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99

1 INTRODUÇÃO

A dependência por fontes não renováveis para produção de energia e a crescente preocupação com o meio ambiente tem incentivado a busca por fontes alternativas de energia limpas e renováveis. Os biocombustíveis são um bom exemplo e ganharam grande importância por serem fontes renováveis de energia, podendo ser utilizados na substituição parcial ou integral de combustíveis fósseis e auxiliando na redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE).

A produção e o uso de biocombustíveis líquidos no Brasil são uma realidade há algumas décadas, entretanto, a utilização do biodiesel é mais recente e ocorreu por meio da Lei 11.097/2005, a qual estabeleceu níveis mínimos de adição do biodiesel ao diesel. Atualmente a inclusão do biodiesel ao diesel está estabelecida em 8% pela Lei 13.263/2016 que prevê o aumento dos níveis de adição para os próximos anos. Esse aumento pode refletir na demanda de produção e com isso criar oportunidades para diversificação de fontes utilizadas para a produção desse produto.

A soja é a oleaginosa mais utilizada como matéria-prima do biodiesel. Apesar de não possuir maior teor de óleo comparado à outras oleaginosas, a sua principal utilização se deve ao fato do seu processamento industrial ser bem conhecido e estabelecido. No entanto, a preferência pela utilização de matérias-primas que não competem com a indústria de alimentos é mais interessante. Dentre a gama de oleaginosas produzidas no país, o pinhão manso (*Jatropha curcas*) e a mamona (*Ricinus communis*) são consideradas promissoras para produção de biodiesel e se destacam pela proporção de óleo e produtividade, além de serem impróprias ao consumo humano.

Durante a extração do óleo dessas oleaginosas são produzidos subprodutos como a torta ou farelo, os quais devem ter destinação correta para permitir a sustentabilidade da cadeia produtiva do biodiesel. Em geral, esses subprodutos são utilizados como adubo, mas o uso mais interessante é na alimentação animal, visando a redução de custo de produção e almejando a criação de vínculos entre as cadeias de agroenergia e pecuária. Entretanto, o uso de tortas e farelos do pinhão manso e da mamona como alimento alternativo ainda não é viável devido à presença, principalmente, de ésteres de forbol (EF) e ricina respectivamente.

Vários estudos têm sido realizados buscando alternativas para uso desses subprodutos na alimentação animal, seja pela inclusão em níveis não tóxicos na dieta ou pela sua destoxificação. Nesse sentido, esse estudo tem como objetivo (1) quantificar a concentração de EF nas sementes e frações da semente, assim como sua distribuição em tortas e óleo após

prensagem a frio de sementes e albumens de pinhão manso, visando a viabilização de uso na alimentação animal; (2) avaliar o efeito da substituição parcial do farelo de soja pela torta de mamona e de pinhão manso, destoxificada ou não, sobre os parâmetros de degradabilidade e fermentação ruminal *in vitro*; (3) avaliar a influência da substituição parcial do farelo de soja pela torta de mamona destoxificada sobre o consumo, digestibilidade aparente dos nutrientes, síntese de compostos nitrogenados microbianos, balanço de nitrogênio, parâmetros ruminais, microbiota ruminal e emissão de metano entérico de ovinos alimentados com esse subproduto.

O desenvolvimento da pesquisa, os resultados obtidos e as conclusões quanto a esses objetivos são apresentados neste documento na forma de capítulos. No capítulo “Revisão de Literatura” é apresentada a justificativa do tema abordado, envolvendo a produção de biodiesel no Brasil, fontes alternativas para produção de biodiesel no Brasil e os desafios para o uso dos subprodutos do biodiesel na alimentação de ruminantes. No capítulo 3, é apresentado o estudo de caracterização das sementes de pinhão manso, tortas e óleos quanto as concentrações de EF, assim como seu o valor nutricional para utilização na alimentação animal. No capítulo 4, as tortas de pinhão manso e mamona foram avaliadas *in vitro* quanto ao potencial de substituição ao farelo de soja e no capítulo 5, foram descritos os efeitos da inclusão da torta de mamona destoxificada em substituição parcial ao farelo de soja na alimentação de ovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biodiesel como fonte de energia renovável

A crescente preocupação com meio ambiente e o alto preço do petróleo tem sido foco de discussões no Brasil (SOUZA et al., 2015). Nesse contexto, o biodiesel ganhou importância por ser um biocombustível biodegradável derivado de fontes renováveis e capaz de mitigar as emissões de gases de efeito estufa (GEE) e outros materiais particulados. Ademais, o biodiesel pode substituir parcial ou integralmente o óleo diesel (BRASIL, 2007).

Tendo em vista os benefícios do biodiesel, em 2004 foi lançado o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel – PNPB com objetivo de inserir o biodiesel na matriz energética brasileira de maneira sustentável, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional por meio da diversificação de matérias-primas e das regiões produtoras, visando gerar emprego e renda. O uso do biodiesel foi estabelecido pela Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005, a qual estabeleceu a obrigatoriedade da adição de níveis mínimos de biodiesel ao óleo diesel convencional em todo o território nacional (BRASIL, 2007). A partir de 2017, o cronograma de adição progressiva do biodiesel ao diesel passou a ser regido pela Lei 13.263 de 23 de março de 2016 que determina o aumento da adição de biodiesel dos atuais 7% para 8% em 2017, 9% em 2018 e 10% em 2019 (BRASIL, 2016).

A produção de biodiesel cresceu significativamente nos últimos anos, passando de 0,07 milhões de m em 2006 para 3,94 milhões de m em 2015 (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP, 2016a). O aumento dos níveis de adição de biodiesel deve, provavelmente, refletir no aumento da produção desse biocombustível nos próximos anos. Grande parte da produção de biodiesel é proveniente do óleo de soja (77,8%) (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP, 2016b) apesar das inúmeras matérias-primas que podem ser utilizadas para a produção. A utilização preferencial da soja é devido ao seu processamento industrial ser conhecido e estabelecido, baixo custo do processamento e alta disponibilidade (INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA – IPEA, 2012).

Além da soja, existem outras matérias-primas utilizadas para a produção do biodiesel, como o algodão, mamona, pinhão manso, dendê, entre outras oleaginosas, bem com a gordura animal e o óleo residual (BRASIL, 2013). Embora o país desfrute de uma vasta variedade de culturas para a produção do biodiesel, muitas ainda possuem caráter extrativista.

Culturas destinadas à produção de biodiesel devem preferencialmente ser impróprias ao consumo humano, a fim de evitar qualquer competição e consequentemente aumento do preço devido ao crescimento da demanda (GARCILASSO, 2014). Como exemplo, o pinhão manso e a mamona são duas oleaginosas impróprias para o consumo e com alta produtividade de óleo. Todavia, para que ocorra o sucesso na utilização dessas plantas assim como de outras na cadeia do biodiesel, são necessários investimentos em pesquisas e avanços tecnológicos para alcançar a viabilidade econômica de produção (SOUZA et al., 2015).

2.2 Pinhão manso e mamona como fontes alternativas para produção de biodiesel

O pinhão manso e a mamona são vistos como matérias-primas promissoras para a produção de biodiesel. Entretanto, a inserção dessas matérias-primas na cadeia do biodiesel não é simples e vários desafios técnicos e científicos em relação à cultura devem ser superados (ANTONIOSI; MAINTINGUER, 2016). Além disso, a produção de biodiesel gera um grande volume de resíduos (torta, farelo e cascas), que com a expansão da cadeia de produção do biodiesel necessitarão de uma destinação correta e preferencialmente sustentável.

A utilização dos resíduos da extração do óleo é importante para a sua valorização (ABDALLA et al., 2008). Diversos estudos têm sido realizados para investigar o potencial de uso da torta e farelo provenientes da extração do óleo na nutrição animal. A introdução desses resíduos na alimentação animal visa aumentar a produtividade e ao mesmo tempo agregar valor aos sub produtos (ABDALLA et al., 2008; BOMFIM; SILVA; SANTOS, 2009).

2.3 Utilização dos subprodutos do biodiesel na alimentação de ruminantes

Conforme já mencionado, os subprodutos são alternativas alimentares que possibilitam a redução dos custos de produção por meio da substituição de alguns ingredientes onerosos da ração e, quando utilizados adequadamente, tornam-se promissores e economicamente viáveis aos sistemas de produção animal (URBANO et al., 2012; POMPEU et al., 2012; SOUZA et al., 2016).

A torta e farelo de pinhão manso e da mamona apresentam elevados teores de proteína (25-60% e 39-43%, respectivamente) (ABDALLA et al., 2008) e podem ser uma alternativa de alimento importante na substituição de ingredientes proteicos de alto custo na ração. Todavia, existem componentes antinutricionais (fitatos e inibidores de tripsina) e compostos tóxicos (ésteres de forbol e ricina) (HELLER, 1996; MAKKAR et al., 1997; SEVERINO,

2005; MARTÍNEZ-HERRERA et al., 2006) que inviabilizam o uso como alimento sem antes passarem por processos de destoxificação dos mesmos (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010a; POMPEU et al., 2012).

2.3.1 Pinhão manso

O pinhão manso (*Jatropha curcas*) é uma planta oleaginosa pertencente à família das Euphorbiaceae, originário da América Central e distribuída em todas as regiões tropicais (HELLER, 1996). No Brasil, a espécie é encontrada em diversas regiões, principalmente Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009).

A vasta distribuição geográfica do pinhão manso é atribuída à sua rusticidade, resistência a seca, baixa exigência em fertilidade do solo e tolerância a altas temperaturas, entretanto susceptível ao frio. O pinhão manso se desenvolve em solos arenosos, salinos, alcalinos e pedregosos e sobrevive em condições adversas, porém com redução na produtividade. Seu desenvolvimento é favorecido em altas temperaturas e umidade e em solos férteis (HELLER, 1996; RESENDE et al., 2009).

O pinhão manso é uma pequena árvore que pode atingir de 5 a 7 m de altura. Possui ciclo de vida perene e crescimento rápido (HELLER, 1996). Possui uma raiz principal profunda e quatro secundárias simétricas (CARELS, 2009), caule liso e pouco resistente. As folhas são verdes e alternadas. Apresenta floração monóica (flores masculinas e femininas) na mesma planta, mas com sexo separado. Os frutos são do tipo cápsula trilocular com uma semente em cada lóculo (HELLER, 1996; KUMAR; SRIVASTAVA; JHA, 2016). As sementes são pretas com 2 cm de comprimento e 1 cm de largura. Pesam entre 0,5 a 0,86 g (CONTRAN et al., 2013; MAKKAR, 2016) sendo que 30 – 45% do peso da semente compreendem a casca e 55 – 70% o albúmen (CONTRAN et al., 2013; RESENDE et al., 2009). Alguns trabalhos sugerem que a produção de semente pode chegar a 4 - 5 t ha⁻¹, com rendimento de 1,5 t ha⁻¹ de óleo (KING et al., 2009). As sementes e albumens são ricos em óleo, com 25 – 30%, e 50 – 60% respectivamente (MAKKAR, 2016).

A extração do óleo das sementes e albumens para produção de biodiesel pode ser realizada por diferentes processos, os quais geram diferentes tipos de subprodutos. O farelo é obtido da extração por solvente, no qual até 99,3% do óleo é extraído, enquanto a torta é proveniente da extração mecânica utilizando prensa hidráulica ou “expeller” e extrai até 75% de óleo (OFORI-BOATENG; TEONG; JITKANG, 2012).

A torta da semente gerada a partir da extração do óleo representa 45 a 70% do peso das sementes prensadas (GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014; MAKKAR; BECKER, 2009). Essa torta possui elevado valor nutricional e alto teor de aminoácidos essenciais (MAKKAR; BECKER, 2009). O teor de proteína na torta e farelo varia entre 28 e 58% (MAKKAR et al., 1997; ÍTAVO et al., 2015), dependendo do método de extração.

O principal fator tóxico do pinhão manso responsável pela limitação do seu uso são os ésteres de forbol (EF) (HELLER, 1996; GÜBITZ; MITELBBACH; TRABI, 1999; CHIVANDI et al., 2004; MAKKAR, 2016) uma vez que os fatores antinutricionais como inibidores de tripsina, lectinas e fitatos podem ser atenuados. Os inibidores de tripsina e lectinas podem ser inativados por meio de tratamento térmico enquanto os efeitos dos fitatos podem ser atenuados com o acréscimo de fitase na ração animal (MAKKAR, 2016). No caso dos EF, a detoxificação não é tão simples assim.

A detoxificação dos EF presentes na torta ou farelo do pinhão manso é necessária para sua utilização na alimentação animal e vital para viabilidade, sustentabilidade e aceitação no sistema de produção da cadeia do biodiesel (FRANCIS; EDINGER; BECKER, 2005). A inclusão da torta ou farelo destoxificada na alimentação animal poderia minimizar os gastos com a alimentação animal quando utilizado na substituição de fontes proteicas como farelo de soja e caroço de algodão (KASUYA et al., 2012).

2.3.1.1 Ésteres de forbol

Os EF são compostos restritos às plantas da família das Euphorbeaceae e Thymelaeaceae (GOEL et al., 2007). Ocorrem naturalmente na planta e estão associados aos mecanismos de defesa (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2012). São encontrados distribuídos em quase todas as partes da planta com exceção do látex (HELLER, 1996; MAKKAR et al., 2009). Nas sementes foram identificados seis diferentes tipos de EF, todos isolados a partir do óleo (HAAS; STERK; MITTELBBACH, 2002), entretanto é sabido da existência de mais EF estruturalmente conhecidos, mas ainda não identificados (GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014). O EF mais estudado é o tetradecanoil-forbol-acetado (TPA) devido à sua atividade promotora de tumores (DEVAPPA et al., 2013).

A principal ação dos EF é nas membranas biológicas, tendo como principal alvo os receptores fosfolipídicos da membrana, modificando sua atividade com relação a entrada de nutrientes e adesão celular, induzindo a formação do ácido araquidônico e a síntese de prostaglandinas, inibição do fator de crescimento epidérmico aos receptores da superfície

celular e altera o metabolismo lipídico. Os EF também atuam como análogo do diacilglicerol (DAG), ativador da proteína quinase C. A força de ativação entre a proteína e a enzima é mais forte, desencadeando proliferação celular e induzindo a promoção de tumores (GOEL et al., 2007).

Os teores de EF nas sementes, óleo e subprodutos apresentam uma ampla variação (0,62 – 8,97 mg g⁻¹) (MAKKAR; MARTINEZ-HERRERA; BECKER, 2008; FERRARI et al., 2009). Apesar do pinhão manso ser tóxico, existem acessos com baixos teores de EF (0,11 mg g⁻¹ na semente) considerados atóxicos, com distribuição restrita a regiões do México (AREGHEORE; MAKKAR; BECKER, 1998; BASHA et al., 2009). Embora as sementes desses acessos apresentem teores de EF muito baixos, os fatores antinutricionais como lectina, fitatos e inibidores de tripsina estão presentes nestes acessos (MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998).

Os efeitos dos EF variam de acordo com a concentração do extrato, modo de administração e organismo (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010a). Os EF são facilmente absorvidos por ingestão e via dérmica (BECKER; MAKKAR, 1998). Podem agir de forma aguda, provocando inflamação intensa, ou crônica, por meio da promoção de tumores pela ativação da enzima quina C no organismo (MAKKAR et al., 1997). Os principais sintomas relatados após a ingestão de sementes ou contato com a pele em humanos são de vertigem, vômitos, dor no estomago, diarreia aquosa ou sanguinolenta e conjuntivite, quando há exposição dos olhos (YUNPING et al., 2012; GUPTA et al., 2016). Em animais, foram observados redução no consumo e ganho de peso, hemorragia no trato gastrointestinal, diarreia, anemia, lesões no fígado e morte (MAKKAR, 2016).

Para utilização do pinhão manso e dos subprodutos da extração do óleo na alimentação animal, estes devem passar por processos de destoxificação uma vez que mesmo em baixas concentrações são tóxicos para o consumo (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010b).

2.3.2 Mamona

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa pertencente à família Euphorbiaceae cuja origem não está bem definida, mas a maioria dos pesquisadores acreditam ser originária da Ásia (FORNAZIERI JUNIOR, 1986). A cultura foi introduzida no Brasil durante a colonização portuguesa e pode ser encontrada em quase todo o território (RAMOS; AMORIM; SAVY FILHO, 2006; BELTRÃO; OLIVEIRA, 2009).

A mamoneira é uma planta considerada rústica e tolerante à seca, embora o clima ideal

seja o quente e úmido. Desenvolve-se em qualquer tipo de solo, exceto os com textura argilosa (BELTRÃO et al., 2007). O sistema radicular é pivotante e as raízes fistulosas. O caule possui cor variável, podendo ser verde, arroxeado ou vermelho. As folhas são simples e grandes. É uma planta monoica, com flores femininas e masculinas na mesma planta. O fruto é uma cápsula lisa ou com papilas (espinhos), de coloração verde a vermelha e cinza quando maduro. As sementes possuem cor, forma, tamanho, peso e proporção do tegumento variável (BELTRÃO; AZEVEDO, 2007).

As sementes contêm entre 45% e 55% de óleo, o qual é de cor amarelo claro, com odor suave e alta viscosidade (MOHAMED; MURSY, 2015). O óleo é composto por 90% de ácido ricinoléico, um ácido graxo de 18 carbonos formado por um grupo carbonila no primeiro carbono, uma instauração no 9º carbono e um grupo hidroxila no 12º carbono (WETTASINGHE et al., 2013; SILVA et al., 2015), que lhe confere características vantajosas em relação à outros óleo como estabilidade em altas temperaturas e solubilidade em álcool. Entretanto, a presença do grupo hidroxilia promove alta viscosidade e densidade ao óleo e ao biodiesel, sendo essa característica um fator limitante para o uso do óleo na produção de biodiesel, uma vez que não atende as exigências de qualidade estabelecidas (SUAREZ; MENEGHETTI; FERREIRA, 2006; DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009; SUAREZ et al., 2009). Assim, o óleo de mamona tem sido destinado à diversas aplicações na indústria química como na fabricação de detergentes, cosméticos, tintas, vernizes, ceras, lubrificantes para motores, materiais plásticos, entre outros usos (BALDONI et al., 2011; FONSECA; SOTO-BLANCO, 2014; CAMPOS; SANTOS, 2015).

A extração do óleo das sementes pode ser realizada por dois processos, prensagem mecânica ou prensagem seguido por extração com solvente, e geram como subprodutos a torta e o farelo (OGUNNIYI, 2006). A torta resultante da extração do óleo possui teor médio de proteína bruta de 34,5% (SILVA et al., 2014), o que faz dele um alimento concentrado proteico. Embora os subprodutos apresentem potencial para utilização na nutrição animal substituindo alimentos tradicionais proteicos, a presença de compostos tóxicos, principalmente da ricina, limitam seu uso (OLIVEIRA et al., 2010), sendo aproveitados apenas como fertilizantes até o momento (BALDONI et al., 2011).

Além da ricina, ricinina e o complexo alergênico são outros componentes tóxicos na semente. A ricinina é um alcaloide encontrado em todas as partes da planta, porém em concentrações diferentes entre elas; com toxicidade semelhante à ricina, é encontrada em baixas concentrações nas sementes (~ 0,03%). Para o complexo alergênico, não foi constatado a ocorrência de reações alérgicas em animais (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2009).

2.3.2.1 Ricina

A ricina é uma glicoproteína encontrada em todas as partes da planta, mas é na semente onde encontra-se em maior concentração. É considerada como uma das mais potentes e mortais toxinas vegetais (ASLANI et al., 2007; EFSA, 2008). Acredita-se que a principal função da ricina nas sementes é impedir a predação durante o estado de aquiescência (WETTASINGHE et al., 2013).

A ricina é uma proteína heterodimérica inativadora de ribossomos (DI COLA et al., 2005) do tipo 2 (RIP-2), produzida durante o desenvolvimento das sementes (WETTASINGHE et al., 2013). Ela possui uma cadeia A associada a uma ou mais cadeias B por uma ligação dissulfeto (ROBERTS; SMITH, 2004). A cadeia A está associada a capacidade de inativar irreversivelmente os ribossomos das células eucarióticas e a cadeia B por ajudar a promover a entrada do complexo AB para o citosol através da endocitose (MUSSHOFF; MADEA, 2009). No citosol podem ocorrer três caminhos diferentes: no primeiro, os endossomas contendo ricina são transportados para o complexo de Golgi onde serão transportados de forma retrógrada para o retículo endoplasmático rugoso; no segundo, algumas moléculas podem voltar para a superfície celular por exocitose; e no terceiro, as moléculas podem ser encaminhadas para os lisossomos onde serão degradadas (RAPAK; FALNES; OLSNES, 1997).

As concentrações de ricina nas sementes de mamona podem apresentar grandes variações entre os cultivares (0,1 a 20,5 mg g⁻¹) (ROMERO, 2013; SCHIELTZ et al., 2015). A intoxicação por ricina via oral varia de acordo com a susceptibilidade das espécies animais e dose. Os equinos são os animais mais susceptíveis a intoxicação, enquanto os ovinos, bovinos e suínos são intermediários e frangos mais resistentes. A intoxicação também varia de acordo com a via de exposição. Por exemplo, a dose letal via oral para camundongos é cerca de 1000 vezes maior que a dose letal de intoxicação via parenteal ou inalatória. Fonseca e Soto-Blanco (2014), sugerem que a baixa toxidez da ricina quando ingerida via oral comparada à outras vias de intoxicação pode ser devido à baixa capacidade de absorção da ricina no intestino.

Animais ruminantes mostraram-se mais tolerantes quando adaptados à adição de doses crescentes de ricina durante períodos prolongados. Nesse caso, novilhas mostraram-se tolerantes a ingestão de 15 - 20 mg kg⁻¹ PC por dia de ricina e ovelhas a 1,4 mg kg⁻¹ PC por dia (EFSA, 2010).

Os sinais e sintomas clínicos associados com a intoxicação por ricina assim como as manifestações patológicas variam com a dose e a via de exposição. De maneira geral, os sintomas iniciais de intoxicação começam a aparecer cerca de 8 horas após a inalação e após a ingestão aparecem em menos de 6 horas. A morte por envenenamento pode ocorrer entre 36 – 72 horas após a exposição. Os principais sintomas clínicos após a exposição são vômito, diarreia muco-sanguinolenta, desidratação, convulsão, sudorese, sangue na urina e taquicardia. O tratamento para exposição à ricina consiste apenas em aliviar os sintomas uma vez que não existe antídoto (MUSSHOFF; MADEA, 2009).

2.3.3 Processos de destoxificação

Diversos grupos de pesquisa em nutrição animal vêm desenvolvendo ao longo dos anos métodos para destoxificação das tortas e farelos de pinhão manso e mamona. Em geral, esses métodos necessitam de várias etapas, equipamentos e/ou reagentes específicos, além de altas temperaturas e pressão.

Embora alguns métodos de destoxificação sejam capazes de degradar ou inativar parcialmente ou totalmente os compostos tóxicos presentes nas tortas e farelos do pinhão manso e mamona, são tecnologias onerosas e difíceis de serem aplicadas em escala industrial.

2.3.3.1 Processos de destoxificação do pinhão manso

Apesar dos EF serem considerados os principais compostos tóxicos presentes no pinhão manso, a existência de fatores antinutricionais também limita seu uso como alimento. A destoxificação da torta e farelo não deve visar apenas a inativação dos EF, mas também dos fatores antinutricionais (WANG et al., 2013).

Guedes et al. (2014) testaram diferentes proporções de metanol e etanol (0-100%) combinados com diferentes tempos de extração e relação soluto:solvente. O tratamento realizado com 50% de metanol durante 8 h de extração e proporção de 1:10 (p:v) soluto:solvente foi capaz de reduzir a concentração de EF em 97,3% e a torta foi considerada atóxica com 0,10 mg g⁻¹ de EF. Contudo, não foi avaliada a presença de fatores antinutricionais presentes na torta de pinhão manso.

Aregheore, Becker e Makkar (2003) combinaram métodos químicos e térmicos na destoxificação do farelo de albúmen e verificaram que a autoclavagem a 121°C por 30 min associada a lavagens com metanol reduziu os EF a níveis considerados toleráveis

(0,09 mg g⁻¹). No entanto, a inclusão de 16% dessa torta destoxificada na dieta de ratos resultou na diminuição do consumo e da taxa de crescimento. Mesmos assim, os autores consideraram um método promissor, porém muito caro.

Sudake et al. (2013) não obtiveram bons resultados na destoxificação química do pinhão manso. O processo foi realizado utilizando cal seguido por extrusão. Vacas foram alimentadas com concentrado contendo 4% de torta destoxificada e apresentaram perda de peso. Apesar da concentração dos EF não ser apresentada, os autores concluíram que o processo de destoxificação com cal não foi capaz de remover completamente todos os fatores antinutricionais e os EF da torta.

Berenchtein et al. (2016) avaliaram a inclusão da torta de pinhão manso destoxificada industrialmente na alimentação de suínos. A torta destoxificada continha 0,06 mg g⁻¹ de EF e foi incluída na dieta ao nível de 7,7%. Os animais não apresentaram sintomas de intoxicação, mas a digestibilidade da proteína foi menor quando comparada a outras tortas de oleaginosas. Possivelmente, os fatores antinutricionais que prejudicam a digestibilidade dos nutrientes não foram inativados e provavelmente a torta não foi destoxificada totalmente.

Devappa e Swamylingappa (2008) encontraram resultados promissores em isolados proteicos da torta do albúmen e da semente. Em ambos os isolados, os EF foram removidos completamente e os fatores antinutricionais reduzidos, além de melhora das características nutricionais.

Kasuya et al. (2012) estudaram a destoxificação biológica da torta da semente do pinhão manso a partir de cepas de *Pleurotus ostreatus* e observaram após 45 dias de incubação a degradação de 99% dos EF assim como a redução nos teores de taninos e ácido fítico. Os autores realizaram um ensaio *in vitro*, onde observaram o aumento da degradabilidade ruminal da torta tratada, e um ensaio *in vivo*, no qual a inclusão até 20% da torta destoxificada na dieta de cabras não proporcionou efeitos adversos.

Os efeitos da radiação gama também foram testados na destoxificação da torta de pinhão manso e mostraram-se promissores. Gogoi, Niyogi e Tyagi (2014) observaram que a exposição da torta a 50 kCi reduziu a concentração dos EF de 0,29 mg g⁻¹ para 0,064 mg g⁻¹ (redução equivalente a 97,6%) e que ao adicionar 100% água foi possível reduzir a dose da radiação para 30 kCi e reduzir a concentração de EF para 0,07 mg g⁻¹.

2.3.3.2 Processos de destoxificação da mamona

A torta e o farelo de mamona também são subprodutos da cadeia do biodiesel com potencial uso na alimentação animal, no entanto, a presença de ricina limita a sua utilização para esse fim. Anandan et al. (2005) investigaram o efeito de tratamentos térmicos (imersão, fervura, cozimento, autoclavagem e aquecimento) e químicos (tratamento com cloreto de sódio, hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio, amônia e tanino) de destoxificação sobre o teor de ricina presente na torta da mamona. Dentre todos os tratamentos estudados, dois foram capazes de degradar completamente a ricina presente na torta, a autoclavagem a 15 psi por 60 min e a solução de hidróxido de sódio por 8 h.

Furtado et al. (2012) também testaram métodos químicos (calcário calcítico, fosfato monobalcálcico e ureia) e físico (autoclavagem a 15 psi por 60 min) para destoxificação da torta de mamona e observaram que nenhum tratamento foi capaz de promover o completo remoção da ricina. Os autores verificaram ainda que a inclusão da até 8% da torta bruta (sem tratamento) na ração total de ovinos não proporcionou reduções expressivas de consumo e digestibilidade, sugerindo sua utilização como alimento proteico alternativo.

Oliveira et al. (2007) relataram que a diferença na eficácia de métodos de destoxificação utilizando hidróxido de cálcio e autoclavagem podem estar relacionadas a fatores como genótipos de mamona, processos de extração do óleo, purezas dos agentes alcalinizantes, água em quantidades adequadas, entre outros.

Barnes, Baldwin e Braasch (2009) também verificaram diferenças na eliminação de ricina entre amostras de sementes íntegras, trituradas, prensadas a frio e prensadas a quente. As tortas obtidas por prensagem a quente foram completamente destoxificadas após a prensagem, enquanto que nas tortas prensadas a frio a ricina continuou presente e só foi eliminada após serem submetidas a tratamentos como fervura ou autoclavagem, ambos eficientes a partir de 10 min. A eliminação da ricina nas sementes íntegras foi obtida após fervura por 20 min ou quando foi utilizada autoclavagem durante 30 min, enquanto que nas sementes trituradas a fervura não foi eficiente em nenhum dos tempos testados, contudo a autoclavagem durante 10 min foi suficiente para a completa remoção da ricina. Os autores explicaram que durante a fervura das sementes trituradas, o óleo presente na semente pode ter servido como uma barreira que impediu o calor de desnaturar completamente as proteínas, permitindo que a ricina se mantivesse intacta. A autoclavagem provavelmente não mostrou o mesmo comportamento, pois o calor e a pressão são muito maiores comparados à fervura, criando um ambiente mais severo.

Para Oliveira (2008), existem diversos trabalhos utilizando diferentes métodos de destoxificação da torta e farelo de mamona com resultados promissores. Entretanto, a viabilidade operacional e econômica, assim como o desempenho desses alimentos sob a ótica da nutrição animal são necessários.

Referências

ABDALLA, A. L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. esp., p. 260–268, 2008.

ANANDAN, S. et al. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 120, n. 1–2, p. 159–168, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo Gás Natural e Biocombustível**. Rio de Janeiro: ANP, 2016a. 264 p.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. Boletim Mensal dos Biocombustíveis, n. 4, p. 2016b. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/documents/10584/3342640/Boletim+DBio+no+104+outubro+de+2016.pdf/40240778-7e81-4ccd-b927-5d0477aadeba>>. Acesso em: 24 jan. 2017.

ANTONIOSI, L.; MAINTINGUER, S. I. Políticas públicas e dinâmicas de mercado aplicadas à produção de biodiesel no Brasil: uma visão do marco regulatório e do selo combustível social. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, Araraquara, v. 19, n. 1, p. 9–26, 2016.

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

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

ASLANI, M. R. et al. Castor bean (*Ricinus communis*) toxicosis in a sheep flock. **Toxicon**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 400–406, 2007.

BALDONI, A. B. et al. Variability of ricin content in mature seeds of castor bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 46, n. 7, p. 776–779, 2011.

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

BASHA, S. D. et al. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, Shannon, v. 176, n. 6, p. 812–823, 2009.

BECKER, K.; MAKKAR, H. P. S. Effects of phorbol esters in carp (*Cyprinus carpio* L). **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 40, n. 2, p. 82–86, 1998.

BELTRÃO, N. E. de M.; AZEVEDO, D. M. P. de. Fitologia. In: AZEVEDO, D. M. P. de; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). **Agronegócio da mamona no Brasil**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Algodão, 2007. cap. 5, p. 117–137.

BELTRÃO, N. E. M. et al. Clima e solo. In: AZEVEDO, D. M. P. de; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. 2. ed. Brasília: Embrapa Algodão, 2007. cap. 3, p. 71–93.

BELTRÃO, N. E. de M.; OLIVEIRA, M. I. P. de. **Detoxicação e aplicações da torta de mamona**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009. 35 p. (Documentos, 217).

BERENCHTEIN, B. et al. Nutritional evaluation and effectiveness of detoxified *Jatropha curcas* Kernel meal in finishing pig diets on biogas and methane production from slurry. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, Vails Gate, v. 11, n. 3, p. 100-107, 2016.

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

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Plano Nacional de Energia 2030**. Brasília, DF: Empresa de Pesquisa Energética, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Benefícios ambientais da produção e do uso do biodiesel**. Brasília, DF, 2013. 33 p.

BRASIL. Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016. Altera a Lei nº 13.033 sobre percentuais de adição do biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 mar. 2016. Seção 1, p. 1.

CAMPOS, E. S. C.; SANTOS, V. M. L. Estudo do processo de extração de óleo de mamona em cooperativas do pólo São Francisco. **Engevista**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 477-490, 2015.

CARELS, N. *Jatropha curcas*. A review. **Advances in Botanical Research**, London, v. 50, n. 8, p. 39–86, 2009.

CHIVANDI, E. et al. Effect of processing method on phorbol esters concentration, total phenolics, trypsin inhibitor activity and the proximate composition of the Zimbabwean *Jatropha curcas* Provenance: A potential livestock feed. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 7, n. 6, p. 1001–1005, 2004.

CONTRAN, N. et al. State-of-the-art of the *Jatropha curcas* productive chain: From sowing to biodiesel and by-products. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 202–215, 2013.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.

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

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha* toxicity -A review. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, Nairobi, v. 13, n. 6, p. 476–507, 2010a.

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

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Localisation of antinutrients and qualitative identification of toxic components in *Jatropha curcas* seed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 92, n. 7, p. 1519–1525, 2012

DEVAPPA, R. K. et al. Ocular and dermal toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 94, p. 172–178, 2013.

DI COLA, A. et al. Endoplasmic reticulum-associated degradation of ricin A chain has unique and plant-specific features. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, n. 1, p. 287–96, 2005.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on ricin (from *Ricinus communis*) as undesirable substances in animal feed: (Question N° EFSA-Q-2003—062). **The EFSA Journal**, Parma, v. 726, p. 1–38, 2008.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants on the abiotic risks for public and animal health of glycerine as co-product from the biodiesel production from Category 1 animal by-products (ABP) and vegetable oils. **EFSA Journal**, Parma, v. 8, n. 12, p. 1–22, 2010.

FERRARI, R. A. et al. Avaliação da composição química e de constituinte tóxico em acessos de pinhão-mansão de diferentes origens. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, n. 4, p. 309–314, 2009.

FONSECA, N. B. D. S.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade da ricina presente nas sementes de mamona. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 1415–1424, 2014.

FORNAZIERI JUNIOR, A. **Mamona**: uma rica fonte de óleo e de divisas. São Paulo: Icone, 1986. 69 p.

FRANCIS, G.; EDINGER, R.; BECKER, K. A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. **Natural Resources Forum**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 12–24, 2005.

FURTADO, R. N. et al. Valor nutritivo de dietas contendo torta de mamona submetida a métodos alternativos de destoxificação para ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 1, p. 155–162, 2012.

GARCILASSO, V. P. **Análise entre processos e matérias-primas para a produção de biodiesel**. 2014. 373 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Energia e Ambiente, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

GOEL, G. et al. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, Washington, Dc, v. 26, n. 4, p. 279–288, 2007.

GOGOI, R.; NIYOGI, U. K.; TYAGI, A. K. Reduction of phorbol ester content in *Jatropha* cake using high energy gamma radiation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, Cairo, v. 7, n. 3, p. 305–309, 2014.

GÜBITZ, G.; MITELBBACH, M.; TRABI, M. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource Technology**, Barking, v. 67, n. 1, p. 73–82, 1999.

GUEDES, R. E. et al. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake using chemical treatment: Analysis with a central composite rotatable design. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 52, p. 537–543, 2014.

GUPTA, A. et al. Acute accidental mass poisoning by *Jatropha curcas* in Agra, North India. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, Cairo, v.6, n. 4, p. 496-500, 2016.

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

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

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA - IPEA. **Biodiesel no Brasil: desafios das políticas públicas para a dinamização da produção**. Brasília, DF, 2012. 22 p. (Comunicados do Ipea, 137).

ÍTAVO, L. C. V. et al. Calorimetry, chemical composition and in vitro digestibility of oilseeds. **Food Chemistry**, Barking, v. 185, p. 219–225, 2015.

KASUYA, M. C. M. et al. Bio-detoxification of *Jatropha* seed cake and its use in animal feed. In: FANG, Z. (Ed.). **Biodiesel - Feedstocks, production and applications**. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. cap. 11, p. 309–330.

KING, A. J. et al. Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 10, p. 2897–2905, 2009.

KUMAR, P.; SRIVASTAVA, V. C.; JHA, M. K. *Jatropha curcas* phytotomy and applications: Development as a potential biofuel plant through biotechnological advancements. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 59, p. 818–838, 2016.

MAKKAR, H. P. S. State-of-the-art on detoxification of *Jatropha curcas* products aimed for use as animal and fish feed: A review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 222, p. 87–99, 2016.

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

MAKKAR, H. P. S.; 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**, Barking, v. 62, n. 2, p. 207–215, 1998.

MAKKAR, H. P. S.; MARTINEZ-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**, Chicago, v. 3, n. 4, p. 260–265, 2008.

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

MAKKAR, H. P. S. et al. Removal and degradation of phorbol esters during pre-treatment and transesterification of *Jatropha curcas* oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 86, n. 2, p. 173–181, 2009.

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

MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. **Uso potencial e toxidez da torta de pinhão manso**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. 8 p. (Comunicado Técnico, 1).

MOHAMED, M. H.; MURSY, H. M. Improving quantity and quality of castor bean oil for biofuel growing under severe conditions in Egypt. **Energy Procedia**, Oxford, v. 68, p. 117–121, 2015.

MUSSHOFF, F.; MADEA, B. Ricin poisoning and forensic toxicology. **Drug Testing and Analysis**, Chichester, v. 1, n. 4, p. 184–191, 2009.

OFORI-BOATENG, C.; KEAT TEONG, L. K.; JITKANG, L. Comparative energy analyses of *Jatropha curcas* oil extraction methods: Solvent and mechanical extraction processes. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 55, p. 164–171, 2012.

OGUNNIYI, D. Castor oil: A vital industrial raw material. **Bioresource Technology**, Barking, v. 97, n. 9, p. 1086–1091, 2006.

OLIVEIRA, A. S. et al. Eficácia de diferentes métodos de destoxificação da ricina no farelo de mamona. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA E PRODUÇÃO DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: MCT/ABIPTI, 2007. p. 1–6.

OLIVEIRA, A. S. **Co-produtos da extração do óleo de sementes de mamona e girassol na alimentação de ruminantes**. 2008. 166 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

OLIVEIRA, A. S. et al. *In vitro* ruminal degradation of ricin and its effect on microbial growth. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 157, n. 1–2, p. 41–54, 2010.

POMPEU, R. C. F. F. et al. Desempenho produtivo e características de carcaça de ovinos em confinamento alimentados com rações contendo torta de mamona destoxificada em substituição ao farelo de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 3, p. 726–733, 2012.

RAMOS, N. P.; AMORIM, E. P.; SAVY FILHO, A. Potencial de uso da cultura da mamona como fonte de matéria-prima para o programa nacional de produção e uso de biodiesel. In: CÂMARA, G. M. de S.; HEIFFIG, L. S. (Coord.). **Agronegócio de plantas oleaginosas: matérias-primas para biodiesel**. Piracicaba: ESALQ/USP/LPV, 2006. p. 81–104.

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

RESENDE, J. C. F. D. et al. Pinhão manso. In: MONTEIRO, J. E. B. A. **Agrometeorologia dos cultivos: O fator meteorológico na produção agrícola**. Brasília, DF: Instituto Nacional de Meteorologia, 2009. cap. 27. p. 467–476.

ROBERTS, L. M.; SMITH, D. C. Ricin: The endoplasmic reticulum connection. **Toxicon**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 469–472, 2004.

ROMERO, A. de C. **Resíduo da produção de biodiesel: Avaliação de moléculas bioativas e potencial de aplicação na alimentação animal**. 2013. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SCHIELTZ, D. M. et al. Quantification of ricin, RCA and comparison of enzymatic activity in 18 *Ricinus communis* cultivars by isotope dilution mass spectrometry. **Toxicon**, Oxford, v. 95, p. 72–83, 2015.

SEVERINO, L. S. **O que sabemos sobre a torta da mamona**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 32 p. (Documentos, 134).

SILVA, L. M. et al. Comparative expression profiles of genes related to oocyte development in goats after long-term feeding with biodiesel castor industry residues. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 148, n. 1–2, p. 32–41, 2014.

SILVA, J. A. C. et al. Enzymatic production and characterization of potential biolubricants from castor bean biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 122, p. 323–329, 2015.

SOUZA, C. F. et al. Casca de banana em dietas para vacas mestiças em lactação. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 17, n. 1, p. 86–100, 2016.

SOUZA, V. H. A. et al. Análise do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB): Resultados e Críticas. **Revista de Administração Geral**, Macapá, v. 1, n. 1, p. 23–41, 2015.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; FERREIRA, V. F. O biodiesel e a política de C & T brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1157-1158, 2006.

SUAREZ, P. A. Z. et al. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009.

SUDAKE, K. S. et al. Feed intake, digestibility, rumen fermentation pattern and blood biochemical profile of growing crossbred calves fed lime treated *Jatropha* (*Jatropha curcas*) cake. **Livestock Research International**, Nairobi, v. 1, p. 8–17, 2013.

URBANO, S. A. et al. Substituição do feno de tifton pela casca de mamona na dieta de ovinos: componentes não-carcaça. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 6, p. 1649-1655, 2012.

WANG, X. H. et al. Detoxification of *Jatropha curcas* kernel cake by a novel *Streptomyces fimicarius* strain. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 260, p. 238–246, 2013.

WETTASINGHE, R. C. et al. Relative quantitation of ricin in *Ricinus communis* seeds by image processing. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 50, p. 654–660, 2013.

YUNPING, B. et al. Light induced degradation of phorbol esters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 84, p. 268–273, 2012.

3 CONTEÚDO DE ÉSTERES DE FORBOL NAS SEMENTES E NAS FRAÇÕES DAS SEMENTES DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)

Resumo: O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma oleaginosa considerada promissora para produção de biodiesel e destaca-se pela qualidade de óleo e produtividade. Devido à presença de ésteres de forbol (EF) nas sementes, óleo e subprodutos são considerados impróprios ao consumo humano. Métodos de destoxificação da torta têm sido amplamente estudados pela comunidade científica, entretanto, ainda não se obteve sucessos em destoxificar por completo a torta com possibilidade de aplicação na indústria. Dessa maneira, buscando contribuir com esses estudos, o presente trabalho teve como objetivo quantificar as concentrações de EF nas sementes e frações da semente, assim como sua distribuição na torta e óleo após prensagem a frio de sementes e albumens, visando a possibilidade de uso na alimentação animal. Foram utilizadas quatro amostras de sementes de pinhão manso provenientes das cidades de Nova Porteirinha-MG (NP), Campinas-SP (CAMP), Piracicaba-SP (PIR) e Ribas do Rio Pardo-MS (RRP) e uma amostra formada a partir de um *pool* de sementes provenientes de Campinas e Piracicaba (C-P), na de proporção 50:50. Uma análise de agrupamento baseada nas distâncias genéticas foi realizada para identificar as inter-relações entre as populações avaliadas e revelou a separação das populações em três grupos, mesmo apresentando pequena diversidade genética entre os mesmos (20%). O peso individual das sementes variou entre 0,60 - 0,70 g e do albúmen entre 0,36 - 0,44 g. A proporção de albúmen e cascas em relação ao peso da semente foi de 59,48 - 63,21% e 35,64 - 41,51%, respectivamente. A composição bromatológica mostrou concentrações de proteína bruta (PB) e extrato etéreo mais elevadas nos albumens em comparação as sementes. Após a extração do óleo, as concentrações de PB nas tortas aumentaram e, de maneira geral, estas apresentaram um bom perfil nutricional. As concentrações de EF no albúmen foram maiores do que nas sementes, enquanto entre as tortas foram semelhantes. Após a prensagem a frio das sementes e albumens, os EF foram concentrados no óleo sugerindo que tortas com menor teor de óleo residual apresentam menores concentrações de EF. Portanto, as tortas de pinhão manso têm potencial na alimentação animal desde que a extração dos óleos seja eficiente em retirar o EF da semente/albumem.

Palavras-chave: Subprodutos do biodiesel. Compostos tóxicos. Alimentação animal. Composição bromatológica.

VARIABILITY IN THE PHORBOL ESTERS CONTENT IN JATROPHA SEEDS AND FRACTIONS OF THE SEED (*Jatropha curcas* L.)

Abstract: The *Jatropha curcas* is considered a promising oilseed for biodiesel production and is highlighted by the oil quality and yield. Due to the presence of phorbol esters (PE), seeds, oil and by-products are viewed as unfit for human consumption. Methods of cake detoxification has been widely studied by scientific community, however, successes have not been achieved yet in completely detoxify the cake with possibility of application in the industry. Thus, in order to contribute to these studies, the goal of this work is to quantify the PE concentrations and fractions of the seed, as well as their distribution in cakes and oil after cold-pressing of seeds and kernels, aiming to a possible use in animal feeding. Four samples of *Jatropha* seeds were used from the cities of Nova Porteirinha/MG (NP), Campinas/SP (CAMP), Piracicaba/SP (PIR) and Ribas do Rio Pardo/MS (RRP) and one sample combining a *pool* of seeds from Campinas and Piracicaba (C-P), in 50:50 ratio. An analysis of group based on genetic distances was performed to identify the inter-relationships among populations and a separation of populations was revealed into three groups, even presenting little genetic diversity between them (20%). The individual weight of seeds varied between 0.60 - 0.70g and kernel between 0.36 - 0.44g. The ratio of kernel and shells in relation to seed weight was 59.5 - 63.2% and 35.6 - 41.5%, respectively. The bromatological composition showed higher concentrations of crude protein (CP) and ethereal extract in the kernel in comparison to seeds. After oil extraction; CP concentrations in the cakes increased and, in general, presented a good nutritional profile. PE concentrations in kernel were higher than in seeds, while between cakes were similar. After cold-pressing of the seeds and kernel, the PEs were concentrated in the oil suggesting that cakes with a lower residual oil content showed lower PE concentrations. Therefore, *Jatropha* have potential in animal feeding as long as the extraction of the oils is efficient in removing PE from seed/kernel.

Keywords: By-products of biodiesel. Toxic compounds. Animal feeding. Bromatological composition.

3.1 Introdução

O pinhão manso é uma espécie oleaginosa nativa da América Central e México (HELLER, 1996; VNA-EK et al., 2011), e cultivada em regiões tropicais e subtropicais, como Índia, África e Oceania (NA-EK et al., 2011). No Brasil, pode ser encontrada em quase todas as regiões, devido à sua rusticidade e capacidade de adaptação a diferentes condições edafoclimáticas (HELLER, 1996; SATURNINO et al., 2005; RESENDE et al., 2009).

As sementes de pinhão manso possuem cerca de 2 cm de comprimento e 1 cm de largura, pesam entre 0,5 a ,86 g (CONTRAN et al., 2013; MAKKAR, 2016), sendo que 30 – 45% do peso da semente compreende a casca e 55 – 70% o albúmen (RESENDE et al., 2009; CONTRAN et al., 2013).

As sementes possuem fatores antinutricionais como inibidores de tripsina, lectinas e fitatos (MAKKAR, 2016) e componentes tóxicos tais como os ésteres de forbol (EF), os quais são os principais responsáveis pela limitação do seu uso (HELLER, 1996; GÜBITZ; MITELBBACH; TRABI, 1999; CHIVANDI et al., 2004; MAKKAR, 2016). Os fatores antinutricionais podem ser inativados por meio de tratamentos térmicos, enquanto os EF não são degradados apenas com temperatura (MAKKAR, 2016).

Os EF ocorrem naturalmente na planta e estão associados aos mecanismos de defesa (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2012) e encontram-se distribuídos em quase todas as partes da planta, com exceção do látex (HELLER, 1996; MAKKAR et al., 2009). Nas sementes foram identificados seis diferentes tipos de EF, todos isolados a partir do óleo (HAAS; STERK; MITTELBBACH, 2002).

Apesar do pinhão manso ser tóxico, existem acessos com baixos teores de EF, ou seja, com teores de EF inferiores a 0,11 mg g⁻¹. Embora seja vantajoso o cultivo de acessos considerados atóxicos, a ocorrência dos mesmos só foi registrada em algumas regiões do México (AREGHEORE; MAKKAR; BECKER, 1998; BASHA et al., 2009).

Devido à presença de EF, o aproveitamento da torta de pinhão manso na alimentação animal é restrito. Assim, para que seja possível o uso da torta na nutrição animal, essa deve passar pelo processo de destoxificação (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010a).

O desenvolvimento de métodos de destoxificação capazes de transformar a torta de pinhão manso em um produto atóxico desperta o interesse de pesquisadores do mundo inteiro (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). Existem processos de destoxificação desenvolvidos que conseguiram detoxificar parcialmente ou totalmente os EF, entretanto na maioria desses métodos não foram testados em ensaios com animais e/ou não são possíveis de ser

reproduzidos em grande escala (MAKKAR, 2016). Dessa maneira, há necessidade de estudos para avaliar a toxicidade da inclusão da torta de pinhão manso destoxificada na alimentação animal, além de estudos para avaliar a eficácia de diferentes processos de destoxificação (BERENCHTEIN et al., 2014).

Buscando contribuir com esses estudos, este trabalho teve como objetivo quantificar a concentração de EF nas sementes e frações da semente (albúmen e casca), assim como sua distribuição em tortas e óleo após prensagem a frio de sementes e albumens de pinhão manso, visando a possibilidade de uso na alimentação animal.

3.2 Material e Métodos

O estudo foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo (USP), localizado na região de Piracicaba-SP. Foram utilizadas quatro amostras de sementes de pinhão manso provenientes das cidades de Nova Porteirinha-MG, Campinas-SP, Piracicaba-SP e Ribas do Rio Pardo-MS. Visando expressar a utilização na indústria, um amostra de sementes foi formada a partir de um *pool* de sementes provenientes de Campinas e Piracicaba (proporção 50:50). As amostras de sementes foram identificadas como NP, CAMP, PIR, RRP e C-P, respectivamente.

3.2.1 Diversidade genética entre as amostras

O estudo da diversidade genética foi realizado em colaboração com Laboratório de Melhoramento de Plantas, do CENA-USP. As populações foram identificadas a partir da amostragem de uma mistura de sementes de cada amostra (NP, CAMP, PIR, RRP e C-P), visando obter a máxima variabilidade genética. Cinco sementes de cada amostra foram germinadas para a extração do DNA das folhas jovens.

A extração do DNA foi realizada como descrito por Sereno et al. (2006) com pequenas modificações. Tecidos foliares (50 mg) foram homogeneizados e transferidos para microtubos para a extração do DNA total e reações de microssatélites foram conduzidas empregando-se oito pares de iniciadores (Tabela 3.1) de acordo com Creste, Neto e Figueira (2001).

Tabela 3.1 - Características de oito marcadores microssatélites, utilizados para avaliação de cinco populações de pinhão manso

<i>Loco</i>	<i>Motivo</i>	<i>Citação</i>
<i>mJCENA 27</i>	(GA) ₁₂	Bressan et al. (2012)
<i>mJCENA 41</i>	(AC) ₁₈	Bressan et al. (2012)
<i>mJCENA 47</i>	(GT) ₇ (GA) ₁₂	Bressan et al. (2012)
<i>mJCENA 63</i>	(GA) ₁₇	Bressan et al. (2012)
<i>mJCENA 87</i>	(GT) ₁₅ (GA) ₈	Bressan et al. (2012)
JCSSR 68	(AGA) ₇	Sun et al. (2008)
JCSSR 116	(AC) ₁₂	Sun et al. (2008)
JCSSR 308	(TTC) ₄ (CTT) ₃	Sun et al. (2008)

3.2.2 Caracterização física das sementes

Um total de 40 sementes de cada amostra foram selecionadas ao acaso e pesadas separadamente para obtenção do peso médio individual das sementes. Em seguida, essas sementes foram quebradas manualmente com auxílio de um bloco de madeira e separadas as frações casca e albúmen. Os pesos do albúmen e da casca foram registrados e foi calculada a porcentagem de cada fração das amostras (MAKKAR; MARTINEZ-HERRERA; BECKER, 2008).

3.2.3 Obtenção das frações das sementes

Uma porção de 700 g de sementes de cada amostra foi processada para obtenção das frações casca e albúmen. As sementes foram quebradas manualmente, separados os albumens das cascas e armazenados a 4° C até análise.

3.2.4 Obtenção do óleo e torta

As sementes e os albumens foram utilizados para obtenção das tortas e óleos. Para isso, foi utilizada uma prensa hidráulica modelo MARCON MPH-30 com capacidade de pressão de 30 t, na qual a célula extratora era composta por um cilindro de cobre provida de peneira de inox, totalmente desmontável. As sementes e albumens foram prensados individualmente a partir de porções de 25 g em quadruplicata. A torta e o óleo foram obtidos após dupla prensagem à frio sob pressão de 7 t durante 40 minutos. As tortas das sementes e dos albumens e os óleos foram armazenados à 4°C até o momento da análise.

3.2.5 Preparo das amostras

As sementes, cascas e albumens foram separados em porções de 25 g em quadruplicata. Essas porções junto com as tortas foram moídas até 1 mm em moinho TE/631-3 e mantidas no freezer para posterior análise bromatológica e quantificação de EF.

3.2.6 Composição bromatológica

Foram realizadas análises bromatológicas das sementes, cascas, albumens e tortas da semente e albúmen. Foram determinados os teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) de acordo com AOAC (2011). As fibras em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA) foram determinadas sequencialmente conforme proposto por Van Soest, Robertson e Lewis (1991), utilizando sacos de filtro ANKOM #57 em analisador de fibra TE-149.

3.2.7 Extração e quantificação dos ésteres de forbol

Extração dos ésteres de forbol nas sementes, cascas, albumens e tortas

As extrações dos EF foram feitas de acordo com a metodologia descrita por Makkar Siddhuraju e Becker (2007). Foram pesados 2 g de amostra triturada em tubos de centrífuga e adicionados 15 mL de metanol (grau HPLC). Os tubos foram submetidos a sonicação por 3 minutos sob gelo e centrifugados a 5000 rpm por 8 minutos a temperatura de 10 - 15°C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e o resíduo reextraído duas vezes. As alíquotas dos extratos foram agrupadas, o volume mensurado e secas em rotaevaporador (temperatura = 40°C). O extrato seco foi redissolvido em 2 mL de metanol, sonicado sob gelo por 3 - 4 minutos e transferido para tubo Falcon. Essa etapa foi realizada 3 vezes e os extratos agrupados para posterior secagem em banho-maria sob fluxo de nitrogênio. O resíduo seco foi redissolvido em 2 mL de metanol, agitado e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. As amostras foram filtradas em membrana filtrante (PTFE 0,45 µm) e armazenadas em *vials* âmbar de 2 mL no freezer até análise.

Extração dos ésteres de forbol no óleo

A extração dos EF nos óleos foi realizada conforme metodologia descrita por Devappa, Makkar e Becker (2010b) com modificações na relação amostra:solvente e acrescentando duas extrações. Foram pesados 2 g de óleo e adicionados 15 mL de metanol. A mistura foi aquecida a 55°C em chapa aquecedora sob agitação durante 5 minutos e o sobrenadante coletado em frascos de vidro de 100 mL. Essa etapa foi repetida duas vezes com tempos de extração de 7 e 10 minutos e os sobrenadantes coletados e agrupados. O extrato foi concentrado utilizando gás nitrogênio e redissolvido em 2 mL de metanol, agitado, centrifugado a 2000 rpm, filtrado em membrana filtrante (PTFE, 045 µm) e transferido para *vial* de 2 mL para posterior análise.

3.2.8 Quantificação dos ésteres de forbol

Os EF foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O cromatógrafo utilizado foi o Agilent modelo 1100 equipado com um detector de arranjo de fotodiodos e coluna Zorbax C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm. A eluição foi realizada por gradiente, utilizando como fase móvel uma solução de ácido ortofosfórico 0,1% e acetonitrila, com vazão de 1,3 mL min⁻¹ e temperatura constante da coluna de 23°C (MAKKAR; SIDDHURAJU; BECKER, 2007).

3.2.9 Análise estatística

Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso (em relação ao processamento) e a análise estatística dos dados coletados foi realizada por meio do programa SAS v. 9.4. (SAS Institute Inc., Cary NC, EUA). Foram considerados como efeitos fixos as diferentes amostras, tipo de material e a interação entre amostra e tipo de material. Os dados coletados foram submetidos a análise de variância pelo teste F e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As análises de agrupamento foram obtidas a partir das distâncias genéticas de Nei (1972), utilizando o método aglomerativo UPGMA (*Unweighted pair group method of arithmetic averages*), com auxílio do programa TFPGA (MILLER, 1997).

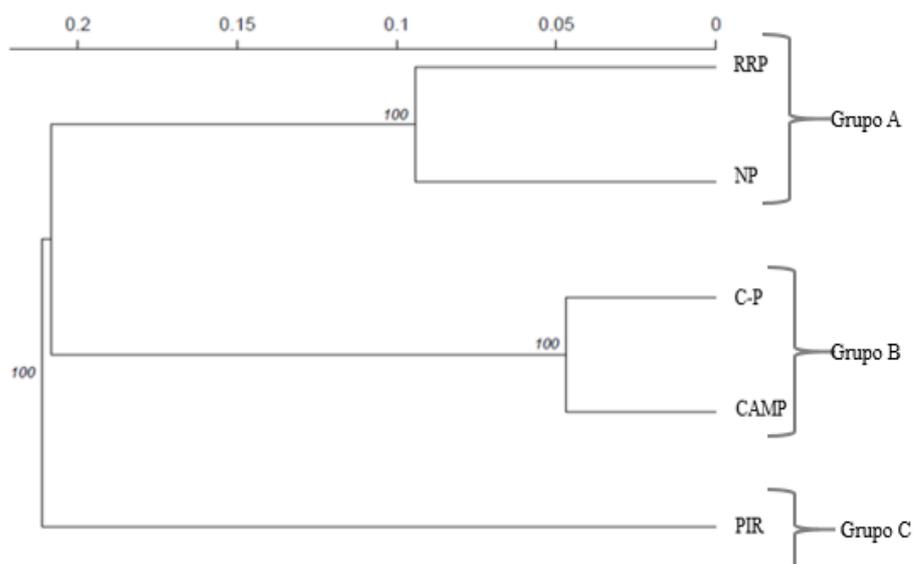
3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Diversidade genética

Oito pares de iniciadores apresentaram perfis polimórficos (*mJCENA27*, *mJCENA41*, *mJCENA47*, *mJCENA63*, *mJCENA87*, *JCSSR68*, *JCSSR116* e *JCSSR308*). A partir desses *locos* foram detectados 26 alelos, nos quais o número de alelos variou de 1 a 6 por *loco*, sendo a média de 3,25 alelos. O *loco* que apresentou maior número de alelos foi o *mJCENA41* (6 alelos), e com menor número foi o *JCENA63* (um alelo).

A análise de agrupamento baseada nas distâncias genéticas de Nei (1972), pelo método UPGMA, foi realizada para identificar as inter-relações entre as populações avaliadas. O dendrograma obtido (Figura 3.1) mostra a separação das populações em três grupos, tendo-se como critério o valor de *bootstraps*, ou seja, confiabilidade de nós, com 100%, mesmo apresentando pequena diversidade genética entre os mesmos (20%). O grupo A foi formado pelas populações das amostras RRP e NP, com uma diversidade genética de aproximadamente 10%, já no B encontrou-se as populações das amostras C-P e CAMP, com uma diversidade de aproximadamente 5%. O grupo C foi formado pela população da amostra PIRA, que apresentou maior diversidade genética quando comparado com as populações dos grupos A e B. Esses grupos revelam uma associação entre a diversidade molecular e a origem dos mesmos.

Figura 3.1 - Representação gráfica da análise de agrupamento, baseada nas distâncias de Nei (1972) de cinco amostras de pinhão manso, pelo método UPGMA, utilizando oito loci microssatélites



Resultados semelhantes foram observados por Rosado et al. (2010), analisando 192 acessos brasileiros de diversos Estados, onde fica evidente que os acessos de diferentes regiões possuem uma ancestralidade comum. Bressan et al. (2013) destacaram que o pinhão manso apresenta um sistema misto de reprodução, combinando autofecundações, apomixia e cruzamentos entre indivíduos aparentados o que pode explicar a pequena diversidade genética encontrada dentro das populações.

3.3.2 Características físicas das sementes

Os parâmetros físicos das sementes de pinhão manso apresentaram diferença para peso médio individual das sementes ($P= 0,0072$) e peso do albúmen ($P<0,0001$). As sementes de NP e PIR apresentaram o menor peso médio individual de semente e albúmen quando comparada as demais localidades (Tabela 3.2).

Os resultados encontrados são semelhantes aos de Montes et al. (2013), que avaliaram os parâmetros físicos da semente de pinhão manso em acessos de diferentes regiões do mundo. Os autores obtiveram valores médios de 0,6 g para o peso de semente, 0,4 g para o peso do albúmen e 0,2 g para o peso da casca. Do mesmo modo, Freitas et al. (2011) utilizaram sementes provenientes de diferentes regiões do Brasil e obtiveram a média de peso para 100 sementes de 63,2 g. Contudo, Becker e Makkar (2008) comentam que o peso individual das sementes pode variar de 0,4 a 1 g.

Tabela 3.2 – Composição física das sementes de pinhão manso de diferentes regiões

Amostras ¹	Sementes	Albúmen (g) ¹	Casca	Albúmen	Casca
				%	
NP	0,60 ^b	0,36 ^c	0,25	58,9 ^d	41,1 ^a
CAMP	0,68 ^a	0,44 ^a	0,24	64,45 ^a	35,55 ^d
PIR	0,64 ^{ab}	0,39 ^{bc}	0,25	60,43 ^c	39,57 ^b
RRP	0,68 ^a	0,43 ^{ab}	0,25	63,04 ^b	36,96 ^c
C-P	0,70 ^a	0,44 ^a	0,26	63,00 ^b	37,00 ^c
EPM ²	0,28	0,17	0,01	0,15	0,16
Valor-P	0,0072	<0,0001	0,51	<0,001	<0,001

¹NP = Nova Porteirinha-MG, CAMP = Campinas-SP, PIR = Piracicaba-SP, RRP = Ribas do Rio Pardo-MS, C-P = *pool* de sementes de Campinas e Piracicaba.

²EPM = Erro padrão da média.

Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam efeito significativo de tratamento teste de Tukey a 5% probabilidade.

Segundo Wassner et al. (2016), a variação no peso individual das sementes está relacionada com o genótipo da planta e com fatores ambientais, tais como temperatura, radiação solar, tipo de solo e precipitação pluviométrica, durante o período de enchimento dos

grãos. Já as variações no peso do albúmen e cascas são influenciados pelo peso da semente, entretanto, o peso do albúmen é mais sensível a mudanças de peso da semente do que a casca (WASSNER et al., 2016). Nesse estudo, pode-se observar que sementes com maior peso individual apresentaram maior peso de albúmen enquanto o peso da casca não sofreu variações em relação ao peso das sementes.

A proporção de albúmen e casca em relação ao peso da semente é interessante para seleção de acessos visando o melhoramento genético da cultura (MONTES et al., 2013). A redução da proporção de cascas em relação ao peso da semente além de contribuir com o aumento da digestibilidade da torta obtida após a extração do óleo, melhora a eficiência de transporte (MONTES et al., 2013). Nesse trabalho, a proporção de albúmen e casca em relação ao peso da semente integra variou entre 59,48 a 64,63% de albúmen e 35,64 a 41,51% de cascas. Proporções de 55,1 a 65,7% de albúmen e 44,9 a 35,8 de casca e 60,4 a 63% de albúmen e 36,5 a 40% casca foram encontradas por Makkar et al. (1997) e Makkar, Aderibigbe e Becker (1998).

3.3.3 Composição bromatológica

Os resultados da análise bromatológica são apresentados na Tabela 3.3. A concentração de matéria seca (MS) variou entre 914,2 a 924,6 g kg⁻¹ nas sementes, 944,7 a 952,7 g kg⁻¹ no albúmen, 899,0 a 905,9 g kg⁻¹ na casca, 907,1 a 913,5 g kg⁻¹ na torta da semente e 923,6 a 927,5 g kg⁻¹ na torta do albúmen e foi próxima a encontrada por Makkar, Aderibigbe e Becker (1998), Gomes et al. (2009) e Souza et al. (2009).

O elevado teor de MS e a baixa umidade são características importantes para manter a qualidade da semente durante o período de armazenamento (GOLDFARB; QUEIROGA, 2013). Embora exista variações na concentração de MS nos materiais estudados, o teor de umidade, inferido a partir da MS, ficou dentro da faixa de 6 a 10% considerada ótima para armazenamento (BROOKER; BAKKER-ARKEMA; HALL, 1992). Além disso, a alta concentração de MS nas tortas mostrou que não houve necessidade de secagem das mesmas após o processo de prensagem, uma vez o teor de umidade encontra-se dentro do limite de 11% recomendado para farelos de oleaginosas (GOMES et al., 2009; SOUZA et al., 2009).

Tabela 3.3 - Composição bromatológica das sementes, frações da semente e tortas de pinhão manso de diferentes regiões

Amostras ¹	Composição bromatológica ²						
	MS	MO	PB	EE	FDN	FDA	LIG
g kg ⁻¹ MS							
<i>Semente</i>							
NP	920,9 ^a	963,9 ^a	160,5 ^c	280,7 ^{cd}	702,1 ^a	500,9 ^b	227,7 ^{ab}
CAMP	923,2 ^a	963,2 ^{ab}	162,1 ^c	344,4 ^a	702,9 ^a	500,1 ^b	237,7 ^{ab}
PIR	914,2 ^b	954,5 ^c	188,3 ^a	275,1 ^d	685,8 ^a	534,7 ^a	264,0 ^a
RRP	924,6 ^a	962,2 ^b	180,9 ^b	332,2 ^{ab}	637,2 ^b	441,3 ^c	195,3 ^{bc}
C-P	923,1 ^a	953,4 ^c	188,5 ^a	305,8 ^{bc}	616,7 ^b	406,3 ^d	177,5 ^c
EPM ³	1,83	0,43	1,30	9,11	8,82	7,15	16,04
Valor-P	0,0004	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0006
<i>Albúmen</i>							
NP	948,3 ^b	955,6 ^c	273,7 ^c	470,8 ^{bc}	204,1 ^c	38,1 ^{bc}	3,9 ^{ac}
CAMP	952,2 ^a	964,7 ^a	225,6 ^d	542,6 ^a	266,9 ^b	37,9 ^{bc}	3,6 ^c
PIR	944,7 ^c	952,1 ^e	297,3 ^a	424,2 ^d	267,9 ^b	44,0 ^{ab}	3,8 ^c
RRP	952,7 ^a	960,7 ^b	282,4 ^b	482,1 ^b	273,4 ^b	35,0 ^c	4,5 ^{ab}
C-P	945,2 ^c	954,4 ^d	278,6 ^b	455,9 ^c	304,1 ^a	48,0 ^a	4,7 ^a
EPM ³	0,81	0,35	1,27	6,54	4,76	2,39	0,20
Valor-P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0004	0,0002
<i>Casca</i>							
NP	902,6 ^{ab}	973,5 ^a	67,5 ^a	5,4 ^a	904,0	805,0 ^a	464,2 ^b
CAMP	900,7 ^{ab}	943,9 ^d	60,4 ^b	2,7 ^{bc}	921,8	808,3 ^a	519,3 ^a
PIR	905,9 ^a	958,1 ^c	62,5 ^b	2,8 ^b	891,8	749,1 ^b	410,7 ^c
RRP	904,9 ^{ab}	961,2 ^b	67,4 ^a	3,5 ^b	918,8	797,1 ^{ab}	517,4 ^a
C-P	899,0 ^b	960,4 ^{bc}	60,6 ^b	1,6 ^c	899,3	783,9 ^{ab}	499,9 ^a
EPM ³	2,23	0,74	1,30	0,51	14,31	14,88	7,26
Valor-P	0,0392	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,2237	0,0077	<0,0001
<i>Torta da semente</i>							
NP	913,4 ^a	947,0 ^a	197,8 ^d	100,2	614,9 ^a	496,1 ^a	255,3 ^a
CAMP	908,0 ^c	943,8 ^b	211,2 ^c	90,2	593,7 ^b	454,9 ^b	238,6 ^b
PIR	913,5 ^a	935,2 ^c	225,3 ^b	87,8	573,2 ^c	457,5 ^b	229,6 ^c
RRP	911,6 ^b	940,9 ^c	232,8 ^a	99,5	603,4 ^{ab}	486,3 ^a	253,4 ^a
C-P	907,1 ^c	938,4 ^d	234,5 ^a	73,4	565,1 ^c	448,9 ^b	232,3 ^c
EPM ³	0,50	0,35	1,71	17,4	4,96	3,06	0,86
Valor-P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,5561	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>Torta do Albúmen</i>							
NP	927,2	923,7 ^a	439,4 ^b	167,8 ^b	223,0	69,2 ^b	4,0
CAMP	926,4	919,9 ^c	426,4 ^c	214,9 ^a	266,6	83,9 ^a	3,4
PIR	925,5	911,3 ^c	439,8 ^b	101,6 ^c	256,8	82,8 ^a	3,6
RRP	923,6	921,5 ^b	459,3 ^a	165,6 ^b	280,6	68,3 ^b	3,6
C-P	924,0	915,9 ^d	429,3 ^c	73,4 ^d	248,4	68,0 ^b	3,5
EPM ³	1,41	0,37	1,77	8,43	19,2	3,34	0,20
Valor-P	0,0920	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0861	0,0002	0,0734

¹NP = Nova Porteirinha-MG, CAMP = Campinhas-SP, PIR = Piracicaba-SP, RRP = Ribas do Rio Pardo = MS, CP-P = *pool* de sementes de Campinas e Piracicaba.

²MS: matéria seca (com base na matéria original); MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; LIG: lignina.

³EPM = Erro padrão da média.

Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam efeito significativo de tratamento teste de Tukey a 5% probabilidade.

As concentrações de matéria orgânica (MO) das sementes, albumens, cascas e tortas variaram entre as regiões de origem, entretanto, estão entre os valores relatados na literatura de 958 g kg⁻¹ na semente, 958 g kg⁻¹ no albúmen, 975 g kg⁻¹ na casca, 937 g kg⁻¹ na torta da semente e 942 g kg⁻¹ na torta do albúmen (MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998; MARTÍNEZ-HERRERA et al., 2006; KARAJ; MÜLLER, 2010; GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014; ÍTAVO et al., 2015) .

A concentração de proteína bruta (PB) das sementes variou (P<0,0001) entre as regiões de origem. O fato das sementes terem apresentado diferenças nas proporções de albumens pode ter influenciado esse resultado. Os albumens possuem elevadas concentrações de PB e, uma vez em maior proporção nas sementes proporcionam um aumento na concentração de PB da semente. Os valores de PB encontrados nesse estudo foram semelhantes aos reportados por Makkar et al. (1997), Makkar, Martinez-Herrera e Becker (2008) e Karaj e Müller (2010).

A concentração de PB no albúmen também variou (P<0,0001). De acordo com Martinez-Herrera et al. (2010) e Montes et al. (2013) a concentração de PB no albúmen apresenta correlação negativa com o teor de óleo, ou seja, quanto maior o teor de óleo, menor o teor de PB no albúmen. Essa relação pode ser observada claramente para CAMP e PIR.

As concentrações de PB nas tortas da semente e tortas do albúmen variaram dentro do amplo intervalo relatado na literatura de 125,5 a 638 g kg⁻¹ (MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998; MARTÍNEZ-HERRERA et al., 2006; SOUZA et al., 2009; GUEDES et al., 2014). Variações na concentração de PB nas tortas estão relacionadas com o método de extração de óleo. Tortas obtidas por prensagem possuem maior teor de óleo residual e menor concentração de PB do que aquelas obtidas da extração de óleo com solvente, onde o teor de óleo residual é menor (XIAO; ZHANG, 2014). Além disso, tortas obtidas da extração do óleo do albúmen apresentam maior concentração de PB do que tortas obtidas de semente íntegras (GUEDES et al., 2014).

As sementes e albumens apresentaram concentrações de extrato etéreo (EE) semelhantes as encontradas por Becker e Makkar (2008) de 220 a 480 g kg⁻¹, no entanto, concentrações de 336 a 740 g kg⁻¹ de EE são relatadas por Contran et al. (2013). Segundo Montes et al. (2013), existe uma correlação negativa entre a proporção de cascas nas sementes e a concentração de EE, sendo que sementes que possuem grandes quantidades de cascas apresentam concentrações de EE inferiores à sementes com menores proporções. Wassner et al. (2016) complementam que sementes com maiores proporções de albúmen possuem maior concentração de óleo. A concentração de PB e EE no albúmen também estão relacionadas,

como discutido anteriormente. Fatores climáticos, tipos de solo (WEN et al., 2012) e época de colheita dos frutos (SANTOS et al., 2012) também são alguns dos fatores que influenciam a concentração de óleo nas sementes.

As concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) e lignina foram maiores nas sementes íntegras, cascas e tortas da semente comparada as concentrações encontradas nos albumens e tortas do albúmen. Isso demonstra que o maior acúmulo de fibras ocorre na parte externa das sementes, que compreende as cascas. Nesse estudo, as concentrações de FDN, FDA e lignina das cascas foram próximas as concentrações obtidas por Kumar, Srivastava e Jha (2016), enquanto nas tortas das sementes foram maiores. Nas sementes, as concentrações de FDN e FDA foram superiores as encontradas por Ítavo et al. (2015). Isso indica que a proporção de cascas nas sementes influencia os resultados de fibra. Na literatura são relatadas grandes variações nas concentrações de fibras nas sementes de pinhão manso (ÍTAVO et al., 2015).

A composição bromatológica das sementes e albumens do pinhão manso mostrou concentrações de PB e EE mais elevadas nos albumens em comparação as sementes. Após a extração do óleo, as concentrações de PB nas tortas aumentaram e, de maneira geral, estas apresentaram um bom perfil nutricional.

Essas concentrações de PB relativamente elevadas classificam essas tortas como potenciais alimentos proteicos. Já as concentrações de EE além de ser fonte de energia, pode auxiliar na mitigação de metano entérico (ABDALLA et al., 2008), enquanto que as fibras são importantes para a regulação do consumo, digestibilidade, taxa de passagem e estimular a mastigação (MERTENS, 1996).

3.3.4 Teor de ésteres de forbol em sementes, frações da semente e em tortas de pinhão manso

As sementes de pinhão manso utilizadas nesse estudo apresentaram variações ($P < 0,001$) nas concentrações de EF, sendo que as sementes de PIR apresentaram menor teor de EF em relação as demais regiões (Tabela 3.4). Estas variações podem ser relacionadas à variabilidade genética e a fatores ambientais. Ferrari et al. (2009) encontraram grandes variações nos teores de EF entre sementes com origens diferentes e com mesma origem, mesmo quando cultivadas sob as mesmas condições edafoclimáticas. Allard (1970) comenta que existe uma ampla variabilidade genética tanto entre quanto dentro das populações e cada espécie pode apresentar milhares de variantes.

Tabela 3.4. - Teores médios de ésteres de forbol nas sementes e albumens de pinhão manso nas diferentes amostras estudadas

Variáveis	NP ¹	CAMP ¹	PIR ¹	RRP ¹	C-P ¹	Média	EPM ²	Valor-p
Semente (mg g ⁻¹)	1,03 ^{abB}	0,86 ^{abB}	0,47 ^{cB}	0,64 ^{bcB}	0,64 ^{bcA}	0,73	0,09	<0,001
Albúmen (mg g ⁻¹)	1,69 ^{aA}	1,32 ^{baA}	0,95 ^{caA}	1,01 ^{caA}	0,64 ^{daA}	1,12	0,39	<0,001
Média	1,36	1,09	0,71	0,82	0,64			
EPM ²	0,26	0,20	0,19	0,16	0,08			
Valor-P	<0,001	<0,001	<0,001	0,0001	0,91			

¹NP = Nova Porteirinha-MG, CAMP = Campinas-SP, PIR = Piracicaba-SP, RRP = Ribas do Rio Pardo-MS, C-P = *pool* de sementes de Campinas e Piracicaba.

²EPM = Erro padrão da média.

Médias na mesma linha, seguidas de letras minúsculas diferentes, e na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nos albumens, a concentração EF também variou ($P < 0,001$) entre as regiões. De maneira geral, as concentrações de EF encontradas estão de acordo com a faixa obtida por outros autores de 0,11 a 8,97 mg g⁻¹ de EF em sementes e albumens de pinhão manso (MAKKAR et al., 1997; MAKKAR; BECKER; SCHMOOK, 1998; FERRARI et al., 2009; BUESO et al., 2016).

Os albumens apresentaram as maiores concentrações de EF em comparação com as sementes, como previamente relatado por Bueso et al. (2016), exceto C-P ($P = 0,91$). A diferença na concentração de EF entre sementes e albumens foi proporcional ao teor de cascas das sementes de cada região (Tabela 3.2). Essa relação ocorreu devido à ausência de EF nas cascas.

Na semente, as cascas são tidas como o primeiro mecanismo de defesa. Elas possuem elevadas concentrações de lignina e ausência de EF. Os EF são considerados o segundo mecanismo de defesa. Estão presentes em grandes concentrações no albúmen, principalmente na região de armazenamento do endosperma, proporcionando um ambiente defensivo para o embrião durante a germinação (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2012).

Foi observado que, após a extração do óleo do albúmen, cerca de 60,8 a 66,6% do total dos EF foram transferidos para óleo e 33,3 a 39,2% permaneceram na torta (Tabela 3.5). Esses resultados foram similares aos obtidos por Bueso et al. (2016) que reportaram teores de 60-65% no óleo e 35-40% na torta. Entretanto, nas tortas e óleos das sementes foi observado uma ampla variação na distribuição dos EF, nos quais 48,7 a 83,2% foram extraídos com o óleo e 16,7 a 51,3% permaneceram na torta. Segundo Gogoi, Niyogi e Tyagi (2014), durante a extração do óleo da semente cerca de 70-75% dos EF são transferidos para o óleo e 25-30% permanece na torta, sugerindo que os EF são fortemente ligados à matriz da semente (MAKKAR; MARTINEZ-HERRERA; BECKER, 2008; GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014).

Makkar, Aderibigbe e Becker (1998) e Pradhan et al. (2012) comentam que concentrações de EF na semente e no óleo variam de acordo com o acesso, região de cultivo e com a forma de extração do óleo. Sementes coletadas nas regiões da África, América do Norte e Central e Ásia apresentaram valores de 0,11 a 3,32 mg g⁻¹ de EF em sementes e 0,27 a 2,49 mg mL⁻¹ de EF no óleo (MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998). Na China, Liu et al. (2013), encontraram concentrações de 1,09 a 2,47 mg g⁻¹ de EF em sementes coletadas em três províncias diferentes e no Brasil, Pires et al. (2011), relataram concentrações de 2,04 a 3,53 mg g⁻¹ de EF em sementes originárias da região do Cerrado, enquanto Romero (2013), encontrou valores de 3,22 a 5,12 mg mL⁻¹ de EF no óleo extraído de sementes colhidas em Brasília e Campinas.

Tabela 3.5 - Teores médios de ésteres de forbol nas tortas e óleos de pinhão manso após prensagem a frio nas amostras estudadas

Variáveis ²	NP ¹	CAMP ¹	PIR ¹	RRP ¹	C-P ¹	Média	EPM ²	Valor-P
Torta Sem (mg g ⁻¹)	0,65 ^C	0,40 ^B	0,41 ^B	0,44 ^B	0,40 ^B	0,46	0,04	0,81
Torta Alb (mg g ⁻¹)	1,09 ^{BC}	0,96 ^B	0,76 ^{AB}	0,67 ^B	0,58 ^{AB}	0,81	0,08	0,2
Óleo Sem (mg mL ⁻¹)	1,55 ^{aAB}	1,99 ^{aA}	0,86 ^{bAB}	1,99 ^{aA}	0,38 ^{bB}	1,35	0,18	<0,001
Óleo Alb (mg mL ⁻¹)	2,18 ^{aA}	1,69 ^{abA}	1,18 ^{bA}	1,08 ^{bB}	1,11 ^{bA}	1,44	0,11	<0,001
EPM³	0,36	0,32	0,17	0,38	0,16			
Valor-P	<0,001	<0,001	0,02	<0,001	0,01			

¹NP = Nova Porteirinha-MG, CAMP = Campinas-SP, PIR = Piracicaba-SP, RRP = Ribas do Rio Pardo-MS, C-P = *pool* de sementes de Campinas e Piracicaba.

²Torta Sem = torta da semente, Torta alb = torta do albúmen, Óleo Sem= óleo da semente, Óleo alb = óleo do albúmen.

³EPM = Erro padrão da média.

Médias na mesma linha, seguidas de letras minúsculas diferentes, e na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação ao método de extração do óleo, Makkar et al. (2009) verificaram que no óleo obtido por prensagem a frio a concentração de EF foi maior comparada com o óleo extraído por solvente (3,77 mg g⁻¹ vs 3,10 mg g⁻¹). Pradhan et al. (2012) verificaram que óleo e a torta obtidos por prensagem mecânica a quente continham concentrações de EF (2,1 mg g⁻¹ e 0,8 mg mL⁻¹, respectivamente) menores que o óleo e torta obtido por extração com solvente (2,8 mg g⁻¹ e 1,1 mg mL⁻¹, respectivamente).

Os EF são considerados os compostos mais tóxicos presentes no pinhão manso (DEVAPPA; SWAMYLINGAPPA, 2008). De acordo com Makkar et al. (1997) e Makkar, Aderibigbe e Becker (1998), são considerados atóxicas apenas concentrações de EF iguais ou inferiores a 0,11 mg g⁻¹. As sementes, tortas e óleos utilizadas nesse estudo apresentaram teores de EF que podem ser considerados tóxicos e não devem ser utilizados para alimentação

humana e animal, assim como descrito na literatura (GANDHI; CHERIAN; MULKY, 1995; BECKER; MAKKAR, 1998; CHOMCHAI et al., 2011).

Diversos estudos usando semente ou torta de pinhão manso relatam os efeitos dos EF em animais monogástricos e ruminantes (AHMED; ADAM, 1979; GOEL et al., 2007; LI et al., 2010; BARROS et al., 2015) como redução no consumo, diarreia, irritação e necrose na pele, hemorragia nos olhos, redução na produção de leite e reprodução, inflamações gastrointestinais e morte dos animais (GOEL et al., 2007; EFSA, 2015). Segundo Abdelgadir e Van Staden (2013) o grau de toxicidade dos EF varia com a dose, modo de administração e com a sensibilidade do animal.

Contudo, existem trabalhos que relatam o uso de torta do albúmen provenientes de variedades atóxicas como um alimento potencial para uso na alimentação animal e testando seu uso como alimento para peixes e ratos, os quais foram realizados com sucesso (MAKKAR, 2016). Oliveira et al. (2013) também reportaram resultados positivos com a inclusão da torta de pinhão manso atóxica na alimentação de ovinos. Os autores relataram que não foram encontradas diferenças no consumo, ganho de peso e características de carcaça entre os animais da dieta controle (sem torta de pinhão manso) e dietas teste (inclusão de torta de pinhão manso atóxica) e que nenhum sinal clínico de intoxicação foi detectado.

Makkar, Aderibigbe e Becker (1998) mencionaram que acessos de pinhão manso atóxicos e tóxicos apresentam um alto valor nutricional e que a diferença entre eles é somente quanto a presença de EF (MAKKAR, 2016). No entanto, acessos atóxicos são encontrados apenas no México e atualmente seu uso não é destinado para produção de biodiesel (MAKKAR, 2016), sendo, portanto, a destoxificação a alternativa mais viável para a sua utilização na alimentação animal. Entretanto, métodos que resultem na destoxificação total dos EF com possibilidade de aplicação em grande escala pela indústria não foram desenvolvidos com sucesso. Dessa maneira, ressalta-se a importância do desenvolvimento de técnicas de destoxificação que visem a degradação/inativação dos EF para que os subprodutos do pinhão manso possam ser utilizados na alimentação animal de maneira segura, e agregando valor a esse subproduto.

3.4 Conclusão

As sementes utilizadas nesse estudo apresentaram pequena diversidade genética, entretanto, foi possível observar diferenças nos parâmetros físicos, composição nutricional e concentrações de EF compatíveis com os dados da literatura nacional e internacional.

A composição bromatológica das sementes e albumens das amostras de pinhão manso estudadas mostrou concentrações de EE e de PB promissoras, sugerindo que o melhor cenário para agregar valor à esse subproduto é o uso do albúmen para produção de biodiesel e o aproveitamento da torta na alimentação animal.

As amostras de pinhão manso apresentaram variações nas concentrações de EF nas sementes, albumens e óleo. Após a prensagem a frio das sementes e albumens, os EF foram concentrados no óleo, evidenciando que tortas com menor teor de óleo residual apresentam menores concentrações de EF. É concluído que a torta de pinhão manso tem potencial para ser utilizado na alimentação animal desde que a extração do óleo seja eficiente e suas tortas apresentem menor teor de óleo residual possível.

Referências

ABDALLA, A. L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. esp., p. 260–268, 2008.

ABDELGADIR, H. A.; VAN STADEN, J. Ethnobotany, ethnopharmacology and toxicity of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae): A review. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 88, p. 204–218, 2013.

AHMED, O. M.; ADAM, S. E. Effects of *Jatropha curcas* on calves. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 16, n. 4, p. 476–482, 1979.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1970. 381 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 18. ed. Arlington: AOAC International, 2011.

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

ARRUDA, F. P. de. et al. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curca* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 789–799, 2004.

BARROS, C. R. et al. The effect of *Jatropha Curcas* seed meal on growth performance and internal organs development and lesions in broiler chickens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 17, p. 1–6, 2015.

BASHA, S. D. et al. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, Shannon, v. 176, n. 6, p. 812–823, 2009.

BECKER, K.; MAKKAR, H. P. S. Effects of phorbol esters in carp (*Cyprinus carpio* L). **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 40, n. 2, p. 82–86, 1998.

BECKER, K.; MAKKAR, H. P. S. *Jatropha curcas*: A potential source for tomorrow's oil and biodiesel. **Lipid Technology**, High Wycombe, v. 20, n. 5, p. 104–107, 2008.

BERENCHTEIN, B. et al. Effects of detoxified *Jatropha curcas* kernel meal in finishing pig diets on their performance, carcass traits, meat quality and intoxication. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 165, n. 1, p. 100–103, 2014.

BRESSAN, E. de A. et al. Development of microsatellite primers for *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) and transferability to congeners. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 99, n. 6, p. 237–239, 2012.

BRESSAN, E. de A. et al. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) exhibits a mixed mating system, high correlated mating and apomixes. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 9, p. 1089–1097, 2013.

BROOKER, D. B.; BAKKER-ARKEMA, F. W.; HALL, C. W. **Drying and storage of grains and oilseeds**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. 450 p.

BUESO, F. et al. Phorbol esters seed content and distribution in Latin American provenances of *Jatropha curcas* L.: potential for biopesticide, food and feed. **SpringerPlus**, Heidelberg, v. 5, n. 1, p. 445–451, 2016.

CHIVANDI, E. et al. Effect of processing method on phorbol esters concentration, total phenolics, trypsin inhibitor activity and the proximate composition of the Zimbabwean *Jatropha curcas* Provenance: A potential livestock feed. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 7, n. 6, p. 1001–1005, 2004.

CHOMCHAI, C. et al. Toxicity from ingestion of *Jatropha curcas* ('saboo dum') seeds in Thai children. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v. 42, n. 4, p. 946–950, 2011.

CONTRAN, N. et al. State-of-the-art of the *Jatropha curcas* productive chain: From sowing to biodiesel and by-products. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 202–215, 2013.

CRESTE, S.; NETO, A. T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 19, n. 4, p. 299–306, 2001.

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

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

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha* oil. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 1125–1133, 2010b.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Localisation of antinutrients and qualitative identification of toxic components in *Jatropha curcas* seed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 92, n. 7, p. 1519–1525, 2012.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Scientific opinion on risks for human and animal health related to the presence of phorbol esters in *Jatropha* kernel meal. **EFSA Journal**, Parma, v. 13, n. 12, p. 1 – 80. 2015.

FERRARI, R. A. et al. Avaliação da composição química e de constituinte tóxico em acessos de pinhão-mansão de diferentes origens. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, n. 4, p. 309–314, 2009.

FREITAS, R. G. et al. Genetic evaluation of *Jatropha curcas*: an important oilseed for biodiesel production. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 3, p. 1490–1498, 2011.

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

GOEL, G. et al. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, Washington, DC, v. 26, n. 4, p. 279–288, 2007.

GOGOI, R.; NIYOGI, U. K.; TYAGI, A. K. Reduction of phorbol ester content in *Jatropha* cake using high energy gamma radiation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, Cairo, v. 7, n. 3, p. 305–309, 2014.

GOLDFARB, M.; QUEIROGA, V.P. Considerações sobre o armazenamento de sementes. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 7, n. 3, p. 71–74, 2013.

GOMES, F. H. T. et al. Composição bromatológica e degradação in situ de nutrientes de subprodutos da cadeia do biodiesel. **Revista Científica de Produção Animal**, Areia, v. 11, n. 2, p. 144–156, 2009.

GÜBITZ, G.; MITELBBACH, M.; TRABI, M. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource Technology**, Barking, v. 67, n. 1, p. 73–82, 1999.

GUEDES, R. E. et al. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake using chemical treatment: Analysis with a central composite rotatable design. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 52, p. 537–543, 2014.

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

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

ÍTAVO, L. C. V. et al. Calorimetry, chemical composition and in vitro digestibility of oilseeds. **Food Chemistry**, Barking, v. 185, p. 219–225, 2015.

KARAJ, S.; MÜLLER, J. Determination of physical, mechanical and chemical properties of seeds and kernels of *Jatropha curcas* L. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 129–138, 2010.

KUMAR, P.; SRIVASTAVA, V. C.; JHA, M. K. *Jatropha curcas* phytotomy and applications: Development as a potential biofuel plant through biotechnological advancements. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 59, p. 818–838, 2016.

LI, C. Y. et al. Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 620–625, 2010.

LIU, X. et al. Quantitative determination of phorbol ester derivatives in Chinese *Jatropha curcas* seeds by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 47, p. 29–32, 2013.

MAKKAR, H. P. S. State-of-the-art on detoxification of *Jatropha curcas* products aimed for use as animal and fish feed: A review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 222, p. 87–99, 2016.

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

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

MAKKAR, H. P. S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Phorbol esters. In: MAKKAR, H.P.S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. (Ed.) **Plant secondary metabolites**. Totowa, NJ: Humana Press, 2007. 130 p. (Methods in Molecular Biology, 393).

MAKKAR, H. P. S.; MARTINEZ-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**, New York, v. 3, n. 4, p. 260–265, 2008.

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

MAKKAR, H. P. S. et al. Removal and degradation of phorbol esters during pre-treatment and transesterification of *Jatropha curcas* oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 86, n. 2, p. 173–181, 2009.

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

MARTINEZ-HERRERA, J. et al. Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. **European Journal of Scientific Research**, Victoria, v. 39, n. 3, p. 396-407, 2010.

MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. **Uso potencial e toxidez da torta de pinhão manso**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. 8 p. (Comunicado Técnico, 1).

MERTENS, D. R. Using fiber and carbohydrate analysis to formulate dairy rations: INFORMATINAL CONFERENCE WITH DAIRY AND FORAGE INDUSTRIES, 1996, Madison. Madison: US Dairy Forage Research Center, 1996. p. 81-92.

MILLER, M. P. **Tools for Populations Genetic Analysis (TFPGA) 1.3**: a windows program for the analysis for allozyme and molecular population genetic data. Flagstaff, AZ: Department of Biological Science, Northern Arizona University, 1997. Disponível em: <http://www.public.asu.edu>.

MONTES, J. M. et al. Seed quality diversity, trait associations and grouping of accessions in *Jatropha curcas* L. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 51, p. 178–185, 2013.

NA-EK, Y. et al. Genetic diversity of physic nut (*Jatropha curcas* L.) revealed by SSR markers. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, Seoul, v. 14, n. 2, p. 105–110, 2011.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, Chicago, v. 106, p. 283-292, 1972.

OLIVEIRA, P. B. et al. Growth and carcass characteristics of Santa Inês lambs fed diet supplemented with physic nut meal free of phorbol ester. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 20–25, 2013.

PIRES, J. M. F. et al. Éster de forbol em sementes e tortas de pinhão manso. In: REUNIÃO ANUMAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA SBQ, 34., 2011, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: SBQ, 2011. 1 CD-ROM.

PRADHAN, S. et al. Experimental assessment of toxic phytochemicals in *Jatropha curcas*: Oil, cake, bio-diesel and glycerol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 92, n. 3, p. 511–519, 2012.

RESENDE, J. C. F. D. et al. Pinhão manso. In: MONTEIRO, J. E. B. A. **Agrometeorologia dos cultivos: O fator meteorológico na produção agrícola**. Brasília, DF: Instituto Nacional de Meteorologia, 2009. cap. 27. p. 467–476.

ROMERO, A. de C. **Resíduo da produção de biodiesel: Avaliação de moléculas bioativas e potencial de aplicação na alimentação animal**. 2013. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

ROSADO, T. B. et al. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, Madison, v. 50, p. 2372–2382, 2010.

SANTOS, S. B. dos. et al. Acúmulo de matéria seca e óleo nas sementes de pinhão-manso e qualidade do óleo extraído. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, n. 2, p. 209–215, 2012.

SATURNINO, H. M. et al. Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44–78, 2005.

SERENO, M. L. et al. A. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics**, Heidelberg, v. 7, n. 1, p. 13–24, 2006.

SOUZA, A. D. V. de. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-manso, nabo-forrageiro e crambe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 10, p. 1328–1335, 2009.

SUN, Q. B. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant in China. **Crop Science**, Madison, v. 48, n. 5, p. 1865–1871, 2008.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3583–3597. 1991.

WASSNER, D. et al. Harvest date modifies seed quality and oil composition of *Jatropha curcas* growth under subtropical conditions in Argentina. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 94, p. 318–326, 2016.

WEN, Y. et al. Influence of climatic factors and soil types on seed weight and oil content of *Jatropha curcas* in Guangxi, China. **Procedia Environmental Sciences**, Amsterdam, v. 12, p. 439–444, 2012.

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 of Food Science and Technology**, New Delhi, v. 51, n. 6, p. 1126–1132, 2014.

4 DEGRADABILIDADE *IN VITRO* E PRODUÇÃO DE GASES DE DIETAS CONTENDO TORTA DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) E MAMONA (*Ricinus communis* L.)

Resumo: A utilização do pinhão manso e da mamona para produção de biodiesel geram como subprodutos a torta ou farelo, os quais têm grande potencial em contribuir para a sustentabilidade da produção animal. Entre as possibilidades de uso da torta de pinhão manso e mamona está a alimentação animal, contudo, essa utilização pode ser limitada pela presença de moléculas bioativas tais como ésteres de forbol (EF) e ricina, respectivamente. Embora animais ruminantes sejam considerados mais tolerantes a essas biomoléculas em relação a animais monogástricos, existem vários relatos na literatura de intoxicação pela ingestão de sementes ou tortas de pinhão manso e mamona. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da substituição parcial do farelo de soja pela torta de mamona (TM) e de pinhão manso (TPM), destoxificada ou não, sobre os parâmetros de degradabilidade e fermentação ruminal *in vitro*. Foi utilizado um delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2 x 2 x 2, onde foram avaliados dois tratamentos (torta de mamona e torta de pinhão manso), dois processamentos (destoxificada ou não) e dois níveis de inclusão das tortas (25 e 35% pinhão manso e 25% e 50% mamona) em substituição ao farelo de soja (tratamento controle). As dietas foram formuladas com base nas recomendações do NRC (2007) para atenderem as exigências de ovinos adultos em manutenção e com relação volumoso:concentrado de 50:50. Os substratos (dietas) foram incubados em garrafas na presença de inoculo de ovinos e solução tampão. Após 24 horas de incubação foi observado que inclusão da TM e TPM, destoxificada ou não, em substituição ao farelo de soja não afetou a produção de gases total (PTG), a produção de N-NH₃, ácidos graxos de cadeia curta total (AGCC), pH ruminal e número de protozoários. Contudo, a inclusão de 35% de TPM destoxificada diminuiu a degradabilidade da matéria orgânica em aproximadamente 10% quando comparadas à dieta controle, assim como reduziu o valor do fator de partição para a mesma dieta. A inclusão de 35% de TPM não destoxificada reduziu aproximadamente 32% a produção de metano (PCH₄) quando comparado a dieta controle. Houve redução na concentração do isobutirato com a inclusão de 50% de TM destoxificada (21,6%), 35% de TPM (20%) e 25% de TPM destoxificada (16,6%), enquanto que a concentração de isovalerato foi reduzida para ambas as tortas, tratadas ou não, independentemente do nível de inclusão. Os resultados mostraram que a TPM e TM, destoxificada ou não, apresentaram potencial para uso na alimentação de animais ruminantes sem causar efeitos deletérios na degradabilidade da matéria orgânica, com exceção para a dieta com 35% de TPM destoxificada, e nos parâmetros de fermentação ruminal nos níveis de adição testados nesse estudo. A inclusão de 35% de TPM não destoxificada apresentou potencial de mitigação de metano, contudo, a presença de EF pode ter alterado a população de bactérias metanogênicas no líquido ruminal.

Palavras-chave: Subprodutos. Moléculas bioativas. Fermentação ruminal. Metano. Isoácidos.

***IN VITRO* DEGRADABILITY AND GAS PRODUCTION OF DIETS CONTAINING CAKE OF JATROPHA (*Jatropha curcas* L.) AND CASTOR BEAN (*Ricinus communis* L.)**

Abstract: The use of jatropha and castor bean to biodiesel production generates the cake or meal as by-products, which must have a correct destination. Among the possibilities of usage of the jatropha and castor oil cake is in animal feeding, however, the utilization is limited due to the presence of phorbol esters (PE) and ricin. Although ruminant animals are considered more tolerant to these biomolecules in relation to monogastric animals, there are several reports in the literature about intoxication by the ingestion of seeds or cake of jatropha and castor bean. In this sense, the present project was undertaken to evaluate the effect of partial substitution of soybean meal for cake of castor (CC) and jatropha (CJ), detoxified or not, on the parameters of *in vitro* degradability and ruminal fermentation. A randomized complete design was utilized in a factorial scheme (2 x 2 x 2), where two treatments were evaluated (castor cake and jatropha cake), two types of processing (detoxified or not) and two inclusion levels of cakes (jatropha 25 and 35 %; castor bean 25% and 50%) in substitution of soybean meal (control diet). The animal diets were formulated based on the NRC (2007) recommendations to meet the requirements of the in maintenance adult sheeps, with roughage:concentrate ratio of 50:50. The substrates (diets) were incubated in bottles in the presence of ovine inoculum and buffer solution. After 24 hours of incubation, it was observed that inclusion of CJ and CC, detoxified or not, in substitution of soybean meal did not affect total gas production (TGP), NH₃-N production, total short-chain fatty acid (SCFA), ruminal pH and number of protozoa. However, the inclusion of 35% of detoxified CC decreased the organic matter degradability by approximately 10% when compared to control diet, as well as reduced the partition factor value for the same diet. The inclusion of 35% of non-detoxified CC reduced the methane production (CH₄P) by approximately 32% when compared to the control diet. There was a reduction in isobutyrate concentration with the inclusion of 50% of detoxified CJ (21.6%), 35% of CC (20%) and 25% of detoxified CC (16.6%), while isovalerate concentration was reduced for both cakes, treated or not, independently of the inclusion level. The results showed that CC and CJ, detoxified or not, showed potential for use in ruminant animals feeding without causing deleterious effects on the organic matter degradability, except for the diet with 35% of detoxified CJ, and in ruminal fermentation parameters at the addition levels tested in this study. The inclusion of 35% of non-detoxified CC showed potential of methane mitigation, nevertheless, the presence of PE may have changed methanogenic bacteria population in the ruminal fluid.

Keywords: By-products. Bioactive molecules. Ruminal fermentation. Methane. Isoacids.

4.1 Introdução

A busca por alternativas para substituição do petróleo por fontes de energia renováveis e limpas, assim como a preocupação com a redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE), aumenta ainda mais a relevância na utilização dos biocombustíveis na matriz energética (BOMFIM; SILVA; SANTOS, 2009). Devido à capacidade de adaptação à diferentes tipos de solos e climas e ao alto teor e qualidade de óleo das sementes, o pinhão manso e a mamona despertam interesse político e social para a produção de biodiesel (CHEN et al., 2012; SILVA et al., 2015).

A extração do óleo dessas oleaginosas gera grandes volumes de subprodutos, sendo um problema a ser superado para garantir a sustentabilidade da cadeia de produção. Os subprodutos podem e devem ser utilizados na alimentação animal, entretanto, no caso do pinhão manso e da mamona, o seu uso ainda é limitado devido à presença compostos tóxicos nessas oleaginosas (ABDALLA et al., 2008).

A toxicidade do pinhão manso é atribuída à presença de ésteres de forbol (EF), enquanto na mamona, é a ricina (GÜBITZ; MITTELBAACH; TRABI, 1999; MAKKAR, 2016; OLIVEIRA et al., 2010a). Uma maneira de utilização desses subprodutos é através da inativação desses compostos tóxicos. Diversos trabalhos têm sido realizados buscando o desenvolvimento de métodos de destoxificação da torta do pinhão manso e da mamona, entretanto, poucos métodos foram capazes de promover a destoxificação total das tortas (BOMFIM; SILVA; SANTOS, 2009; MAKKAR, 2016). Além disso, a maioria dos processos de destoxificação necessitam de várias etapas, equipamentos e/ou reagentes específicos, associados ou não a altas temperaturas e pressão, o que dificulta sua utilização em escala industrial (PALMIERI et al., 2016).

A dose letal de ricina e dos EF varia com a espécie animal sendo em geral os animais monogástricos mais susceptíveis quando comparados aos animais ruminantes, para ambas biomoléculas (FONSECA; SOTO-BLANCO, 2014; EFSA, 2015). A maior tolerância dos animais ruminantes a toxicidade dessas biomoléculas é atribuída à presença dos microrganismos do rúmen. No entanto, Makkar e Becker (2010) verificaram que os EF não são degradados pelos microrganismos do rúmen e sugerem que os animais ruminantes sejam tão susceptíveis aos EF quanto os animais monogástricos. Com relação à ricina, os microrganismos ruminais são capazes de degradá-la parcial durante o processo de fermentação ruminal (OLIVEIRA et al., 2010a).

Dessa maneira, é recomendada a inativação total dos EF e da ricina para uso das tortas de pinhão manso e mamona na alimentação animal (MAKKAR; BECKER, 2010; OLIVEIRA et al., 2010a). Durante o processo de destoxificação da torta, os teores de nutrientes, principalmente da proteína bruta, podem ser reduzidos e, conseqüentemente, influenciar na qualidade das dietas formuladas com esses alimentos (ANANDAN et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da substituição parcial do farelo de soja pela torta de mamona e de pinhão manso, destoxificada ou não, sobre os parâmetros de degradabilidade e fermentação ruminal *in vitro*.

4.2 Material e Métodos

O estudo foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal (Lana) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP, seguindo as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais do CENA (Protocolo Nº 001/2016).

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 2 sendo dois tratamentos (torta de mamona e torta de pinhão manso), dois processamentos (destoxificada ou não) e dois níveis de inclusão das tortas (25 e 35% pinhão manso e 25% e 50% mamona) em substituição ao farelo de soja. Para grau de comparação foi utilizado um tratamento controle.

4.2.1 Preparação das dietas

As tortas de mamona destoxificada (TMD) e não destoxificada (TM) foram cedidas pela Embrapa Caprinos e Ovinos. A torta, proveniente da indústria de óleos, foi obtida após a extração do óleo por prensagem mecânica, utilizando temperaturas entre 60° e 70°C. A destoxificação foi realizada de acordo Anandan et al. (2005) com adaptações de Andrade (2015), utilizando hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), na quantidade de 90 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para cada quilo de torta diluídos em 2 L de água. A torta foi misturada à solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ com auxílio de um misturador durante oito horas, seguidos por 16 horas de repouso e posterior secagem ao sol.

A torta de pinhão manso (TPM) foi obtida após a prensagem das sementes. O processamento das sementes foi realizado nas dependências do LANA/CENA/USP e consistiu na dupla prensagem a frio das sementes durante 40 minutos. Para a destoxificação, a torta foi moída e submetida a extração em soxhlet por 6 horas a 90° C utilizando como solvente éter etílico na proporção de 1:100 (g/mL).

As dietas foram formuladas com base nas recomendações do NRC (2007) para atenderem as exigências de ovinos adultos em manutenção e com relação volumoso:concentrado de 50:50 e concentrações de proteína bruta (PB) semelhantes. As dietas foram moídas em moinho de faca com peneira com crivos de 1 mm.

Os ingredientes da dieta foram analisados quanto aos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), PB, extrato etéreo (EE) de acordo com (AOAC, 2011) e fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina pelo método sequencial segundo Van Soest et al. (1991). A análise bromatológica e a proporção dos ingredientes utilizados na formulação das dietas são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Composição centesimal e bromatológica das dietas experimentais

Itens ²	Controle	Dietas experimentais ¹							
		TM		TMD		TPM		TPMD	
		25	50	25	50	25	35	25	35
<i>Ingredientes</i>									
Feno	52	52	52	52	52	52	52	52	52
Milho	33	32	32	32	32	32	32	32	32
FS	13	10,5	7	10,5	7	10,5	9	10,5	9
TM	-	3,5	7	-	-	-	-	-	-
TMD	-	-	-	3,5	7	-	-	-	-
TPM	-	-	-	-	-	3,5	5	-	-
TPMD	-	-	-	-	-	-	-	3,5	5
MM	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>Composição bromatológica³ (em g kg⁻¹ de MS)</i>									
MS	932	929	929	929	928	926b	925	925	924
MO	928	937	931	930	927	939	942	936	937
PB	130	121	124	119	121	126	120	126	127
EE	14	26	34	28	32	35	45	19	22
FDN	679	640	655	634	659	650	661	667	668
FDA	284	277	298	268	279	283	296	297	338
LIG	61	72	90	66	87	66	83	60	88

¹TM: torta de mamona; TMD: torta de mamona destoxificada; TPM: torta de pinhão manso; TPMD: torta de pinhão manso destoxificada. Porcentagem da torta na ração concentrada, com base na MS.

²FS = Farelo de soja; TM = torta de mamona; TMD = torta de mamona destoxificada; TPM = torta de pinhão manso; TPMD = torta de pinhão manso destoxificada; MM = mistura mineral.

³MS: matéria seca (com base na matéria original); MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; LIG: lignina.

4.2.2 Animais

Foram utilizados como doadores de inóculo seis ovinos machos adultos da raça Santa Inês, providos de cânula permanente no rúmen, alimentados com feno de Tifton 85 (*Cynodon* spp.) e concentrado (70% milho moído e 30% farelo de soja) com livre acesso a água e mistura mineral.

4.2.3 Preparo do inóculo

O conteúdo ruminal dos seis animais foi coletado antes da alimentação matinal para ser utilizado como inóculos. A fração sólida e líquida foram colhidas separadamente e mantidas em condições anaeróbias a 39°C. Volumes semelhantes (50:50 v/v) das frações (BUENO et al., 2005) foram homogeneizadas com auxílio de um liquidificador contendo CO₂ em seu interior, filtradas em tecido de algodão e mantidas em banho-maria a 39° C sob fluxo de CO₂ até a incubação. O conteúdo ruminal dos animais foi combinado dois-a-dois para formar três inoculos ruminais diferentes.

4.2.4 Ensaio *in vitro* de produção de gases

A técnica de produção de gases *in vitro* utilizada nesse estudo foi a semiautomática com transdutor de pressão e um data logger (Press data 800, Lana, CENA, USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil) descrita por Theodorou et al. (1994) e com adaptações de Mauricio et al. (1999), Bueno et al. (2005) e Longo et al. (2006).

Foi pesado 0,5 g de cada dieta em saquinhos de determinação de fibra Ankon F57 (Ankom Technology Corp., USA). A incubação foi realizada em garrafinhas de vidro de 160 mL onde foram acondicionados os saquinhos contendo a dieta experimental, 50 mL de solução tampão nutritiva (solução de Menke) e 25 mL de inóculo deixando um espaço para acúmulo de gases de 85 mL (head space) (ABDALLA et al., 2012; LONGO et al., 2006). As garrafinhas foram fechadas com tampa de borracha, agitadas e incubadas a 39°C em estufa de circulação forçada de ar (Marconi MA35, Piracicaba, SP, Brasil) durante 24 horas.

Cada inóculo foi considerado uma repetição e foram utilizadas duas garrafinhas por inóculo, consideradas como réplicas. Para cada inóculo foram ainda acrescentadas duas garrafinhas sem substrato (branco) utilizadas para correção da produção líquida de gases e

produção líquida de metano e duas garrafinhas com um padrão interno, contendo feno Tifton 85 (*Cynodon spp*) para monitoramento das condições de inoculação.

A pressão do gás produzido foi medida em intervalos de 4, 8, 12 e 24 horas após a incubação com auxílio de um transdutor de pressão (Pressdata 800, Lana/CENA-USP/Piracicaba-SP) e a produção total de gases registrada. Para a determinação da concentração de metano (CH₄) foram amostrados 2,5 mL de gás de cada garrafinha em cada tempo de mensuração de pressão com auxílio de uma seringa de 5 mL e armazenados em tubos à vácuo de 12 mL, totalizado ao fim de 24 horas de incubação 10 mL de gás armazenado. A cada coleta, o gás remanescente na garrafinha foi liberado para o ambiente e as garrafinhas agitadas manualmente e recolocadas na estufa. O volume de gás produzido foi calculado de acordo com Soltan et al. (2012). O metano produzido foi analisado por cromatografia gasosa em coluna Shincarbon ST 100/120 micro empacotada a 60°C e determinado por um detector de ionização de chama (FID) operando a 204°C no equipamento Shimadzu GC2014 (Tóquio, Japão). O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 10 mL min⁻¹. A quantificação foi realizada por meio de uma curva de calibração preparada com gás metano (99,5% de pureza) (White Martins Praxair Gases Industrial Inc) nas proporções de 0, 3, 6, 9 e 12%.

A produção de metano (PCH₄) foi determinada de acordo com Longo et al. (2006), pela equação:

$$PCH_4 \text{ (mL)} = (\text{Volume de gás (mL)} + \text{headspace (85 mL)}) * \text{concentração de CH}_4 \text{ (mL mL}^{-1}\text{)}$$

A produção de gases total (PGT) e PCH₄ foram expressos em função da matéria orgânica verdadeiramente degradada (mL g⁻¹ MOVD).

4.2.5 Degradabilidade ruminal e características de fermentação

Ao término do período de incubação as garrafinhas foram abertas, os saquinhos retirados e ambos foram colocados em água com gelo para cessar a fermentação. Os saquinhos foram lavados com solução de detergente neutro a 90°C por uma hora, seguida por quatro lavagens com água destilada e cinco minutos em acetona. Após pesagem, os saquinhos foram colocados em cadinhos de porcelana e incinerados em forno de mufla a 550°C. A

matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD) foi calculada pela diferença entre a quantidade de MO incubada e os resíduos após queima a 550°C, sendo os valores corrigidos com a utilização do branco. O fator de partição (FP), indicador de eficiência microbiana, foi calculado pela relação entre MOVD (mg) e a produção total de gás (mL) em 24 horas de acordo com Blümmel, Makkar e Becker (1997).

O conteúdo de líquido de cada garrafinha foi amostrado e utilizado para determinação dos parâmetros fermentativos nitrogênio amoniacal (N-NH₃), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e protozoários.

A concentração N-NH₃, foi analisada pelo método micro-kjeldahlj por destilação a vapor com solução de tetraborato de sódio (5%), coletado em solução de ácido bórico e determinado por titulação em ácido sulfúrico (0,01 N) de acordo com Preston (1995). Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foram separados e determinados por cromatografia gasosa de acordo com Palmquist e Conrad (1971) e Nocek, Hart e Polan (1987) com modificações na programação da temperatura de coluna (temperatura inicial de 100°C por 3,2 min, 123°C por 1,25 min e 126°C por 5 min). A curva de calibração foi preparada utilizando o padrão analítico contendo concentrações conhecidas de cada AGCC (ácidos acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, Chem Service). As análises das amostras foram realizadas em cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu GC2014 (Toquio, Japão) acoplado a um detector de Ionização de Chama (FID), equipado com coluna GP10% SP-1200/1 H₃PO₄ 80/100 Chromosorb WAW (Cat. no. 11965; 6'x1/8" stainless steel, Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Para a quantificação dos protozoários foram colocados 2 mL de fluido ruminal incubado e 2 mL de solução contendo formaldeído 40% e cloreto de sódio na proporção de 1:1 em frascos de vidros para posterior contagem dos protozoários de acordo com Dehority, Damron e McLaren (1983). Antes de iniciar a contagem, os conteúdos dos frascos foram homogeneizados em agitador por 5 segundos e uma alíquota de 0,01 mL foi colocada em uma câmara de Neubauer brigthi-line-L. Opitick (quadriculado de 0,0025 mm² e profundidade de 0,100 mm); a contagem das células foi efetuada com auxílio de um microscópio ótico (Olimpus, modelo CH2) com objetiva 45/66.

4.2.6 Quantificação de ricina e ésteres de forbol

A quantificação da ricina foi realizada nas tortas de mamona destoxificada e não destoxificada. Para isso, 2 g de amostra foram pesadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL e adicionados 40 mL de solução tampão Tris-HCl com pH = 8,0 (90%, INLAB). A solução foi agitada com auxílio de uma mesa agitadora durante 3 horas e posteriormente filtrada em papel filtro. Foi coletado 1 mL do extrato, filtrado em membrana (PTFF) de 0,45 μm e transferido para *vial* de 1,5 mL. A concentração de ricina foi determinada por cromatografia líquida utilizando um cromatógrafo da marca Agilent modelo 1100, equipado com bomba quaternária, injetor automático de amostras, detector de arranjo de fotodiodos, termostato para coluna e coluna Zorbax C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 μm . A eluição foi realizada em gradiente, usando como fase móvel metanol (70%) e água 0,1% de ácido trifluoracético (Vetec) (30%), com vazão de 0,5 mL min^{-1} e temperatura constante de coluna a 30°C. A quantificação da ricina foi realizada por curva padrão construída a partir de padrão analítico de ricina de cadeia A (Sigma Aldrich, L9514). Foram injetados 10 μL de extrato por amostra e a ricina quantificada no comprimento de onda de 214 nm (ROMERO, 2013).

A determinação das concentrações dos EF foi realizada na torta de pinhão manso antes e depois de ser submetida ao processo de destoxificação. Foram pesados 2 g de amostra em tubo de centrifugação e adicionados 15 mL de metanol (100%). Em seguida, o tubo foi levado para sonicação durante 3 min, centrifugado a 5000 rpm por 8 minutos e o sobrenadante coletado. Essa etapa foi repetida por mais duas vezes, o volume final mensurado e o sobrenadante transferido para balão de vidro para secagem em rotaevaporador. Depois de seco, o resíduo foi diluído em 2 mL de metanol, sonicado por 3 min e transferido para um frasco de vidro. O mesmo procedimento foi repetido por mais duas vezes. O coletado total foi seco sob fluxo de nitrogênio em banho-maria, redissolvido em 2 mL de metanol, homogeneizado, filtrado em membrana filtrante (PTFE) de 0,45 μm e transferido 1 mL do extrato para um *vial* para posterior análise (MAKKAR; SIDDHURAJU; BECKER, 2007).

A quantificação dos EF foi realizada por cromatografia líquida utilizando um cromatógrafo da marca Agilent modelo 1100, equipado com bomba quaternária, injetor automático de amostras, detector de arranjo de fotodiodos, termostato para coluna e coluna Zorbax C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 μm . A eluição foi realizada por gradiente e a fase móvel por uma solução composta por ácido ortofosfórico 85% (Merck), acetonitrila e tetrahidrofurano, ambos grau HPLC. A vazão da fase móvel foi mantida por 1,3 mL min^{-1} e a temperatura da coluna a 23° C. A curva padrão foi

construída a partir do padrão analítico 12,13-diacetato de forbol (Sigma Aldrich, P9143) e preparada em concentrações crescentes (ROMERO, 2013).

4.2.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando o programa SAS v. 9.4 (Statistical Analysis System Inst., Cary, North Carolina) conforme modelo estatístico:

$$y_{ijkl} = \mu + T_i + N_j + D_k + e_{ijkl}$$

Onde, y_{ijkl} : variável dependente; μ : média geral; T:efeito do tratamento; N: nível de inclusão; D: destoxificada; e_{ij} : erro experimental.

As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 Resultados e Discussão

As concentrações de EF e ricina nas tortas, destoxificadas ou não, e nas dietas experimentais são apresentadas na Tabela 4.2. Após os tratamentos de destoxificação das tortas de mamona e pinhão manso foram observadas reduções nas concentrações de ricina e EF, respectivamente, entretanto, os tratamentos de destoxificação não foram capazes de degradar totalmente essas biomoléculas. As dietas contendo as tortas destoxificadas apresentaram concentrações de ricina ou EF inferiores as dietas compostas por tortas não tratadas.

Apesar dos EF e da ricina presentes no pinhão manso e na mamona serem considerados o principal fator limitante para o uso de seus subprodutos na alimentação animal (OLSNES; REFSNES; PIHL, 1974; MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998; GÜBITZ; MITTELBAACH; TRABI, 1999; MAKKAR; BECKER, 1999; ANANDAN et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2010a; 2010b), nesse estudo a inclusão da TM e TPM, destoxificada ou não, em substituição ao farelo de soja não afetou a produção de gases total (PGT) ($P=0,0924$) (Tabela 4.3), produção de $N-NH_3$ ($P=0,1586$) e AGCC total ($P=0,6595$) (Tabela 4.4) após 24 horas de incubação, indicando que a fermentação ruminal não foi afetada.

Contudo, a inclusão de 35% de TPM destoxificada diminuiu ($P<0,0041$) a degradabilidade da matéria orgânica em aproximadamente 10% quando comparadas a dieta controle (470 vs 521 g kg^{-1}) (Tabela 4.3). A MOVD das demais dietas não diferiram da dieta controle, embora resultaram em valores numericamente inferiores. A menor MOVD da dieta

com 35% de TPM destoxificada pode estar relacionada à menor digestibilidade da proteína bruta. Makkar, Aderibigbe e Becker (1998) avaliaram a digestibilidade *in vitro* de tortas de pinhão manso e verificaram baixos teores de digestibilidade do nitrogênio (28,9 a 43,8%) enquanto a digestibilidade do farelo de soja foi maior (89%) e sugeriram que a torta possui um alto nível de proteína não degradada que pode estar disponível pós-ruminal (MAKKAR; BECKER, 2009). Além disso, no processo de destoxificação da TPM foi utilizado aquecimento (90°C durante 6 horas) e pode ter provocado uma redução na solubilidade e valor nutritivo das proteínas (reação Maillard) (SHIBAO; BASTOS, 2011).

O FP é um índice que inclui a MOVD, o padrão de resultado encontrado para MOVD repete-se para FP, no qual a dieta com inclusão de 35% de TPM destoxificação obteve valor inferior ($P < 0,008$) (1,79 mg MOVD mL⁻¹ GP) quando comparado ao tratamento controle (2,0 mg MOVD mL⁻¹ GP). Como o FP é um indicativo da eficiência microbiana, os resultados evidenciaram que todos os tratamentos, com exceção de 35% de TPMD, apresentaram uma eficiência microbiana similar à do tratamento controle.

A inclusão de 35% de TPM não destoxificada reduziu ($P < 0,006$) aproximadamente em 32% a PCH₄ quando comparado à dieta controle (1,67 e 2,53 mL g⁻¹ MOVD, respectivamente) (Tabela 4.3). Este resultado pode estar relacionado a menor MOVD do tratamento com 35% de TPM não destoxificada em relação ao controle (489 vs 521 g kg⁻¹, respectivamente), uma vez que não foi verificada alteração na eficiência microbiana, como demonstrado pelo FP. Resultados semelhantes foram encontrados por Akanmu e Hassen (2017) e Abdalla et al. (2008).

Com relação a TM, não foram observadas diferenças entre os níveis de adição e tratamento em relação a dieta controle para os parâmetros de degradação e produção de gases (Tabela 4.3). Abdalla et al. (2012) avaliaram a inclusão de TM em diferentes proporções em substituição ao farelo de soja e não observaram redução na PGT, PCH₄ e MOVD em relação ao grupo controle. Esses resultados indicam que a quantidade de ricina presente nas tortas utilizadas nesse estudo não prejudicou a fermentação ruminal. Segundo Oliveira et al. (2010a), os microrganismos do rúmen são capazes de degradar a ricina, porém essa capacidade decresce linearmente com aumento na concentração de ricina ou na quantidade de TM.

Tabela 4.2 – Concentrações de ricina e ésteres de forbol nas tortas de mamona e pinhão manso, respectivamente, e dietas experimentais

Parâmetros	Torta de mamona						Torta de pinhão manso					
	Não Destoxificada			Destoxificada			Não Destoxificada			Destoxificada		
	Torta	Tratamentos ¹		Torta	Tratamentos ¹		Torta	Tratamentos ¹		Torta	Tratamentos ¹	
		25%	50%		25%	50%		25%	35%		25%	35%
Ricina, mg g ⁻¹	0,606	0,011	0,021	0,303	0,005	0,011	-	-	-	-	-	-
Ésteres de forbol, mg g ⁻¹	-	-	-	-	-	-	0,65	0,011	0,016	0,45	0,008	0,011

¹Tratamentos experimentais = Torta de mamona ou não destoxificada, substituindo 25 e 50% do farelo de soja; torta de pinhão manso destoxificada ou não, substituindo 25 ou 35% o farelo de soja

Tabela 4.3 - Parâmetros de produção de gases e degradabilidade *in vitro* das dietas contendo tortas de mamona e pinhão manso destoxificada ou não com dois níveis de inclusão em substituição ao farelo de soja

Parâmetros ²	Tratamentos ¹										EPM ³	Valor-P
	Controle	Torta de mamona				Torta de pinhão manso						
		Não Destoxificada		Destoxificada		Não Destoxificada		Destoxificada				
		25%	50%	25%	50%	25%	35%	25%	35%			
MOVD (g kg ⁻¹)	521 ^a	512 ^{ab}	493 ^{ab}	516 ^{ab}	485 ^{ab}	506 ^{ab}	489 ^{ab}	535 ^a	470 ^b	11,02	0,0041	
PGT (mL g ⁻¹ MS)	113	113	107	114	117	111	110	118	114	6,13	0,2719	
PGT (mL g ⁻¹ MOVD)	59,22	57,98	52,73	58,75	56,82	56,41	54,20	63,22	53,51	3,47	0,0924	
PCH ₄ (mL g ⁻¹ MOVD)	2,53 ^a	2,07 ^{ab}	1,83 ^{ab}	2,24 ^{ab}	1,84 ^{ab}	2,07 ^{ab}	1,67 ^b	2,48 ^a	2,29 ^{ab}	0,25	0,0063	
FP (mg MOVD mL ⁻¹ GP)	2,00 ^{ab}	1,98 ^{ab}	2,01 ^a	2,00 ^{ab}	1,81 ^{ab}	2,00 ^{ab}	1,96 ^{ab}	1,98 ^{ab}	1,79 ^b	0,10	0,0076	

¹Tratamentos experimentais = Torta de mamona ou não destoxificada, substituindo 25 e 50% do farelo de soja; torta de pinhão manso destoxificada ou não, substituindo 25 ou 35% o farelo de soja.

²PGT = produção de gases total; PCH₄ = produção de metano; MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada; FP = fator de partição.

³EPM = erro padrão da média.

Médias com letras diferentes na mesma linha indicam efeito significativo de tratamento teste de Tukey a 5% probabilidade.

Com relação aos parâmetros ruminais, a inclusão das TM e TPM, destoxificadas ou não, não influenciaram as concentrações de N-NH₃ (P= 0,1586), produção total de AGCC (P= 0,6591) e acetato (P= 0,4238), propionato (P= 0,4070), butirato (P= 0,5063), valerato (P= 0,6973), relação acetato:propionato (P= 0,6129) e protozoários (P= 0,2889) (Tabela 4.4).

Os valores de pH ruminal encontrados nesse estudo estão dentro da faixa 5,5 a 7, considerada normal para atividade dos microrganismos (FEITOSA, 2008). A concentração de N-NH₃ variou entre 32,58 e 36,55 mg dL⁻¹ no líquido ruminal. Todos os valores observados foram superiores a concentração mínima necessária para adequada fermentação microbiana no rúmen (10 mg dL⁻¹) estabelecida por Van Soest (1994). Segundo Mehrez, Orskov e McDonal (1977) a concentração mínima necessária para proporcionar máxima atividade fermentativa e o desaparecimento máximo da matéria seca deve ser igual ou superior a 23,5 mg dL⁻¹ de N-NH₃.

Os AGCC são os principais produtos finais da degradação ruminal dos carboidratos realizada pelos microrganismos e a sua concentração no rúmen depende da composição da dieta e população microbiana (TAJIMA et al., 2001). De maneira geral, do total de AGCC produzido no rúmen, 54 a 74% é acetato, 16 a 27% é propionato, 6 a 15% é butirato, 1 a 4,5% é isobutirato, 1 a 1,7% é valerato e 0,5 a 4% é isovalerato e variações nas concentrações são atribuídas à diferenças na composição da dieta (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

Moreira et al. (2016) observaram aumento nas concentrações de acetato e propionato *in vitro* ao substituir a cana-de-açúcar pela TM em níveis crescentes e atribuíram esses resultados as concentrações de FDN e FDA provenientes da TM, enquanto a TPM mostrou diminuição de acetato devido ao aumento na concentração de lipídios na dieta. Os autores também verificaram que a relação acetato:propionato aumentou com a adição das tortas. Medeiros et al. (2015) verificou que a substituição de até 70% da silagem de milho por TM ou TPM proporcionou a diminuição a produção de acetato, propionato e butirato em relação a dieta controle (silagem de milho).

Com relação aos isoácidos, houve redução na concentração do isobutirato com a inclusão de 50% de TM destoxificada (21,6%), 35% de TPM (20%) e 25% de TPM destoxificada (16,6%), enquanto que a concentração de isovalerato foi reduzida com a inclusão da TM e TPM, tratada ou não, independentemente no nível de inclusão. Os isoácidos estão envolvidos no catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada e reduções em suas concentrações indicam menor taxa de desaminação no rúmen (RUSSEL, 2002), a qual é compensada no intestino delgado. Assim, a redução na conversão de proteínas e aminoácidos

a amônia no rúmen acarreta redução nas perdas de amônia na forma de ureia na urina e possibilita um maior aproveitamento do N da dieta (SILVEIRA, 2013).

Os resultados encontrados nesse estudo indicam que as concentrações de EF e ricina utilizadas nas dietas com inclusão de TPM e TM não foram suficientes para causar danos aos microrganismos ruminais. Isso ocorreu provavelmente devido à baixa concentração de EF e ricina presentes nas dietas experimentais (Tabela 4.2). Apesar dos resultados obtidos mostrarem potencial de uso das TM e TPM na alimentação de ruminantes, a recomendação para seu uso deve ser cautelosa uma vez que existem diversos estudos relatando o efeito tóxico dessas biomoléculas em ruminantes (ASLANI et al., 2007; EFSA, 2008; DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010; FONSECA; SOTO-BLANCO, 2014).

Simulando a utilização das dietas experimentais para ovinos pesando 40 kg e consumindo em média 1,200 kg de ração dia⁻¹, estes estariam ingerindo 0,45 e 0,64 mg de EF kg⁻¹ de PC nas dietas com 25 e 35% de TPM destoxificada e 0,68 e 0,97 mg de EF kg⁻¹ de PC de EF nas dietas com 25 e 35% de TPM, enquanto nas dietas com 25 e 50% TM destoxificada seriam 0,31 e 0,63 mg de ricina kg⁻¹ de PC e 0,63 e 1,27 mg de ricina kg⁻¹ de PC nas dietas com 25 e 50% TM.

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, pode-se sugerir que esses animais não apresentariam alterações na fermentação ruminal. Oliveira et al. (2010b) não observaram efeito nocivo em ovinos que ingeriram 2,42mg de ricina kg⁻¹ de PC durante 21 dias.

Com relação aos EF, Ferreira et al. (2012), verificaram redução no ganho de peso e consumo de ovinos alimentados com dietas contendo 0,57 e 1,36 mg kg⁻¹ de EF, além de sintomas de intoxicação, lesões histopatológicas e alterações no perfil hematológico e renal. De acordo com Makkar e Becker (2010), os EF não são degradados pelos microrganismos do rúmen, o que faz dos animais ruminantes tão susceptíveis aos efeitos dessas biomoléculas quanto os animais ruminantes.

Devido ao valor nutricional, a TM e TPM são considerados alimentos potenciais para o uso na alimentação animal (ABDALLA et al., 2008) e tem como vantagem a impossibilidade de utilização na alimentação humana. Dessa forma, estratégias podem ser desenvolvidas para possibilitar a utilização desses subprodutos na alimentação animal. O desenvolvimento de métodos de destoxificação que visem a degradação/inativação total dos EF e ricina, assim como estudos *in vivo* que possibilitem estabelecer níveis seguro de inclusão dessas tortas são pré-requisitos para sua utilização.

Tabela 4.4 - Parâmetros fermentativos ruminais *in vitro* das dietas contendo tortas de mamona e pinhão manso destoxificada ou não com dois níveis de inclusão em substituição ao farelo de soja

Parâmetros ²	Tratamentos ¹								EPM ³	Valor-P	
	Controle	Torta de Mamona				Torta de Pinhão Manso					
		Não Destoxificada		Destoxificada		Não Destoxificada		Destoxificada			
		25%	50%	25%	50%	25%	35%	25%	35%		
pH	6,83	6,84	6,85	6,83	6,82	6,83	6,82	6,81	6,85	0,02	0,4004
N-NH ₃ (mg dL ⁻¹)	36,27	35,42	33,43	36,55	33,15	32,87	32,58	34,00	35,42	2,13	0,1586
Protozoários (x10 ⁵ cel mL ⁻¹)	4,40	3,85	4,50	5,05	4,68	4,20	5,83	5,32	3,75	7,11	0,2889
Total AGCC	75,6	77,2	76,9	75,7	74,7	73,6	74,0	73,8	73,5	2,71	0,6591
Concentração de AGCC (mmol L ⁻¹)											
Acetato	51,42	59,97	50,38	49,46	48,50	48,18	48,40	48,20	48,23	1,70	0,4238
Propionato	13,76	14,47	14,62	14,59	14,48	13,93	14,02	14,22	13,88	0,83	0,4070
Butirato	8,25	8,75	8,80	8,47	8,82	8,53	8,63	8,45	8,45	0,30	0,5063
Isobutirato	0,60 ^a	0,52 ^{ab}	0,53 ^{ab}	0,53 ^{ab}	0,47 ^b	0,51 ^{ab}	0,48 ^b	0,50 ^b	0,52 ^{ab}	0,03	0,0025
Valerato	0,95	0,97	0,97	0,90	0,93	0,90	0,93	0,92	0,93	0,06	0,6973
Isovalerato	1,62 ^a	1,52 ^{ab}	1,56 ^{ab}	1,50 ^{ab}	1,50 ^{ab}	1,46 ^{ab}	1,50 ^{ab}	1,45 ^b	1,55 ^{ab}	0,04	0,0341
C2:C3	3,67	3,54	3,46	3,36	3,35	3,46	3,47	3,41	3,47	0,10	0,6129

¹Tratamentos experimentais = Torta de mamona Destoxificada ou não destoxificada, substituindo 25 e 50% do farelo de soja; torta de pinhão manso destoxificada ou não, substituindo 25 ou 35% o farelo de soja.

²AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; C2:C3 = relação acetato:propionato.

³EPM = erro padrão da média.

Médias com letras diferentes na mesma linha indicam efeito significativo de tratamento teste de Tukey a 5% probabilidade.

4.4 Conclusão

A inclusão de TPM e TM, destoxificada ou não, apresentou potencial para utilização na alimentação de animais ruminantes sem causar efeitos deletérios na degradabilidade da matéria orgânica, exceto para a dieta com 35% TPM destoxificada, e nos parâmetros de fermentação ruminal nos níveis de adição testados nesse estudo. A inclusão de 35% de TPM não destoxificada apresentou potencial de mitigação de metano. Estudos *in vivo* são necessários para avaliar o efeito dos EF e ricina sobre a microbiota ruminal e estabelecer níveis de inclusão das mesmas e tempo de exposição que não causem efeitos deletérios aos animais.

Referências

- ABDALLA, A. L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. esp., p. 260–268, 2008.
- ABDALLA, A. L. et al. *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, p. 953–964, 2012.
- AKANMU, A. M.; HASSEN, A. The use of certain medicinal plant extracts reduced *in vitro* methane production while improving *in vitro* organic matter digestibility. **Animal Production Science**, Victoria, 2017. <http://dx.doi.org/10.1071/AN16291>.
- ANANDAN, S. et al. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 120, n. 1–2, p. 159–168, 2005.
- ANDRADE, I. R. A. de. **Destoxificação da torta de mamona por produtos químicos alternativos**. 2015. 90 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 18. ed. Arlington: AOAC International, 2011.
- ASLANI, M. R. et al. Castor bean (*Ricinus communis*) toxicosis in a sheep flock. **Toxicon**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 400–406, 2007.
- BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *In vitro* gas production: a technique revisited. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 77, p. 24 – 34, 1997.

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

BUENO, I. C. S. et al. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123–124, p. 95–105, 2005.

CHEN, C. R. et al. Green production of energetic *Jatropha* oil from de-shelled *Jatropha curcas* L. seeds using supercritical carbon dioxide extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, Cincinnati, v. 66, p. 137–143, 2012.

DEHORITY, B. A.; DAMRON, W. S.; MCLAREN, J. B. Occurrence of the rumen ciliate *Oligoisotricha bubali* in domestic cattles (*Bos taurus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, DC, v. 45, n. 4, p. 1394–1397, 1983.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha* toxicity -A review. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, Nairobi, v. 13, n. 6, p. 476–507, 2010.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on ricin (from *Ricinus communis*) as undesirable substances in animal feed: (Question N° EFSA-Q-2003—062). **The EFSA Journal**, Parma, v. 726, p. 1–38, 2008.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Scientific opinion on risks for human and animal health related to the presence of phorbol esters in *Jatropha* kernel meal. **EFSA Journal**, Parma, v. 13, n. 12, p. 1 – 80. 2015.

FEITOSA, F.L.F. Semiologia do sistema digestório de ruminantes. In: FEITOSA, F.L.F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. cap. 5 p. 108–138.

FERREIRA, O. R. et al. Toxicidade do pericarpo da *Jatropha curcas* em ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 3, p. 559–567, 2012.

FONSECA, N. B. D. S.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade da ricina presente nas sementes de mamona. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 1415–1424, 2014.

GÜBITZ, G.; MITELBBACH, M.; TRABI, M. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource Technology**, Barking, v. 67, n. 1, p. 73–82, 1999.

LONGO, C. et al. The influence of head-space and inoculum dilution on in vitro ruminal methane measurements. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 62–65, 2006.

MAKKAR, H. P. S. State-of-the-art on detoxification of *Jatropha curcas* products aimed for use as animal and fish feed: A review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 222, p. 87–99, 2016.

MAKKAR, H. P.; BECKER, K. Nutritional studies on rats and fish (carp *Cyprinus carpio*) fed diets containing unheated and heated *Jatropha curcas*. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, 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**, Weinheim, v. 111, n. 8, p. 773–787, 2009.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Are *Jatropha curcas* phorbol esters degraded by rumen microbes? **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, n. 9, p. 1562–1565, 2010.

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

MAKKAR, H. P. S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Phorbol esters. In: MAKKAR, H.P.S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. (Ed.) **Plant secondary metabolites**. Totowa, NJ: Humana Press, 2007. 130 p. (Methods in Molecular Biology, 393).

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

MAURICIO, R. M. et al. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 321–330, 1999.

MEDEIROS, F. F. DE et al. Greenhouse gases, short-chain fatty acids and ruminal pH *in vitro* of biodiesel byproducts to replace corn silage. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 16, n. 4, p. 935–947, 2015.

MEHREZ, A. Z.; ORSKOV A N, E. R.; McDONAL, I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 38, p. 437–447, 1977.

MOREIRA, M. N. et al. Effect of replacement of sugarcane by oilseed press cakes in greenhouse gases and volatile fatty acids production *in vitro*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 38, n. 3, p. 293 - 300, 2016.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of small ruminant: sheep, goat, cervids, and New World camelids**. Washington, DC: National Academic Press, 2007. 292 p.

NOCEK, J. E.; HART, S. P.; POLAN, C. E. Rumen ammonia concentration as influenced by storage time, freezing and thawing, acid preservative, and method of ammonia determination. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, n. 3, p. 601–607, 1987.

OLIVEIRA, A. S. et al. *In vitro* ruminal degradation of ricin and its effect on microbial growth. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 157, n. 1–2, p. 41–54, 2010a.

OLIVEIRA, A. S. et al. Nutrient digestibility, nitrogen metabolism and hepatic function of sheep fed diets containing solvent or expeller castorseed meal treated with calcium hydroxide. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 158, p. 15–28, 2010b.

OLSNES, S.; REFSNES, K.; PIHL, A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. **Nature**, London, v. 249, p. 627–631, 1974.

PALMIERI, A. D. et al. Nutritional and productive performance of goats kids fed diets with detoxified castor meal. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 216, p. 81–92, 2016.

PALMQUIST, D. L.; CONRAD, H. R. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or high fat diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, n. 7, p. 1025–1033, 1971.

PRESTON, T. R. **Tropical animal feeding: a manual for research workers**. Rome: FAO, 1995. 126 p. (Animal Production and Health Paper).

ROMERO, A. de C. **Resíduo da produção de biodiesel: Avaliação de moléculas bioativas e potencial de aplicação na alimentação animal**. 2013. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

RUSSEL, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Washington, DC: USDA, ARS, 2002.

SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 24, n. 6, p. 895–904, 2011.

SILVA, L. M. et al. Use of castor meal (*Ricinus communis* L.) as a source of dietary protein in goats during the mating period: Impact on reproductive and metabolic responses. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 203–216, 2015.

SILVEIRA, A. M. **Efeito de ácidos orgânicos ou monensina sódica sobre a fermentação ruminal**. 2013, 55 f. (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

SOLTAN, Y. A. et al. Comparative *in vitro* evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. **Journal of Animal and Feed Science**, Jablonna, v. 21, n. 4, supl. 18, Part 2, p. 559–572, 2012.

TAJIMA, K. et al. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, n. 6, p. 2766–2774, 2001.

THEODOUROU, M. K. et al. A simple gas production method use a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 48, p. 185 – 197, 1994.

VALADARES FILHO, S. de C.; PINA, D. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funesp, 2011. p. 161–191, 151-182.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3583-3597. 1991.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1994. 476 p.

5 EFICIÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE NUTRIENTES POR OVINOS ALIMENTADOS COM DIETA CONTENDO TORTA DE MAMONA DESTOXIFICADA EM SUBSTITUIÇÃO AO FARELO DE SOJA

Resumo: A torta de mamona é um subproduto da indústria de biodiesel com elevado valor nutricional para utilização na alimentação de ruminantes, entretanto, seu uso é restrito devido a presença de ricina. Apesar dos métodos de destoxificação serem estudados a muitos anos, ainda existem poucos trabalhos avaliando os efeitos desse subproduto na alimentação animal e o seu potencial nutritivo em função da sua destoxificação e composição química. Dessa maneira, torna-se oportuno estudar a capacidade de utilização dos nutrientes da torta de mamona destoxificada na dieta de animais ruminantes. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da substituição parcial do farelo de soja pela torta de mamona destoxificada sobre o consumo, digestibilidade aparente dos nutrientes, síntese de proteína microbiana, balanço de nitrogênio, parâmetros ruminais, microbiota ruminal e emissão de metano entérico de ovinos alimentados com esse subproduto. Para isso, 10 ovinos, machos, castrados, da raça Santa Inês, com peso corporal (PC) médio inicial de $42,9 \pm 3,72$ kg foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado e divididos em dois grupos: controle e teste, substituição de 50% do farelo de soja por torta de mamona (TM) destoxificada. A TM destoxificada apresentava concentrações de ricina de $0,303 \text{ mg g}^{-1}$ e o consumo de ricina foi de $0,59 \text{ mg kg}^{-1}$ peso corporal dia^{-1} . Durante o período experimental os animais alimentados com TM não apresentaram sintomas clínicos de intoxicação por ricina e os níveis sérico de creatinina, ureia, TGO e TGP também não foram alterados, estando dentro do padrão de normalidade para a espécie. A inclusão da TM destoxificada não refletiu sobre o consumo dos animais, entretanto, reduziu a digestibilidade da MS, MO e FDN. A síntese microbiana ruminal, o balanço de nitrogênio, a produção de N-NH_3 e o pH ruminal não foram afetados pela inclusão da TM destoxificada em substituição do farelo de soja. A produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) também não foram alterados, com exceção do acetato, que aumentou com a inclusão da TM destoxificada em relação a dieta com farelo de soja. Entretanto, não foi observada alteração na relação acetato:propionato. A abundância relativa das espécies *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *S. ruminantium* e fungos, população absoluta de *Archaea metanogenicos*, e número de protozoários não foram alteradas pela inclusão da TM destoxificada em comparação à dieta controle, assim como emissão de metano. Apesar do potencial de substituição da torta de mamona destoxificada, a redução na digestibilidade aparente de alguns nutrientes podem refletir na redução do desempenho animal.

Palavras-chave: Biodiesel. Subprodutos. Ricina. Toxicidade. Digestibilidade. Ácidos graxos de cadeia curta. População microbiana ruminal.

NUTRIENT USE EFFICIENCY BY SHEEP FED WITH DIET CONTAINING DETOXIFIED CASTOR CAKE IN REPLACEMENT OF SOYBEAN MEAL

Abstract: Castor cake is a byproduct of biodiesel industry with high nutritional value for use in ruminant feeding, however, its use is restricted due to the presence of ricin. Although methods of detoxification have been studied for many years, there are still few studies evaluating the effects of this by-product on animal nutrition and its nutritional potential in function of detoxification and chemical composition. In this way, it is opportune to study nutrient use capacity of detoxified castor cake in ruminant animal diet. The objective of this study was to evaluate the influence of partial substitution of soybean meal for detoxified castor cake on the consumption, apparent digestibility of nutrients, and synthesis of microbial nitrogen compounds, nitrogen balance, ruminal parameters, ruminal microbiota and enteric methane emission of sheep fed with this by-product. For this, 10 sheep, male, castrated, Santa Inês breed, with initial mean body weight (BW) of 42.87 ± 3.72 kg were distributed in a randomized complete design and divided into two groups: control and test, substitution of 50% of soybean meal for detoxified castor cake (DCC). The DCC showed ricin concentrations of 0.303 mg g^{-1} and ricin consumption was $0.59 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ body weight. During the experiment period, the animals showed no clinical symptoms of ricin intoxication and, serum levels of creatinine, urea, glutamic oxaloacetic transaminase and glutamic pyruvic transaminase levels were also not changed, being within the normality standard for the specie. The inclusion of DCC reduced dry matter and organic matter digestibility, however, did not reflect on animal's consumption. The ruminal microbial synthesis, nitrogen balance, N-NH₃ production and ruminal pH were not affected by the inclusion of DCC in replacement of soybean meal. The production of short chain fatty acids were not changed either, except for acetate, which increased with the inclusion of DCC in relation to the diet with soybean meal. Nevertheless, no change was observed in acetate: propionate ratio. The species relative abundance of *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *S. ruminantium* and fungi, absolute population of *Archaea metanogenics*, and protozoa number were not changed by DCC inclusion in comparison to control diet, as well as methane emission. Despite the potential for replacement of soybean cake by the detoxified castor cake, the reduction in apparent digestibility of some nutrients may reflect in lower animal performance.

Keywords: Biodiesel. By-products. Ricina. Toxicity. Digestibility. Short-chain fatty acids. Ruminal microbial population.

5.1 Introdução

Com o aumento da população mundial esperado para cerca 8,3 bilhões de pessoas até 2030, é essencial que a sustentabilidade da produção de alimentos ocorra através da produção de proteína animal utilizando recursos localmente disponíveis e animais adaptados ao ambiente (EISLER et al., 2014). Os ruminantes desempenham um papel importante por causa da conversão de alimentos não consumíveis pelos humanos, tais como forragem, arbustos, resíduos de culturas e subprodutos da agropecuária, em proteína de alta qualidade (leite e carne).

A produção de biodiesel vem crescendo ao longo dos anos e, com ela, a quantidade de subprodutos gerados após a extração do óleo das sementes utilizadas na indústria do biodiesel. A introdução desses subprodutos nas dietas de animais de produção pode ser vantajosa, sendo, na maioria das vezes, fontes baratas de proteína e energia (OLIVEIRA et al., 2010a). Entre as oleaginosas com potencial para produção de biodiesel está a mamona (*Ricinus communis* L.), devido ao elevado teor de óleo das sementes e capacidade de adaptação à diferentes tipos de solo e clima (SILVA et al., 2015). A torta de mamona possui elevado teor de proteína bruta e pode ser utilizado como concentrado protéico na alimentação de ruminantes, entretanto, tem sido usada principalmente como adubo orgânico por ser considerada tóxica para alimentação animal (ABDALLA et al., 2008; FURTADO et al., 2014).

A ricina é o principal composto tóxico presente na mamona e atua na inibição da síntese ribossomal de organismos eucariotos. É encontrada principalmente no endosperma da semente, permanecendo na torta após a extração do óleo (OLIVEIRA et al., 2010a). Embora alguns trabalhos relatem a tolerância de animais ruminantes à torta de mamona ou às doses crescentes de ricina (EFSA, 2008; MENEZES et al., 2015), a destoxificação da torta deve ser realizada para tornar seu uso seguro na alimentação animal (ANANDAN et al., 2005).

Apesar dos métodos de destoxificação da torta de mamona serem estudados a muitos anos, ainda existem poucos trabalhos avaliando os efeitos desse subproduto na alimentação animal e o seu potencial nutritivo em função da sua destoxificação e composição química (PALMIERI et al., 2016).

Dessa maneira, torna-se oportuno estudar a capacidade de utilização dos nutrientes da torta de mamona destoxificada na dieta de ruminantes em substituição ao farelo de soja. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da substituição parcial do farelo de soja pela torta

de mamona destoxificada sobre o consumo, digestibilidade aparente dos nutrientes, síntese de compostos nitrogenados microbianos, balanço de nitrogênio, parâmetros ruminiais, microbiota ruminal e emissão de metano entérico de ovinos alimentados com esse subproduto.

5.2 Material e Métodos

O estudo foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP), localizado no município de Piracicaba – SP, Brasil. O Experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Energia Nuclear da Agricultura - CEUA/CENA/USP (Protocolo Nº001-2016).

Os animais experimentais foram adquiridos do próprio rebanho do Laboratório de Nutrição Animal (Lana/CENA/USP), sendo 10 ovinos, machos, castrados, da raça Santa Inês, com peso corporal (PC) médio inicial de $42,9 \pm 3,72$ kg. Os animais foram alojados ao acaso em baias individuais cobertas (1,0 m x 1,5 m) providas de comedouro, bebedouro e piso de borracha durante 14 dias para adaptação à dieta. Em seguida, foram manejados para gaiolas de metabolismo para realização do ensaio de digestibilidade, onde permaneceram por 8 dias e, novamente manejados para as baias individuais para os estudos de síntese de proteína microbiana, emissão de metano entérico e coleta de sangue, durante 9 dias.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Foram utilizados dois tratamentos: o controle, com 0% de substituição do farelo de soja, e o teste, com a torta de mamona destoxificada (TMD) em substituição parcial (50%) ao farelo de soja.

A torta de mamona foi obtida da Indústria e Comércio de Óleos Vegetais Ltda localizada na cidade de Quixadá – CE, a partir da extração mecânica (prensagem) do óleo da semente. A torta obtida foi submetida ao tratamento de destoxificação com hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) na Embrapa Caprinos e Ovinos em Sobral – CE. A destoxificação da torta foi realizada de acordo Anandan et al. (2005) com adaptações de Andrade (2015), utilizando Ca(OH)_2 na quantidade de 90 g diluídos em 2 L de água para cada quilo de torta (com base na matéria natural). A torta foi misturada com a solução de Ca(OH)_2 em um misturador semiautomático por 8 h (com intervalos de 40 minutos a cada 1 hora), seguidos por 16 h em repouso e posterior secagem ao sol.

Foram utilizados na composição das rações o feno de Tifton 85 como alimento volumoso e o milho, farelo de soja e a torta de mamona destoxificada como alimentos concentrados. A composição bromatológica dos alimentos utilizados na composição das dietas pode ser observada na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Composição bromatológica dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais

Variáveis	Alimentos			
	Feno	Milho	FS ¹	TMD ¹
	<i>g kg⁻¹ MS</i>			
Matéria seca ²	921	905	901	931
Matéria orgânica	936	986	933	686
Proteína bruta	66	89	495	336
Extrato etéreo	24	50	17	58
Fibra em detergente neutro	787	258	359	655
Fibra em detergente ácido	443	34	126	329
Lignina	90	9	21	233

¹FS: farelo de soja; TMD: torta de mamona destoxificada;

²Matéria seca com base na matéria original.

As dietas experimentais foram formuladas para atenderem as exigências de manutenção dos animais, com concentrações de proteína bruta próximas e relação volumoso:concentrado de 50:50, com base nas recomendações do NRC (2007). O percentual dos alimentos utilizados na formulação das dietas assim como a composição bromatológica do volumoso e concentrado encontram-se na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Composição percentual das dietas experimentais

Ingredientes	Dietas experimentais	
	Controle	TMD ²
	<i>Composição percentual das rações experimentais</i>	
Feno	50	50
Milho	33,7	30
Farelo de soja	14,5	9,0
Torta de mamona destoxificada	0	9,2
Mistura mineral ¹	1,8	1,8

¹Composição: cálcio: 165 g kg⁻¹; fósforo: 85 g kg⁻¹; magnésio: 10g kg⁻¹; enxofre: 28g kg⁻¹; sódio: 120 g kg⁻¹; cobre: 756 mg kg⁻¹; magnésio: 2180 mg kg⁻¹; zinco: 2800 mg kg⁻¹; iodo: 56 mg kg⁻¹; cobalto: 44 mg kg⁻¹; selênio: 14 mg kg⁻¹; flúor (máximo): 850 mg kg⁻¹;

²TMD = torta de mamona destoxificada.

As rações foram fornecidas aos animais duas vezes ao dia, em duas porções iguais às 8 e às 16 horas, sendo o volumoso e o concentrado misturado no cocho. O consumo de matéria seca foi fixado em 3% do peso corporal e ajustado para que não houvesse sobras e o consumo de água foi *ad libitum*.

5.2.1 Ensaio de digestibilidade aparente

Após o período de adaptação à dieta, os animais foram alocados em gaiolas de estudo de metabolismo equipadas com coletores e separadores de fezes e urina, bem como cochos e bebedouros. Os animais permaneceram durante 8 dias nas gaiolas metabólicas sendo os dois primeiros dias para adaptação às gaiolas e seis dias para coleta dos dados.

Durante a pesagem das dietas, amostras de feno e concentrado foram colhidas separadamente para formação de uma amostra composta por animal para posterior determinação da composição química do ofertado (Tabela 5.4). As sobras de ração e as fezes excretadas foram coletadas diariamente antes da primeira refeição matinal e pesadas. Uma amostra representativa de 10% de cada material foi colhida e usada para formação de uma amostra composta por animal, a qual foi armazenada em *freezer*. A urina foi coletada diariamente em bandejas de polietileno e recolhidas em solução acidificada com ácido sulfúrico a 10% (H₂SO₄, 10 N). O volume total da urina foi mensurado e uma alíquota de 10% foi amostrada e armazenada individualmente em *freezer* para posterior análise.

As amostras de sobras e fezes foram descongeladas a temperatura ambiente e pré-secas em estufa de circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas. As amostras de sobras e fezes pré-secas, assim como as amostras de alimentos utilizados na composição da dieta e da dieta oferecida passaram por processo de moagem em moinho tipo Willey com peneira de 1 mm. Foram realizadas análises químicas dos alimentos, da dieta, das sobras e das fezes. A determinação da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO) e extrato etéreo (EE) foi realizada segundo a metodologia da AOAC (2011). A fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina foram determinados pelo método sequencial utilizando sacos de filtro (ANKOM #57) em um analisador de fibra (Tecnal, São Paulo, Brasil) de acordo com (VAN SOEST et al., 1991).

O coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta foi determinado segundo McDonald et al. (2011):

$$\text{Digestibilidade aparente de X (\%)} = \frac{(X_{\text{consumido}} - X_{\text{excretado}})}{X_{\text{consumido}}} * 100$$

onde X = nutriente avaliado.

5.2.2 Estimativa da síntese de proteína microbiana por derivados de purina

A síntese de proteína microbiana foi estimada a partir da concentração dos derivados de purina (DP) na urina, baseado na metodologia de Makkar e Chen (2004). A extração dos DP foi realizada conforme descrito por Abdalla Filho (2015). A quantificação foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo da marca Agilent modelo 1100 equipado com um detector de arranjo de fotodiodos e coluna Zorbax C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm. A eluição foi realizada por gradiente, utilizando como fase móvel uma solução de fosfato monobásico de amônio 0,0025 M (fase móvel A) e uma solução de fosfato monobásico de amônio 0,0025 M:metanol, 95:5, v:v (fase móvel B), com vazão de 1,0 a 1,2 mL min.⁻¹ e temperatura constante da coluna de 23°C.

O padrão interno utilizado foi uma solução contendo alantoína, creatinina, ácido úrico, hipoxantina, xantina e oxipurinol, com concentrações de 500 a 1500 µM, e o nitrogênio microbiano (NM) absorvido no intestino delgado foi estimado de acordo com Makkar e Chen (2004) pela equação:

$$NM = \frac{(MDP * Teor\ de\ N_{purinas})}{(N_{purinas}:N_{microbiano} * Digestibilidade\ das\ purinas\ microbianas * 1000)}$$

Onde, NM = nitrogênio microbiano absorvido no intestino delgado (g N d⁻¹), MDP = metabólitos derivados de purina absorvidos (mmol d⁻¹ kg^{0,75}⁻¹).

Para o cálculo da NM, considerou-se o teor de N_{purinas} = 70 mg N mmol⁻¹, a proporção N_{purinas}:N_{microbiano} = 0,116 e a digestibilidade das purinas microbianas igual a 0,83. O valor dos metabólitos derivados de purina (MDP) foi calculado como:

$$MDP = \frac{(\text{Área do metabólito} * \text{Concentração de oxipurinol no padrão} * FD)}{[(FC * \text{Área do oxipurinol no padrão}) * \text{volume de urina (mL)}]}$$

Onde, MDP = metabólitos derivados de purina (µM L⁻¹); FD = fator de diluição = 2,5 e FC = fator de correção dos metabólitos de purina:

$$FC = \frac{(\text{Área do metabólito no padrão} * \text{Concentração de oxipurinol no padrão})}{\text{Concentração do metabólito no padrão} * \text{Área do oxipurinol no padrão}}$$

5.2.3 Balanço de nitrogênio

Para o cálculo do balanço de nitrogênio, o teor de nitrogênio total (N_{total}) das amostras de alimento oferecido e das fezes e urina foi determinado pelo método micro-Kjeldahl (AOAC, 2011). O balanço dos compostos nitrogenados (N_{retido}) foi calculado como:

$$N_{\text{retido}} (\text{g dia}^{-1}) = N_{\text{ingerido}} - N_{\text{fezes}} - N_{\text{urina}}$$

$$\text{Retenção de N (\% } N_{\text{consumido}}) = (N_{\text{retido}}/N_{\text{consumido}})$$

em que, N_{retido} = nitrogênio absorvido pelo animal; N_{ingerido} = nitrogênio ingerido pelo animal; N_{fezes} = nitrogênio excretado nas fezes; N_{urina} = nitrogênio excretado na urina.

5.2.4 Emissão de metano entérico

A determinação da emissão de metano (CH_4) foi realizada após o término do ensaio de digestibilidade aparente, com os animais alojados em baias individuais e com cinco dias de coleta de dados. Foi utilizada a técnica do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF_6) descrita por Johnson et al. (1994) com adaptações de Primavesi et al. (2004b) e Lima et al. (2010).

A determinação das concentrações de CH_4 e SF_6 foi realizada em cromatógrafo a gás Shimadzu CG 2010, equipado com detectores de ionização de chama (FDI) e de captura de elétrons (ECD), respectivamente. Foi utilizada coluna megabore 0,53 mm, 30 m, 25,0 μm e padrões de 20 ppm para o CH_4 e de 50, 100 e 100 ppt para o SF_6 . Para a estimativa da emissão de CH_4 em g dia^{-1} e CH_4 por kg de MO degradada consumida (MODC), foram considerados o consumo de MS durante o período de avaliação de CH_4 .

5.2.5 Parâmetros ruminais

A coleta de líquido ruminal foi realizada após o término do ensaio de mensuração de metano. O líquido ruminal foi colhido via sonda esofágica, quatro horas após a alimentação dos animais e utilizado para a determinação do pH ruminal, concentração dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal (N-NH₃), quantificação da microbiota ruminal e contagem de protozoários. Para isso, o líquido ruminal colhido foi dividido em quatro frascos, um para cada amostra. A determinação do pH ruminal foi realizada logo após a coleta do líquido ruminal e mensurado com auxílio de peagâmetro digital. As amostras destinadas para as análises de N-NH₃ e AGCC foram armazenadas a -20°C e as amostras para PCR a -80°C, para posterior análise. Para a contagem de protozoários, 2 mL do líquido ruminal foi misturado à 4 mL de solução salina Methylgreen formalina e armazenado a temperatura ambiente (DEHORITY; DAMRON; MCLAREN, 1983).

O N-NH₃ foi determinado pelo método micro-Kjeldahl de acordo com Preston (1995) por destilação a vapor com solução de tetraborato de sódio (5%), coletado em solução de ácido bórico e determinado por titulação com ácido sulfúrico (0,01 N). Os AGCC foram separados e determinados por cromatografia gasosa, segundo Palmquist e Conrad (1971) e Nocek, Hart e Polan (1987), com modificações. O líquido ruminal foi centrifugado (11000 rpm por 30 minutos e a 4°C) e 800 µL do sobrenadante foram coletados e adicionados 100 µL de ácido 2-etil-butírico (padrão interno, Chem Service) e 200 µL de ácido fórmico PA. A curva padrão foi preparada de maneira semelhante, utilizando concentrações conhecidas de cada AGCC. A quantificação foi realizada em cromatógrafo a gás Shimadzu 2014 acoplado em um detector de ionização de chama (FID), com coluna GP 10% SP-1200/1 H₃PO₄ 80/100 Chromosorb WAW e temperatura de aquecimento de forno de 115°C durante 3,20 minutos, 123°C por 1,25 minutos e 126°C por 5 minutos, totalizando 10,55 minutos de análise.

A quantificação da microbiota ruminal foi realizada no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, pertencente ao CENA/USP. A extração do DNA total das amostras foi realizada utilizando kit comercial PowerLyzerTM Power Soil (MoBio) de acordo com as instruções do fabricante. A técnica molecular de PCR quantitativo em tempo real q(PCR) foi aplicada para quantificar os microrganismos *Selenomonas ruminatum*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*, bactérias totais e fungos anaeróbicos por meio de *primers* específicos de 16S rDNA, conforme descrito por Denman e Mcsweeney (2006); Denman, Tomkins e Mcsweeney (2007). A abundância relativa das populações microbianas

foram determinadas baseadas no cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando o gene 16S rRNA BACT como gene de referência para o cálculo dos valores de ΔCt :

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{gene alvo})} - Ct_{(\text{normalizador})}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{tratamento})} - \Delta Ct_{(\text{controle})}$$

A estimativa do número de cópias dos genes relacionados à atividade metanogênica, foi realizada com *primer* funcional *mcrA* (gene methyl coenzyme M reductase A) (Quadro 1). A curva padrão foi obtida, realizando ampliações com o número de cópias do DNA padrão diluído em série (1:10) nos intervalos de 10^7 a 10^3 genes/ μL . O DNA padrão foi obtido a partir da amplificação do DNA do rúmen purificado utilizando o *primer mcrA*. O número de cópias do gene foi calculado por mL de conteúdo ruminal.

Quadro 1 – *Primers* específicos utilizados na análise de qPCR

Microrganismo	Sequência dos <i>primers</i> (5' a 3') ¹
Bactérias totais	I ¹ , CGGCAACGAGCGCAACCC R, CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	I, CGAACGGAGTAATTTGAGTTTACTTAGG R, CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	I, GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA R, CGCCTGCCCTGAACTATC
<i>Selenomonas ruminatium</i>	I, TGC GAA TAG TTT TTM GCA A R, CTC AAT GTC AAG CCC TGG
Arqueas metanogênicas*	I, ITCGGTGGATCDCARAGRGRGC R, GBARGTCGWAQCCGTAGAATCC
Fungos totais	I, GAGGAAGTAAAAGTCGCGTAACAAGGTTTC R, CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT

¹I - indicador direto; R – reverso.

*Primer: foi utilizado o *primer* funcional *mcrA*.

A amplificação do DNA foi realizada em triplicata no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Life Technologies), em solução contendo 5 μL do kit SYBR Green ROX (Invitrogen), 1 μL de cada *primer* (2 pmol), 1 μL de DNA extraído e 2 μL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para o volume final de 10 μL .

A contagem de protozoários foi realizada com auxílio de um microscópio com objetiva 45/66 e utilizando uma câmara de Neubauer brigthi-line-L. Opitick (quadriculado de 0,0025 mm² e profundidade de 0,100 mm) de acordo com a metodologia proposta por Dehority, Damron e McLaren (1983).

5.2.6 Parâmetros sanguíneos

A coleta de sangue foi realizada via punção da veia jugular, no último dia de experimento e quatro horas após a alimentação da manhã utilizando tubos a vácuo, com e sem anticoagulante (ácido etilenodiamina tetra-ácido – EDTA). Após a coleta as amostras de sangue foram centrifugadas durante 10 minutos a 1310 g e 4°C para separação do soro e plasma. Os níveis séricos de creatinina, uréia, transaminase glutâmico-oxalácetico (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP) foram determinados com kits comerciais específicos (Labtest®), com auxílio de procedimentos colorimétricos, seguindo as instruções de uso recomendadas pelo fornecedor.

5.2.7 Quantificação de ricina

A quantificação da ricina foi realizada nas tortas de mamona destoxificada. Para isso, 2 g de amostra foram pesados em erlenmeyer de 50 mL e adicionados 40 mL de solução tampão Tris-HCl com pH = 8,0 (90%, INLAB). A solução foi agitada com auxílio de uma mesa agitadora durante 3 horas e posteriormente filtrada em papel filtro. Foi coletado 1 mL do extrato, filtrado em membrana (PTFF) de 0,45 µm e transferido para *vial* de 1,5 mL. A concentração de ricina foi determinada por cromatografia líquida utilizando um cromatógrafo da marca Agilent modelo 1100, equipado com bomba quaternária, injetor automático de amostras, detector de arranjo de fotodiodos, termostato para coluna e coluna Zorbax C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm. A eluição foi realizada em gradiente, usando como fase móvel metanol (70%) e água 0,1% de ácido trifluoracético (Vetec) (30%), com vazão de 0,5 mL min⁻¹ e temperatura constante de coluna a 30°C. A quantificação da ricina foi realizada por curva padrão construída a partir de padrão analítico de ricina de cadeia A (Sigma Aldrich, L9514). Foram injetados 10 µL de extrato por amostra e a ricina quantificada no comprimento de onda de 214 nm (ROMERO, 2013).

5.2.8 Análise estatística

A análise estatística dos dados coletados foi realizada utilizando o pacote estatístico SAS v. 9.4. (SAS Institute Inc., Cary NC, EUA). Todas as variáveis estudadas foram

submetidas a análise de variância utilizando o teste F e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.3 Resultados e Discussão

O processo de destoxificação com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ utilizado na TM destoxificada não foi capaz de degradar/inativar por completo a ricina, estando essa presente na concentração de $0,303 \text{ mg g}^{-1}$ de TM. O consumo médio de ricina para os ovinos que receberam a dieta com a TM destoxificada foi de $0,59 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PC dia}^{-1}$.

Na literatura, a dose letal relatada para animais e humanos difere consideravelmente (ASLANI et al., 2007). Considerando que concentrações de $2,42 \text{ mg}$ de ricina kg^{-1} de PC dia^{-1} não foram tóxicas para ovinos em estudo realizado por Oliveira et al. (2010a), esperou-se que a dose de ricina utilizada nesse estudo não seria prejudicial aos animais, o que foi confirmado pela ausência de sintomas clínicos de intoxicação nos animais e pelos níveis séricos de creatinina, ureia, TGO e TGP (Tabela 5.3) que não diferiram ($P > 0,05$) do tratamento controle e encontraram-se dentro dos valores considerados normais por Kaneko, Harvey e Bruss (2008), com exceção da uréia que apresentou valores acima, evidenciando que os animais permaneceram com boa saúde durante o período experimental.

Tabela 5.3 – Parâmetros sanguíneos de ovinos alimentados com torta de mamona em substituição parcial ao farelo de soja

Variáveis	Diets experimentais ¹		Ref. ²	EPM ³	Valor-P
	Controle	TMD			
Creatinina, mg dL^{-1}	1,19 ^a	1,18 ^a	1,2 – 1,9	0,06	0,7710
TGO, U L^{-1}	91,07 ^a	96,33 ^a	60 - 280	7,71	0,5937
TGP, U L^{-1}	21,96 ^a	24,30 ^a	0 - 30	1,98	0,4179
Ureia (mg dL^{-1})	36,63 ^a	40,96 ^a	8 - 20	1,99	0,3047

¹TMD = dieta contendo torta de mamona destoxificada substituindo o farelo de soja em 50%.

²Ref. Valores de referência segundo Kaneko, Harvey e Bruss, (2008).

³EPM = erro padrão da média.

Letras diferentes nas linhas apresentam significância a 5% pelo teste de Tukey para os tratamentos.

A concentração de ureia sérica acima do valor de referência pode ser um indicativo de comprometimento renal, entretanto, em animais ruminantes a concentração de ureia sanguínea está relacionada diretamente com o aporte de proteína dietética e com a relação energia:proteína da dieta. Dessa maneira, dietas com elevados teores de proteína ou deficientes em energia, proporcionam aumento na concentração de ureia no plasma sanguíneo (WITTEWER et al., 1993; BRAUN; LEFEBVRE, 2008). Nesse estudo, a concentração de ureia sérica acima do valor referência, em ambos os tratamentos, pode ser atribuído ao

elevado aporte de proteína da dieta, uma vez que a concentração de N-NH₃ do rúmen foi superior ao valor considerado mínimo para adequada fermentação microbiana no rúmen (Tabela 5.8). Além disso, a concentração de creatinina sérica, que é considerado um indicador de lesão renal (BRAUN; LEFEBVRE, 2008), manteve-se dentro do normal para a espécie.

A composição bromatológica das dietas experimentais está apresentada na Tabela 5.4. A principal diferença observada entre a composição do concentrado contendo TM destoxificada e o concentrado controle foi em relação ao aumento na concentração de EE, FDA e lignina, sendo esses superiores para o tratamento com TMD destoxificada. Esses resultados já eram esperados, uma vez que a torta de mamona apresentou concentrações superiores de EE, FDN, FDA e lignina em comparação ao farelo de soja (Tabela 5.1). A elevada concentração de fibras na torta de mamona foi em decorrência da presença de cascas durante a prensagem das sementes e a elevada concentração de EE foi devido ao processo de extração de óleo por prensa mecânica utilizado para obtenção da torta ser menos eficiente comparado ao processo químico utilizado para obtenção do farelo de soja, resultante em maiores concentrações de óleo residual na torta.

Tabela 5.4 – Composição bromatológica das dietas experimentais

Variáveis	Ingrediente das dietas experimentais			EPM ³	Valor-P
	Feno	Concentrado controle	Concentrado TMD ¹		
Matéria seca ²	903	906 ^a	903 ^a	1,30	0,3226
		<i>g kg⁻¹ de MS</i>			
Matéria orgânica	935	937 ^a	925 ^a	3,24	0,0799
Proteína bruta	70	200 ^a	194 ^a	2,88	0,3586
Extrato etéreo	21	44 ^b	57 ^a	2,47	0,0017
Fibra em detergente neutro	802	446 ^a	441 ^a	17,02	0,8941
Fibra em detergente ácido	439	84 ^a	116 ^a	7,98	0,0378
Lignina	81	31 ^a	56 ^a	5,99	0,0299

¹TMD = dieta contendo torta de mamona destoxificada substituindo o farelo de soja em 50%.

²Matéria seca em g kg⁻¹ matéria original.

³EPM = erro padrão da média.

Médias do concentrado controle e TMD testadas pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

Os consumos de MS, MO, PB, FDN e FDA não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 5.5). Silva et al. (2011) trabalhando com ovinos alimentados com até 100% de inclusão da TM destoxificada em substituição ao farelo de soja também não encontraram diferenças no consumo dessas frações. Oliveira et al. (2010a) também não encontraram alterações no consumo de MS e MO de ovinos alimentados com dietas contendo

TM destoxificada substituição ao farelo de soja em 100%. Os resultados deste estudo sugerem que a TM destoxificada apresenta uma boa aceitabilidade pelos animais.

O consumo de EE foi influenciado ($P < 0,0278$) pela inclusão da torta de mamona e pode ser atribuído pela maior concentração dessa fração na torta em relação ao farelo de soja (57,3 vs 44,6 g kg⁻¹ de MS, respectivamente). Embora a inclusão da torta de mamona tenha elevado o consumo de EE da dieta, esse se manteve abaixo do limite de inclusão de 6% da MS ingerida, o qual é associado a diminuição da digestão da fibra pelos microrganismos ruminais fibrolíticos (MEDEIROS et al., 2015; VAN SOEST, 1994).

Tabela 5.5 – Consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes em dietas de ovinos alimentados com TM destoxificada em substituição parcial ao farelo de soja

Variáveis	Tratamentos		EPM ²	Valor-P
	Controle	TDM ¹		
<i>Consumo, kg dia⁻¹</i>				
Matéria seca	1,362 ^a	1,298 ^a	0,07	0,5607
Matéria orgânica	1,275 ^a	1,206 ^a	0,07	0,5070
Proteína bruta	0,186 ^a	0,175 ^a	0,009	0,3519
Extrato etéreo	0,042 ^b	0,054 ^a	0,003	0,0278
Fibra em detergente neutro	0,850 ^a	0,806 ^a	0,06	0,6138
Fibra em detergente ácido	0,358 ^a	0,350 ^a	0,23	0,8086
<i>Digestibilidade aparente (%)</i>				
Matéria seca	57,58 ^a	50,76 ^b	0,02	0,0411
Matéria orgânica	60,78 ^a	55,02 ^b	0,01	0,0473
Proteína bruta	65,60 ^a	62,66 ^a	0,02	0,3933
Extrato etéreo	59,84 ^a	74,50 ^a	0,04	0,0559
Fibra em detergente neutro	43,40 ^a	27,28 ^b	0,04	0,0194
Fibra em detergente ácido	11,8 ^a	14,7 ^a	0,07	0,0636

¹TMD = dieta contendo torta de mamona destoxificada substituindo o farelo de soja em 50%.

²EPM = erro padrão da média.

Letras diferentes nas linhas apresentam significância a 5% pelo teste de Tukey para os tratamentos.

A digestibilidade aparente da PB, EE e FDA não foram diferentes ($P > 0,05$) entre os tratamentos, entretanto houve redução ($P < 0,05$) na digestibilidade da MS, MO e FDN. Esses resultados indicam que, apesar do consumo de MS, MO e FDN não ter diferido estatisticamente pela inclusão da TM destoxificada, o aproveitamento da dieta foi reduzido, sugerindo que animais alimentados com a TM destoxificada podem ter seu desempenho

produtivo comprometido. Resultado semelhante foi encontrado por Cobianchi et al. (2012) ao substituir o farelo de soja pela TM destoxificada em diferentes proporções (33, 67 e 100%) em dietas de vacas leiteiras. Os autores relataram redução na digestibilidade da MS, MO, PB, FDN e carboidratos não fibrosa (CNF) com a substituição a partir de 33%, entretanto, não verificaram redução no consumo dessas frações e associaram a redução da digestibilidade do FDN ao aumento do teor de lignina e cutina.

A menor digestibilidade do FDN da dieta com torta de mamona pode ser atribuída a presença de cascas nas sementes durante o processo de prensagem. As cascas possuem em sua composição cutina, que é uma fração da lignina, a qual durante a degradação ruminal forma uma barreira ao ataque dos microrganismos no material fibroso, reduzindo a extensão da degradação do FDN (VAN SOEST, 1994). A presença de cutina na TM e TM destoxificada foi verificada por Furtado et al. (2012) e Oliveira et al. (2010a), que encontraram valores de 25,7% na torta de mamona e 30,9 a 42,7% em dietas formuladas para ovinos com 150 g de torta ou farelo de mamona kg^{-1} de MS.

Embora o tratamento alcalino (Ca(OH)_2) utilizado na destoxificação da TM apresente potencial para aumentar a solubilidade da lignina, nesse estudo não foi verificado esse efeito. Oliveira et al. (2010a), explicaram que a eficácia do tratamento alcalino depende de ligações tipo ésteres entre a lignina e os hidratos de carbono, que não são numerosas em plantas dicotiledôneas como a mamona.

Os resultados de derivados de purina (DP) na urina e nitrogênio microbiano (NM) retido e absorvido não diferiram ($P > 0,05$) entre os tratamentos estudados (Tabela 5.6). Os resultados de NM indicam que o nível de substituição do farelo de soja pela torta de mamona utilizado no presente estudo não alterou o crescimento dos microrganismos e o aporte de proteína microbiana, sugerindo que a torta de mamona foi uma boa fonte de proteína e que a ricina presente na torta não proporcionou efeito sobre a microbiota ruminal. Oliveira et al. (2010a), observaram que a TM em substituição ao farelo de soja (100%) aumentou a eficiência da microbiota ruminal na utilização de substratos dietéticos nitrogenados. Resultados semelhantes também foram observados por Chagas (2016), quando a TM destoxificada foi incluída na dieta de ovinos substituindo 50% do farelo de soja.

Tabela 5.6 – Excreções diárias de derivados de purina (DP) na urina e estimativa de absorção de nitrogênio microbiano (NM) por ovinos alimentados com TM destoxificada em substituição parcial ao farelo de soja

Variáveis ¹	Tratamentos		EPM ³	Valor-P
	Controle	TMD ²		
DP (mmol d ⁻¹)	23,42 ^a	18,97 ^a	1,88	0,1331
DP (μmol d ⁻¹ kg ^{-0,75})	1406,9 ^a	1137,6 ^a	146,8	0,2310
NM fornecido (g N d ⁻¹)	3,57 ^a	3,52 ^a	0,04	0,3826
NM absorvido (g N d ⁻¹)	4,91 ^a	4,84 ^a	0,05	0,3845

¹DP = derivados de purina; NM = nitrogênio microbiano.

²TMD = dieta contendo torta de mamona destoxificada substituindo o farelo de soja em 50%.

³EPM = erro padrão da média.

Letras diferentes nas linhas apresentam significância a 5% pelo teste de Tukey para os tratamentos.

O consumo de N assim como as perdas de nitrogênio pelas vias urinárias e fecal não foram influenciados ($P > 0,05$) pela adição da torta de mamona à dieta (Tabela 5.7). O nitrogênio retido e o balanço de nitrogênio também não diferiram ($P > 0,05$) entre os tratamentos. O elevado valor de nitrogênio retido e balanço positivo de nitrogênio estão em conformidade com baixos valores de nitrogênio urinário, já que quanto maior as perdas de nitrogênio via urina, menor a concentração de nitrogênio retido e, conseqüentemente, menor o balanço de nitrogênio. A concentração de nitrogênio retido foi em média 63,57% do nitrogênio ingerido. O balanço de nitrogênio positivo em ambos tratamentos indica mais uma vez que a TM destoxificada foi satisfatória para atender as exigências de compostos nitrogenados pelos animais. Segundo Van Soest (1994), o fornecimento de nitrogênio em quantidades suficientes para atender as exigências do animal evita a mobilização de nitrogênio de reserva do animal, limita a excreção de nitrogênio urinário e possibilita um maior aproveitamento do nitrogênio da dieta (SILVEIRA, 2013).

Resultados semelhantes aos obtidos nesse estudo foram reportados por Silva et al. (2010), quando utilizaram diferentes teores de TM destoxificada na dieta de ovinos (0, 33, 67 e 100%) e observaram valores de 26,15 a 29,17 g dia⁻¹ de N ingerido, 8,40 a 9,47 g dia⁻¹ de N fecal, 1,49 a 2,71 g dia⁻¹ de N urinário, 13,63 a 17,81 g dia⁻¹ de N retido e balanço de nitrogênio positivo em todas as dietas. Chagas (2016) também observou o mesmo comportamento para consumo de nitrogênio, nitrogênio fecal, nitrogênio urinário, nitrogênio retido e balanço de nitrogênio utilizando torta de mamona destoxificada com Ca(OH)₂ em substituição ao farelo de soja (50%) na dieta de ovinos.

Tabela 5.7 - Balanço de nitrogênio de ovinos alimentados com TM destoxificada em substituição parcial ao farelo de soja

Variáveis	Tratamentos		EPM ²	Valor-P
	Controle	TMD ¹		
N _{consumido} , g dia ⁻¹	29,78 ^a	27,76 ^a	1,45	0,3523
N _{excretado} , g dia ⁻¹	10,82 ^a	10,04 ^a	0,80	0,5109
N _{fecal} , g dia ⁻¹	7,65 ^a	7,54 ^a	0,64	0,9020
N _{urinário} , g dia ⁻¹	3,16 ^a	2,50 ^a	0,67	0,5080
N _{retido} , g dia ⁻¹	18,96 ^a	17,71 ^a	1,39	0,5435
N _{retido} /N _{consumido} , g dia ⁻¹	0,64 ^a	0,63 ^a	0,03	0,9586

¹TMD = dieta contendo torta de mamona destoxificada substituindo o farelo de soja em 50%.

²EPM = erro padrão da média.

Letras diferentes nas linhas apresentam significância a 5% pelo teste de Tukey para os tratamentos.

A inclusão da TM destoxificada em substituição ao farelo de soja não teve efeito ($P > 0,05$) sobre os parâmetros de fermentação ruminal em comparação a tratamento controle (Tabela 5.8). Os valores de pH ruminal encontraram-se dentro dos valores de normalidade de 5,5 a 7 considerado normal para atividade dos microrganismos (FEITOSA, 2008). As concentrações de N-NH₃ foram superiores a considerada mínima necessária para proporcionar máxima atividade fermentativa e o desaparecimento máximo da matéria seca relatadas por Mehrez, Orskov e McDonal (1977) de 23,5 mg dL⁻¹ de N-NH₃. Assim, a disponibilidade de N-NH₃ encontrado nesse estudo não limitou o crescimento microbiano, como observado na Tabela 5.6.

Tabela 5.8 – Parâmetros de fermentação ruminal de ovinos alimentados com TM destoxificada em substituição parcial ao farelo de soja

Variáveis	Tratamentos		EPM ²	Valor-P
	Controle	TMD ¹		
pH ruminal	6,37 ^a	6,38 ^a	0,1	0,9795
N-NH ₃ , mg dL ⁻¹	25,16 ^a	24,31 ^a	1,63	0,7213
Total AGCC, mmol L ⁻¹	82,30 ^a	79,79 ^a	2,63	0,5184
Proporção do total de AGCC (%)				
Acetato	66,52 ^b	68,73 ^a	0,65	0,0417
Propionato	17,10 ^a	15,85 ^a	0,74	0,2692
Butirato	12,57 ^a	11,65 ^a	0,52	0,2443
Isobutirato	0,84 ^a	0,90 ^a	0,07	0,5609
Valerato	1,13 ^a	1,07 ^a	0,04	0,3600
Isovalérico	1,82 ^a	1,77 ^a	0,15	0,8187
C2:C3 ³	3,95 ^a	4,35 ^a	0,18	0,1576

¹TMD = dieta contendo torta de mamona destoxificada substituindo o farelo de soja em 50%.

²EPM = erro padrão da média. ³C2:C3 = relação acetato propionato.

Letras diferentes nas linhas apresentam significância a 5% pelo teste de Tukey para os tratamentos.

A quantidade de AGCC no líquido ruminal é reflexo da atividade microbiana e da taxa de absorção pela parede ruminal (VAN SOEST, 1994; TAJIMA et al., 2001). A proporção de AGCC pode variar com a composição e tamanho de partícula do alimento, consumo e frequência de alimentação. No presente estudo, a concentração total de AGCC não foi alterada pela inclusão da torta de mamona em substituição ao farelo de soja. De acordo com Van Houtert (1993), a produção de AGCC é influenciada quando há redução na degradabilidade dos nutrientes, a qual não foi observada quando avaliada *in vitro* (Capítulo 3), corroborando os resultados encontrados.

Entretanto, houve aumento ($P= 0,0417$) na produção de acetato para a dieta com TM destoxificada em comparação a dieta contendo farelo de soja, provavelmente decorrente da elevação da concentração de FDA e lignina provenientes da torta de mamona. Segundo Van Houtert (1993), animais alimentados com dietas ricas em fibras tendem a maior formação de acetato. Em relação as concentrações de propionato e butirato, assim como para os isoácidos, não foram encontradas diferença ($P> 0,05$) entre os tratamentos. A concentração de isoácidos semelhantes entre os tratamentos sugere que a torta de mamona possui um bom perfil aminoácidos. Apesar de ter havido aumento na concentração de acetato nas dietas com TM destoxificada, essa não foi suficiente para alterar ($P= 0,1576$) a relação C2:C3.

No presente estudo, não foi observado alterações ($P> 0,05$) nas populações dos microrganismos ruminais avaliados na dieta com inclusão da torta de mamona em substituição ao farelo de soja, demonstrando mais uma vez, que a quantidade de ricina presente na dieta com torta não foi suficiente para causar efeito sobre a microbiota ruminal. (Tabela 5.9).

Segundo Oliveira et al. (2010b) os animais ruminantes possuem uma certa tolerância a ricina, a qual está associada à capacidade dos microrganismos em degradá-la, entretanto, essa tolerância é dependente da concentração inicial de ricina. Portanto, a similaridade nos resultados obtidos entre o tratamento controle e TM pode ser atribuída à proximidade na composição nutricional das dietas experimentais (Tabela 5.4), uma vez que essa é considerada o fator mais influente sobre o número e a proporção relativa das diferentes espécies de microrganismos ruminais (VALADARES; FILHO; PINA, 2011).

No entanto, a TM destoxificada apresentou concentração de FDA superior quando comparada ao farelo de soja e, conseqüentemente, refletiu no aumento dessa fração na dieta que continha a torta. Concomitantemente, houve aumento ($P= 0,0417$) na concentração de acetato da dieta com torta de mamona em comparação a dieta com farelo de soja, cominado pelo aumento na concentração de FDA. Contudo, não foi observado diferença ($P= 0,5811$) na

abundancia relativa da bactéria *R. flavefaciens* entre as dietas experimentais, embora em número absoluto tenha aumento. Provavelmente, as concentrações de fibras em ambas as dietas foram suficientes para possibilitar o crescimento dessas bactérias, além da concentração de isoácidos semelhantes (Tabela 5.8), os quais são necessárias para o crescimento dessas bactérias (ANDRIES et al., 1987).

Tabela 5.9 - Efeito da substituição parcial do farelo de soja pela TM destoxificada na alimentação de ovinos sobre a expressão relativa da população bacteriana, *Archaea* metanogênicas e número de protozoários

Variáveis	Tratamentos		EPM ²	Valor-P
	Controle	TMD ¹		
	<i>% relativa do total de bactérias</i>			
<i>Fungos totais</i>	0,25 ^a	0,24 ^a	0,05	0,8153
<i>Selenomonas ruminatum</i>	0,002 ^a	0,002 ^a	0,002	1,0000
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	0,07 ^a	0,09 ^a	0,02	0,5811
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	2,06 ^a	2,33 ^a	0,28	0,5024
	<i>Nº cópias de genes mL⁻¹</i>			
<i>Archaea</i> metanogênicas	1226,17 ^a	1954,75 ^a	495,78	0,3291
Nº protozoários, x10 ⁵ mL ⁻¹	4,6 ^a	4,1 ^a	59543,57	52,84

¹TMD = dieta contendo torta de mamona destoxificada substituindo o farelo de soja em 50%.

²EPM = erro padrão da média.

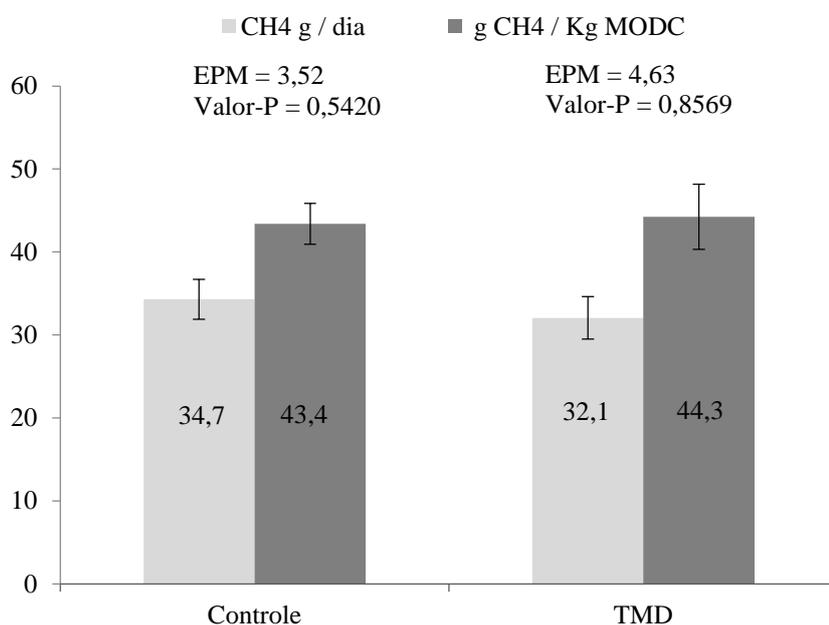
Letras diferentes nas linhas apresentam significância a 5% pelo teste de Tukey para os tratamentos.

A emissão de CH₄ entérico não diferiu (P > 0,05) entre as dietas avaliadas (Figura 5.1). Esse fato pode estar relacionado ao consumo de MO não ter sido alterado, uma vez que a produção e a emissão diária de CH₄ é influenciada pela quantidade da dieta consumida (BENCHAAR et al, 1998). Além disso, a expressão relativa das bactérias e fungos, assim como a quantidade absoluta de bactérias metanogênicas e o número de protozoários não foram alteradas (P > 0,05) pela dieta contendo TM destoxificada em relação a dieta controle (Tabela 5.9).

A digestibilidade da MO e do FDN foi reduzida nas dietas contendo TM destoxificada em relação a dieta controle, indicando uma maior concentração de fibras na dieta, o que favoreceu a produção de acetato (Tabela 5.8), e está relacionada a maior produção de CH₄ em decorrência da maior produção de hidrogênio, utilizado pelas bactérias metanogênicas para obtenção de energia e formando CH₄ (JOHNSON; JOHNSON, 1995).

Embora a dieta contendo torta de mamona não tenha proporcionado diferença na emissão de CH₄ entérico, a redução na digestibilidade dos nutrientes (MS, MO e FDN) sugere que a produção de metano por kg de produto animal produzido tende a ser maior. Segundo Primavesi et al. (2004a), alimentos de elevada digestibilidade produzem menor emissão de CH₄ por unidade de produto comparado a dietas com maior concentração de fibras.

Figura 5.1 – Emissão de metano entérico de ovinos alimentados com TM destoxificada em substituição parcial ao farelo de soja.



5.4 Conclusão

A inclusão da torta de mamona destoxificada em substituição ao farelo de soja em dietas de ovinos não alterou o consumo, a síntese de compostos nitrogenados microbianos, o balanço de nitrogênio, a microbiota ruminal e a emissão de metano entérico. No entanto, apresentou redução na digestibilidade aparente da MS, MO e FDN, o que pode refletir no comprometimento do desempenho e no aumento da emissão de metano por kg de produto animal, indicando a necessidade de mais estudos para avaliar o efeito da inclusão da torta de mamona destoxificada, assim como da presença de ricina. São necessários também, mais estudos visando o desenvolvimento de métodos de destoxificação capazes de degradar/inativar totalmente a ricina da torta de mamona.

Salienta-se que o uso da torta de mamona destoxificada como alimento alternativo para ruminantes é uma alternativa promissora, uma vez que a mesma é imprópria ao consumo humano e seu uso pode contribuir na valorização desse subproduto e na redução dos custos de alimentação.

Referências

ABDALLA, A. L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. esp., p. 260–268, 2008.

ABDALLA FILHO, A. L. **Produção de gases, síntese microbiana pelo radiofósforo e digestibilidade do babaçu e mofumbo em dietas de ovinos**. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

ANANDAN, S. et al. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 120, n. 1–2, p. 159–168, 2005.

ANDRADE, I. R. A. de. **Destoxificação da torta de mamona por produtos químicos alternativos**. 2015. 90 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

ANDRIES, J. I. et al. Isoacids in ruminant nutrition: their role in ruminal and intermediary metabolism and possible influences on performances - A review I. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 18, p. 169–180, 1987.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 18. ed. Arlington: AOAC International, 2011.

ASLANI, M. R. et al. Castor bean (*Ricinus communis*) toxicosis in a sheep flock. **Toxicon**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 400–406, 2007.

BENCHAAR, C. et al. Prediction of methane production from dairy cows using existing mechanistic models and regression equations. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 2, p. 617-627, 1998.

BRAUN, J. P.; LEFEBVRE, H. P. Kidney function and damage. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animal**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. cap. 5, p. 485-528.

CHAGAS, D. M. T. **Subprodutos do biodiesel em dietas para ovinos**. 2016. 95 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2016.

COBIANCHI, J. V. et al. Productive performance and efficiency of utilization of the diet components in dairy cows fed castor meal treated with calcium oxide. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 10, p. 2238–2248, 2012.

DEHORITY, B. A.; DAMRON, W. S.; MCLAREN, J. B. Occurrence of the rumen ciliate *Oligoisotricha bubali* in domestic cattles (*Bos taurus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 45, n. 4, p. 1394–1397, 1983.

DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 572–582, 2006.

DENMAN, S. E.; TOMKINS, N. W.; MCSWEENEY, C. S. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, n. 3, p. 313–322, 2007.

EISLER, M. et al. Steps to sustainable livestock. **Nature**, London, v. 507, n. 7490, p. 32–34, 2014.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on ricin (from *Ricinus communis*) as undesirable substances in animal feed: (Question N° EFSA-Q-2003-062). **The EFSA Journal**, Parma, v. 726, p. 1–38, 2008.

FEITOSA, F. L. F. Semiologia do sistema digestório de ruminantes. In: FEITOSA, F. L. F. (Ed.). **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. 2. ed. São Paulo, 2008. cap. 5, p. 108–138.

FURTADO, R. N. et al. Valor nutritivo de dietas contendo torta de mamona submetida a métodos alternativos de destoxificação para ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 1, p. 155–162, 2012.

FURTADO, R. N. et al. Balanço de nitrogênio e avaliação ruminal em ovinos machos e fêmeas alimentados com rações contendo torta de mamona sob diferentes tratamentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 6, p. 3237, 2014.

JOHNSON, K. et al. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. **Environmental Science & Technology**, Washington, DC, v. 28, n. 2, p. 359–362, 1994.

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 8, p. 2483–2492, 1995.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008.

LIMA, P. T. et al. Adaptations of the methane determination SF₆ tracer technique from bovine to sheep in Brazil. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS - WBC, 26., 2010, Santiago, Chile. **Proceedings...** Santiago, Chile: WBC, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, Orlando, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MAKKAR, H. P. S.; CHEN, X. B. (Ed.). **Estimation of microbial protein supply in ruminants using urinary purine derivatives**. Heidelberg: Springer, 2004.

McDONALD, P. et al. **Animal nutrition**. Harlow: Pearson, 2011. 692 p.

MEDEIROS, S. R. de et al. Lipídios na nutrição de ruminantes. In: MEDEIROS, S. R. de; GOMES, R. C.; BUNGENSTAB, D. J. **Nutrição de bovinos de corte: fundamentos e aplicações**. 1. ed. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2015. cap. 5, p. 63–76.

MEHREZ, A. Z.; ORSKOV A N, E. R.; McDONAL, I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 38, p. 437–447, 1977.

MENEZES, D. R. et al. Cinética ruminal de dietas contendo farelo de mamona destoxificado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, n. 2, p. 636–641, 2015.

NOCEK, J. E.; HART, S. P.; POLAN, C. E. Rumen ammonia concentration as influenced by storage time, freezing and thawing, acid preservative, and method of ammonia determination. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, n. 3, p. 601–607, 1987.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of small ruminant: sheep, goat, cervids, and New World camelids**. Washington, DC: National Academic Press, 2007. 292 p.

OLIVEIRA, A. S. et al. Nutrient digestibility, nitrogen metabolism and hepatic function of sheep fed diets containing solvent or expeller castorseed meal treated with calcium hydroxide. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 158, p. 15–28, 2010a.

OLIVEIRA, A. S. et al. *In vitro* ruminal degradation of ricin and its effect on microbial growth. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 157, n. 1–2, p. 41–54, 2010b.

PALMIERI, A. D. et al. Nutritional and productive performance of goats kids fed diets with detoxified castor meal. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 216, p. 81–92, 2016.

PALMQUIST, D. L.; CONRAD, H. R. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or high fat diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, n. 7, p. 1025–1033, 1971.

PRESTON, T. R. **Tropical animal feeding: a manual for research workers**. Rome: FAO, 1995. 126 p. (Animal Production and Health Paper).

PRIMAVESI, O. et al. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 3, p. 277–283, 2004a.

PRIMAVESI, O. et al. **Técnica do gás traçador SF 6 para medição de campo do metano ruminal em bovinos: adaptações para o Brasil.** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2004b.

SILVA, D. C. da et al. Metabolismo dos compostos nitrogenados em ovinos alimentados com dietas contendo farelo de mamona destoxificado. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 219–224, 2010.

SILVA, D.C. da et al. Consumo e digestibilidade de dietas contendo torta de mamona destoxificada para ovinos em terminação. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 12, n. 1, p. 96-106, 2011.

SILVA, L. M. et al. Use of castor meal (*Ricinus communis* L.) as a source of dietary protein in goats during the mating period: Impact on reproductive and metabolic responses. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 203–216, 2015.

SILVEIRA, A. M. **Efeito de ácidos orgânicos ou monensina sódica sobre a fermentação ruminal.** 2013. 55 f. (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

TAJIMA, K. et al. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, n. 6, p. 2766–2774, 2001.

VALADARES FILHO, S. de C.; PINA, D. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes.** 2. ed. Jaboticabal: Funesp, 2011. p. 161–191, 151-182.

VAN HOUTERT, M. F. J. The production and metabolism of volatile fatty acids by ruminants fed roughages: A review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 43, n. 3–4, p. 189–225, 1993.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant.** 2. ed. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1994. 476 p.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3583-3597. 1991.

WITTEWER, F. et al. Determinación de urea em muestras de leche de rebaños bovinos para el diagnóstico de desbalance nutricional. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Santiago, v. 25, n. 2, p. 165-172, 1993.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inclusão da torta de pinhão manso, destoxificada ou não, apresentou características nutricionais adequadas para serem utilizadas na alimentação animal, com ausência de efeitos deletérios nos parâmetros de fermentação ruminal *in vitro* nos níveis de adição testados nesse estudo.

Os resultados encontrados nesse estudo, mostraram que a torta de mamona destoxificada apresenta potencial para utilização na alimentação de ovinos, entretanto, ensaios de desempenho devem ser realizados visando obter informações sobre ganho de peso, qualidade de carcaça e custo de produção; além de ensaios toxicológicos para determinar os efeitos de dose e tempo de exposição dos animais à ricina.

A presença de ricina na torta de mamona não causou efeitos deletérios sobre os parâmetros de fermentação ruminal *in vivo*, nos teores utilizados nesse estudo, reforçando a hipótese de que os microrganismos ruminais são capazes de degradá-la durante o processo de fermentação ruminal, dependendo da concentração inicial de ricina. Os animais alimentados com torta de mamona não apresentaram sintomas clínicos de intoxicação por ricina e seu uso como alimento não causou problemas à saúde dos animais. A inclusão da torta na dieta não alterou o consumo, indicando que a torta foi bem aceita pelos animais e apesar de ser boa fonte de proteína, reduz a digestibilidade da matéria orgânica e da fibra em detergente neutro. A maior proporção de fibras na dieta provenientes da torta, aumentou a produção de acetato, entretanto, não foi suficiente para alterar a emissão de metano entérico no nível utilizado nesse estudo.

Para o aproveitamento da torta de mamona e de pinhão manso na alimentação animal, é necessário que métodos de destoxificação capazes de inativar completamente a ricina e extração eficiente do óleo para reduzir o teor dos ésteres de forbol, respectivamente, sejam desenvolvidos e que esses métodos tenham aplicabilidade na indústria e que sejam de baixo custo. Além disso, o desenvolvimento de métodos rápidos e de baixo custo para a extração e quantificação dos ésteres de forbol também são necessários, uma vez que o principal método usado atualmente utiliza reagentes de alto custo e demanda muito tempo. Além da quantificação, a identificação e o isolamento dos diferentes ésteres de forbol poderiam ser utilizados a fim de determinar a toxicidade de cada éster de forbol a partir de ensaios toxicológicos e assim estabelecer o potencial tóxico de cada um deles. Com isso, estudos poderiam avaliar a toxicidade da torta quanto a presença de cada éster de forbol.