



**JOICE RAÍSA BARBOSA CUNHA**

**PROCESSO DE DESTOXIFICAÇÃO DA TORTA DA  
SEMENTE DE *Jatropha curcas* L. (PINHÃO-MANSO)  
UTILIZANDO ENZIMAS EXTRACELULARES DE  
MACROFUNGOS**

**LAVRAS-MG  
2017**

**JOICE RAÍSA BARBOSA CUNHA**

**PROCESSO DE DESTOXIFICAÇÃO DA TORTA DA SEMENTE DE**  
*Jatropha curcas* L. **(PINHÃO-MANSO) UTILIZANDO ENZIMAS**  
**EXTRACELULARES DE MACROFUNGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

Orientador

Dr. Félix Gonçalves de Siqueira

Coorientador

**LAVRAS-MG**  
**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Cunha, Joice Raísa Barbosa.

Processo de destoxificação da torta da semente de *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansão) utilizando enzimas extracelulares de macrofungos / Joice Raísa Barbosa Cunha. - 2017.

71 p.

Orientador(a): Eustáquio Souza Dias, Dr.

Coorientador(a): Félix Gonçalves de Siqueira, Dr.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Torta de pinhão-mansão. 2. Enzimas fúngicas. 3. Biodiesel. 4. Macrofungos. 5. Destoxificação. 6. Nutrição animal. I. Dias, Eustáquio Souza. II. Siqueira, Félix Gonçalves de. III. Título.

**JOICE RAÍSA BARBOSA CUNHA**

**PROCESSO DE DESTOXIFICAÇÃO DA TORTA DA SEMENTE DE  
*Jatropha curcas* L. (PINHÃO-MANSO) UTILIZANDO ENZIMAS  
EXTRACELULARES DE MACROFUNGOS**

**PROCESS OF DETOXIFICATION OF *Jatropha curcas* L. SEED CAKE  
(PINHÃO-MANSO) USING EXTRACELLULAR ENZYMES OF  
MACROFUNGES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 06 de março de 2017

Dr. Eustáquio Souza Dias UFLA

Dr. Félix Gonçalves de Siqueira EMBRAPA/Agroenergia

Dra. Marivane Lemos EMBRAPA/Agroenergia

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias  
Orientador

Dr. Félix Gonçalves de Siqueira  
Coorientador

**LAVRAS-MG  
2017**

*A Deus, pois sem Ele nada é possível.  
Aos meus pais, Regina Barbosa e Joilson Cunha, guerreiros nesta luta.  
À minha irmã, Jeysa Cunha pelo carinho.  
E ao meu amor Daniel Kalambayi Kalonji, pelo apoio incondicional.  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sem o qual nada seria possível. Agradeço por me dar forças, nos momentos mais difíceis, nos quais fiquei longe da minha família e amigos; por me confortar e por ter colocado no meu caminho pessoas maravilhosas.

Aos meus pais, minha mãe, Regina Celes de Rêgo Barbosa e meu pai Joilson Leão Cunha, por terem me apoiado onde quer que eu estivesse, sendo sempre exemplos de vida e uma das razões das minhas vitórias. À minha irmã, Jeysa Taynara Barbosa Cunha pela amizade e carinho, em todos os momentos, por me fazer sentir amada e importante.

Ao meu amado namorado Daniel Kalambayi Kalonji por estar sempre ao meu lado, apoiando-me, nos momentos mais difíceis e comemorando comigo, nos momentos de alegria, por orar por mim e comigo sempre e por seu amor incondicional.

Ao Professor Dr. Eustáquio Souza Dias, pela parceria no projeto, como meu orientador; e aos Professores, Dra. Patrícia Cardoso e Dr. Whasley Duarte, pelos ensinamentos didáticos, que fizeram de mim uma profissional melhor, com uma formação de melhor qualidade.

À Embrapa Agroenergia e aos doutores Félix Siqueira, Simone Mendonça, Mônica Damaso e Thaís Salum e aos analistas Thais Demarchi, Thályta Pacheco e José Antônio Ribeiro, pelo projeto FungiDetox e pela orientação e apoio durante os procedimentos experimentais do Mestrado.

À Universidade Federal de Lavras e aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola.

Aos membros da banca examinadora.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), por financiar o projeto e à Fundação de Amparo à Pesquisa/MG (FAPEMIG) pelo investimento da bolsa de estudos.

Aos meus amigos Rubén Pelarez, Ana Paula Araújo, Antony Machado e Marivane Lemos, pela ajuda, durante os experimentos nos laboratórios da Embrapa Agroenergia; Mariana de Lima e Luthiane Ferraz, por serem a minha família adotiva nestes dois anos de luta; Michelle Gonçalves, Suemis Parenti e Rafaela Andrade, pelas reuniões e estudo em grupo para as provas das diversas disciplinas; Dérica Gonçalves, por me ajudar nos trâmites finais; e Manassés Silva, Fernanda Castro e Patrícia Cruz, que fazem parte da minha vida desde a graduação na Universidade Federal da Bahia.

Muito Obrigada!

## RESUMO

A planta oleaginosa conhecida como pinhão-manso (*Jatropha curcas*) é uma espécie apontada como altamente promissora, para a produção de óleo para biodiesel, no entanto a toxicidade dos coprodutos (torta ou farelo) torna o seu cultivo e processo de industrialização menos rentável. Estes coprodutos, tortas e farelos apresentam composição altamente nutritiva que atende a composição de formulados de rações para animais monogátricos ou ruminantes, desde que devidamente destoxificadas e validadas. Os ésteres de forbol são as principais substâncias tóxicas presentes na torta de pinhão-manso (TSPM). A destoxificação por degradação dos ésteres de forbol pode ser por processos físicos, químicos, biológicos ou, ainda, combinados. Deste modo, este trabalho teve como objetivo avaliar um processo de destoxificação de TSPM, por meio de enzimas extracelulares, obtidas de cultivo de macrofungos por fermentação submersa (FSM) e em estado sólido (FES). Os resultados de degradação utilizando os extratos enzimáticos (EBE) das FSM e FES pelos macrofungos foram diferentes. O EBE-FSM de F17 e os EBE-FES de F3 e F10 conseguiram reduzir os ésteres de forbol para níveis considerados não tóxicos, ou seja, abaixo 0,09 mg de éster de forbol por grama de torta. O EBE-FSM de F17 foi o único capaz de degradar 100% dos ésteres de forbol. Algumas atividades enzimáticas foram determinadas junto aos extratos. As atividades de lipases e esterases não foram detectadas. O EBE-FSM do F17 apresentou 583,99 U/mL, 64,09 U/mL, 43,64 U/mL, 0,144 U/mL para lacase, peroxidases totais, protease e manganês peroxidase, respectivamente. Outro fungo cujo EBE da FSM se destacou foi o F2, com degradação de 88% dos ésteres de forbol. O extrato deste fungo apresenta elevada atividade de protease (336,67 U/mL) e atividades de lacase, peroxidases totais e manganês peroxidases de 101, 89 U/mL, 25,57 U/mL e 0,05 U/mL, respectivamente. Os resultados apontam o tratamento enzimático da TSPM como uma alternativa promissora de destoxificação de éster de forbol, em torta de pinhão-manso, visto que a atividade destoxificadora dos macrofungos pode estar associada ao aumento da atividade de lacase.

**Palavras-chave:** Torta de pinhão-manso. Enzimas fúngicas. Biodiesel. Macrofungos. Destoxificação. Nutrição animal.

## ABSTRACT

The oleaginous plant *Jatropha curcas* is a highly promising species for producing biodiesel oil, however, a toxicity of co-products (seed cake or bran) makes its cultivation and industrialization process less profitable. These co-products, seed cake and bran, have highly nutritious composition containing formulations of feed formulations for monogastric or ruminant animals, provided they are suitably detoxified and validated. Phorbol esters are the main toxic substances present in *Jatropha curcas* seeds cake (JCSC). The detoxification by phorbol esters degradation may be by physical, chemical, biological or even combined processes. Thus, this work aimed at a detoxification of JCSC by means of extracellular enzymes obtained from macrofungal culture by submerged fermentation (FSM) and solid state fermentation (FES). The degradation results using the enzymatic extracts (EBE) of the FSM and FES by the macrofungi were different. The EBE-FSM of F17 and the EBE-FES of F3 and F10 were able to reduce the phorbol esters to non-toxic levels, i.e. 0.09 mg of phorbol ester per gram of cake. F17's EBE-FSM was the only one capable of degrading 100% of phorbol esters. Some enzymatic activities were determined with crude extracts. Lipase and esterase activity were not detected. F17 EBE-FSM showed 583.99 U / mL, 64.09 U / mL, 43.64 U / mL, 0.144 U / mL for laccase, total peroxidases, protease, and manganese peroxidase, respectively. Another FSM EBE fungus was highlighted for F2, with degradation of 88% of phorbol esters. The extract of this fungus showed high protease activity (336.67 U / mL) and activities of laccase, total peroxidases and manganese peroxidase of 101.89 U / mL, 25.57 U / mL and 0.05 U / mL, respectively. The results point to the enzymatic treatment of JCSC as a promising alternative for phorbol ester detoxification, and a detoxifying activity of macrofungus may be associated with an increase in laccase activity.

**Keywords:** *Jatropha* cake. Fungal enzymes. Biodiesel. Macrofungi. Detoxification. Animal nutrition.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Distribuição do uso de matéria-prima para a produção de Biodiesel, no Brasil, em dezembro de 2016..... 16
- Figura 2.** (A) árvore jovem de *J. curcas* e (B) frutos de *J. curcas* em diferentes estádios de maturação.....19
- Figura 3.** Diagrama do processo de extração de óleo de *Jatropha* spp. ....21
- Figura 4.** (A) Frutos secos de *J. curcas*, abertos. (B) Sementes secas de *J. curcas*. (C) Óleo de semente de *J. curcas*. (D) Torta resultante da extração mecânica do óleo das sementes de *J. curcas*. ....23
- Figura 5.** Estruturas moleculares de ésteres de forbol.....28
- Figura 6.** Representação 2D (A) e 3D (B) do núcleo estrutural em comum dos ésteres de forbol. ....29
- Figura 7.** Estruturas básicas dos esqueletos diterpenoides de *J. curcas* L. ....29
- Figura 8.** Etapas dos eventos celulares que culminam na resposta inflamatória induzida por intoxicações de ésteres de forbol. ....32

## CAPÍTULO II

**Gráfico 1.** Gráfico sobre as taxas de degradação de éster de forbol em TSPM tratadas com extratos brutos enzimáticos resultantes da FSM(A) e da FES (B) de TSPM pelos fungos de podridão-branca selecionados. CC028 (*G. frondosa*) F1, CC040 (*P. lecomtei*) F2, CC102 (*F. hepática*) F3, CC110 (*P. sapidus*) F4, CC111 (*P. ferulae*) F5, CC124 (*T. versicolor*) F6, CC154 (*P. pulomonarius*) F7, CC159 (*C. comatus*) F8, CC335 (*P. florida*) F9, CC351 (*G. lucidum*) F10, CC353 (*P. eryngii*) F11, CC389 (*P. ostreatus*) F12, CC403 (*P. ostreatus*) F13, CC416 (*P. citrinopileatus*) F14, CC420 (*Pleurotus* spp.) F15, EF16 (*Amylosporus* sp.) F16 e EF88 (*P. pulomonarius*) F17. Foi realizada análise de variância ANOVA, teste a posteriori de Tukey. Diferença estatisticamente significativa com p-valor = \*0,5; \*\*0,1; e \*\*\*0,05; em relação ao controle. .... 58

**Gráfico 2.** Gráfico da atividade de lacase nos extratos brutos enzimáticos resultantes da FSM (A) e da FES(B) de TSPM pelos fungos de podridão-branca selecionados. CC028 (*G. frondosa*) F1, CC040 (*P. lecomtei*) F2, CC102 (*F. hepatica*) F3, CC110 (*P. sapidus*) F4, CC111 (*P. ferulae*) F5, CC124 (*T. versicolor*) F6, CC154 (*P. pulomonarius*) F7, CC159 (*C. comatus*) F8, CC335 (*P. florida*) F9, CC351 (*G. lucidum*) F10, CC353 (*P. eryngii*) F11, CC389 (*P. ostreatus*) F12, CC403 (*P. ostreatus*) F13, CC416 (*P. citrinopileatus*) F14, CC420 (*Pleurotus* spp.) F15, EF16 (*Amylosporus* sp.) F16 e EF88 (*P. pulomonarius*) F17. Foi realizada análise de variância ANOVA, teste a posteriori de Tukey. Diferença estatisticamente significativa com p-valor = \*0,5; \*\*0,1; e \*\*\*0,05; em relação ao controle. .... 62

**Gráfico 3.** Gráfico das concentrações de proteínas solúveis totais em EBE de FSM (A) e em EBE de FES (B) de TSPM pelos fungos de podridão-branca selecionados. CC028 (*G. frondosa*) F1, CC040 (*P. lecomtei*) F2, CC102 (*F. hepatica*) F3, CC110 (*P. sapidus*) F4, CC111 (*P. ferulae*) F5, CC124 (*T. versicolor*) F6, CC154 (*P. pulomonarius*) F7, CC159 (*C. comatus*) F8, CC335 (*P. florida*) F9, CC351 (*G. lucidum*) F10, CC353 (*P. eryngii*) F11, CC389 (*P. ostreatus*) F12, CC403 (*P. ostreatus*) F13, CC416 (*P. citrinopileatus*) F14, CC420 (*Pleurotus* spp.) F15, EF16 (*Amylosporus* sp.) F16 e EF88 (*P. pulomonarius*) F17. Foi realizada análise de variância ANOVA, teste a posteriori de Tukey. Diferença estatisticamente significativa com p-valor = \*0,5; \*\*0,1; e \*\*\*0,05; em relação ao controle. .... 64

**Gráfico 4.** PCA das enzimas presentes nos EBE-FSM de EF88 e CC040 e da atividade na degradação dos ésteres de forbol. .... 68

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Principais resultados descritos na literatura sobre a degradação de ésteres de forbol em TSPM, por meio do cultivo de algumas espécies de fungos, utilizando fermentação em estado sólido (FES). ..... 60
- Tabela 2.** Coeficientes de correlação de Spearman entre a degradação de éster de forbol, concentração de proteínas totais e atividade de lacase nos EBE-FSM..... 62
- Tabela 3.** Coeficientes de correlação de Spearman entre a degradação de éster de forbol, concentração de proteínas totais e atividade de lacase nos EBE-FES..... 63
- Tabela 4.** Valores de atividades enzimáticas nos EBE de FSM de *P. pulmonarius* EF88 e *P. lecomtei* CC040. .... 65
- Tabela 5.** Coeficientes de correlação de Spearman entre a degradação de éster de forbol, concentração de proteínas totais, atividade de lacase, peroxidases totais, proteases, manganês peroxidase, Fpase, CMCCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase nos EBE-FSM dos fungos EF88 e CC040 ..... 67

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\lambda$	Comprimento de onda
Abs	Absorbância
ABTS	2,2'- azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
atm	Unidade de pressão – equivale a 101325 Pascal
bar	Unidade de pressão – equivale a 100000 Pascal
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> (ácido bicinconínico)
BDA	Batata dextrose ágar
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
Ca(OH) <sub>2</sub>	Hidróxido de cálcio
CCD	Cromatografia em camada delgada
CMCase	Carboximetilcelulase
CPEs	Citopáticos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EBE	Extrato bruto enzimático
E.C	Ensaio colorimétrico
E.P.M.	Erro padrão da média
FES	Fermentação em estado sólido
FSM	Fermentação submersa
GLC	Cromatografia gás-líquido
GMP	Guanosina monofosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC/CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD	HPLC associada a detector de arranjo diodo
HPLC-MS-MS	HPLC associada à espectrometria de massa em <i>in tandem</i>
HPLC-UV	HPLC com um detector de ultravioleta
kGy	Quilo gray (quantidade de energia de radiação ionizante absorvida)
KOH	Hidróxido de potássio
LC-MS/MS	Cromatografia líquida associada à espectrometria de massa <i>in tandem</i>
MALDI	Ionização por dessorção por laser assistida por matriz

mM	Milimolar
Mn	Manganês
MS	Espectrometria de massas
NaCl	Cloreto de sódio
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PCA	Análise de componentes principais
pH	Potencial hidrogeniônico
PKC	Proteína quinase C
PMS	Forbol-12-miristato-13-acetato
PNPB	Programa nacional de produção e uso de biodiesel
RIP	Proteínas inativadoras de ribossomos
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA (ácido ribonucleico) ribossomal
RT	Reagente de trabalho
TCA	Ácido tricloroacético
TSPM	Torta de semente de pinhão-manso ( <i>Jatropha curcas</i> )
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
U	Unidade internacional – Para atividades enzimáticas
UFC	Unidade formadora de colônia
UPLC-MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência associada a espectrômetro de massas

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	PINHÃO-MANSO E A PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	16
2.1	Pinhão-manso ( <i>Jatropha curcas</i> l.) .....	18
2.2	Óleo de <i>Jatropha curcas</i> .....	21
2.3	Torta de sementes de pinhão-manso (TSPM) .....	23
2.4	Toxicidade de <i>Jatropha curcas</i> l. ....	24
2.5	Éster de forbol.....	27
2.5.1	Determinação de éster de forbol .....	33
2.6	Destoxificação via degradação de ésteres de forbol.....	35
3	INTEGRAÇÃO DAS CADEIAS PRODUTIVAS DO BIODIESEL E NUTRIÇÃO ANIMAL .....	40
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

### CAPÍTULO II

1	INTRODUÇÃO .....	49
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	51
2.1	Microrganismos .....	51
2.2	Extrato bruto enzimático de macrofungos por fermentação submersa (EBE-FSM) .....	51
2.3	Extrato bruto enzimático de macrofungos por fermentação em estado sólido (EBE-FES).....	52
2.4	Destoxificação enzimática de TSPM por meio de degradação de ésteres de forbol.....	52
2.5	Extração dos ésteres de forbol.....	52
2.6	Quantificação dos ésteres de forbol .....	53
2.7	Determinação de proteínas solúveis totais nos EBE-FSM ou EBE-FES.....	53
2.8	Determinação de atividades enzimáticas nos EBE-FSM ou EBE-FES .....	54
2.8.1	Lacase .....	54
2.8.2	Peroxidases totais e manganês peroxidase .....	54

2.8.3	CMCase e xilanase e FPase.....	55
2.8.4	Proteases .....	55
2.8.5	Lipases e estearases .....	56
2.9	Análises estatísticas .....	56
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
4	CONCLUSÕES.....	69
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é a oleaginosa com maior potencial para a produção de biodiesel pelo seu alto teor de óleo (GOMES, 2015; LAVIOLA *et al.*, 2012), porém os coprodutos resultantes de seu processo de industrialização, tortas ou farelos, resultantes da extração do óleo de suas sementes possuem substâncias tóxicas/antinutricionais, como os ésteres de forbol, que limitam seu uso pelo fato de poderem causar inflamações agudas e a indução de tumores (MENDONÇA, 2010; BELEWU *et al.*, 2010).

A torta de semente de pinhão-manso é utilizada como adubo orgânico, por ser rica em minerais como nitrogênio, fósforo e potássio (GOMES, 2015). Apesar da sua toxidez, seria possível a utilização deste coproduto, na formação de produtos com alto valor agregado, como no desenvolvimento de formulações para a nutrição animal, por exemplo, em razão de seu excelente teor proteico, que varia de 46 a 63% (LAVIOLA *et al.*, 2012; MENDONÇA, 2010), ou de no mínimo 16%, dependendo do método de extração do óleo (MAKKAR; BECKER, 2009).

Diversas estratégias químicas e biológicas têm sido abordadas na tentativa de resolver o problema da toxicidade desses resíduos, no entanto algumas delas não são economicamente viáveis, ou resolvem apenas parcialmente o problema da contaminação (GOMES, 2015).

Trabalhos na literatura comprovam que ésteres de forbol, curcina, lectina, saponina, tripsina e inibidores de tripsina podem ser degradados por agentes biológicos, principalmente, os fungos de podridão-branca (AREGHEORE *et al.*, 2003; BELUWE; SAM, 2010; KASUYA *et al.*, 2012; LUZ *et al.*, 2013). Estes tratamentos são considerados eficientes e economicamente viáveis e podem representar uma alternativa à utilização dos coprodutos da extração de óleo das sementes de pinhão-manso.

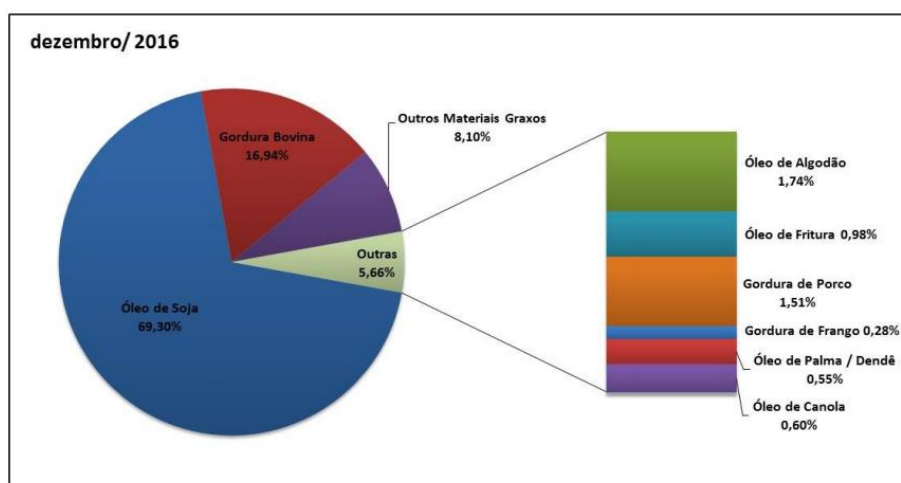
Os fungos de podridão branca, tais como *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Pycnoporus sanguineus* são capazes de degradar vários poluentes e substâncias recalcitrantes, como substâncias aromáticas, policíclicas, hidrocarbonetos, tinitrotoluenose fitatos, provavelmente, em função de enzimas extracelulares produzidas por estes microrganismos tais como: lacase, manganês peroxidase (MnP), celulase e xilanase (KASUYA *et al.*, 2012; LUZ *et al.*, 2014). Este potencial sugere que estes microrganismos, também, tenham a capacidade de degradar substâncias tóxicas presentes na torta de sementes de *J. curcas* (LUZ *et al.*, 2014).

A destoxificação de torta de semente de pinhão-manso, por meio de cultivo por fermentação estado sólido (FES), fora apresentada e reivindicada na literatura (BOSE; KEHARIA, 2014; GOMES, 2015; LUZ *et al.*, 2014). Alguns destes trabalhos correlacionam atividades enzimáticas com a destoxificação, porém nenhum deles comprovou qual ou quais enzimas microbianas (macrofungos) são responsáveis pela biotransformação dos ésteres de forbol. Também não demonstraram se a biotransformação realizada pelas reações enzimáticas resultou em substâncias tóxicas ou não, para inserção na nutrição animal.

Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência de extratos, contendo enzimas extracelulares de macrofungos (basidiomicetos) na destoxificação de torta de semente de pinhão, por meio da avaliação da degradação dos ésteres de forbol

## 2 PINHÃO-MANSO E A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Em 2004, a partir do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), foi iniciada, no Brasil, a cadeia produtiva do biodiesel e a sua inserção na matriz energética nacional, fazendo dele uma alternativa viável que vise à autossuficiência energética (LUZ *et al.*, 2014). O programa evoluiu de forma bastante eficiente, superando as metas iniciais. Em dezembro de 2016, o óleo de soja foi a fonte de cerca de 69,30% do total de biodiesel, produzido no Brasil, seguido de gordura bovina (16,94%), sendo o restante distribuído entre óleo de algodão (1,74%), gordura de porco (1,51%), óleo de fritura (0,98%), óleo de canola (0,60%), óleo de palma/dendê (0,55%), gordura de frango (0,57%) e outros materiais oleosos (7%) (Figura 1) (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, 2017).



**Figura 1.** Distribuição do uso de matéria-prima para a produção de Biodiesel, no Brasil, em dezembro de 2016.

Fonte: adaptado de Agência Nacional do Petróleo, 2017.

Outras oleaginosas somente serão integradas à cadeia do biodiesel se seus coprodutos tiverem um mercado tão promissor quanto o das cadeias produtivas da soja, do algodão e da canola ou dos produtos de origem animal supracitados. Os principais coprodutos são as tortas e farelos, obtidos após a extração do óleo de sementes oleaginosas, e a glicerina bruta, obtida após o processo de conversão de triglicerídeos em biodiesel por meio de transesterificação. Eles representam mais de 50% da massa inicial de sementes utilizadas na cadeia agroindustrial. Sendo assim, existe a necessidade de desenvolver formas de utilização desses resíduos para agregar renda à cadeia produtiva do biodiesel e minimizar impactos ambientais (RODRIGUES; RONDINA, 2013).

O sucesso de qualquer programa de biocombustível depende das políticas em nível nacional e muitos países asiáticos desenvolveram sua própria agenda nacional para a adoção em larga escala de biocombustíveis. Países como a Indonésia, Malásia e Índia já adotaram o pinhão-mansão, no programa de biocombustível, sendo a preferência secundária na Indonésia, país no qual o óleo de palma ainda é a principal fonte (EDRISI *et al.*, 2015).

A competição das culturas vegetais entre a produção, para a alimentação e seu uso como combustível, é um fator que aumenta os custos de produção de biodiesel, portanto a utilização de espécies não comestíveis nesta produção é altamente promissora (DEVAPPA; BINGHAM; KHANAL, 2013).

Diversos fatores devem ser avaliados, ao implementar uma nova matéria-prima na produção de biodiesel, como os fatores ambientais de produção e cultivo, disponibilidade da matéria-prima, custo das sementes, teor e qualidade de óleo, distância entre a produção da matéria-prima e sua utilização (custos de transporte), entre outros (PATIL; DENG, 2009).

Entre as matérias-primas de biodiesel não comestíveis com potencial, para inserção na matriz de óleos vegetais para biodiesel, podem-se apontar *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansão), *Pongamia pinnata* (karanj), *Simmondsia chinensis* (jojoba), *Hevea brasiliensis* (seringueira) e *Ricinus communis* (mamona) (SINGH e SINGH, 2010).

*Jatropha curcar* L. está entre uma das espécies mais estudadas para obtenção de óleo para fins de produção de biodiesel. Algumas características desta planta como: a resistência à seca, fácil propagação, baixo custo de sementes, boa adaptação, alto teor de óleo, foram apontadas em favor desta planta para tais fins (LUZ *et al.*, 2014).

Contudo, de acordo com Capdeville e Laviola (2013), ocorreram alguns erros na estratégia, pelo menos no Brasil, de incentivar o cultivo de pinhão-mansão sem conhecer totalmente os aspectos agronômicos, tais como variedades mais adaptadas, produtivas, sem toxicidade (tortas) ou métodos econômicos viáveis de destoxificação, entre outros. De acordo

com estes autores, muitos produtores agrícolas, outrora tomados pela euforia de ter uma planta com grande potencial, acabaram desistindo da produção, quando não encontraram preço pelo óleo, destinação da torta, técnicas assertivas de colheita e processamento dos frutos (BARROS, 2014).

Mas os estudos e programas de melhoramento genético e técnicas agronômicas continuam a ocorrer com o pinhão-manso, que busca valorizar a torta ou farelo, diminuindo sua toxicidade, e aumentar sua produção com variedades selecionadas.

O potencial desta oleaginosa é grande para a produção do biodiesel mesmo com todos os desafios agronômicos e de processos, pois suas sementes representam entre 53 e 79 % do peso do fruto e apresentam teor de óleo entre 33 e 38 % (DIAS *et al.*, 2007; GOMES, 2015; LAVIOLA *et al.*, 2012). Para cada tonelada de óleo de semente de pinhão-manso, são produzidas, no mínimo, 2,76 toneladas de torta ou farelo (MAKKAR; BECKER, 2009). Além de ter características físico-químicas de óleo favoráveis à produção de biodiesel, o potencial de rendimento de óleo/grão é superior ao das oleaginosas tradicionais, como a soja (DURÃES; LAVIOLA; ALVES, 2011; GOMES, 2015; MAKKAR; BECKER, 2009), chegando a 1500 kg/ha de óleo, na idade adulta (DRUMOND *et al.*, 2010; ROCHA *et al.*, 2012).

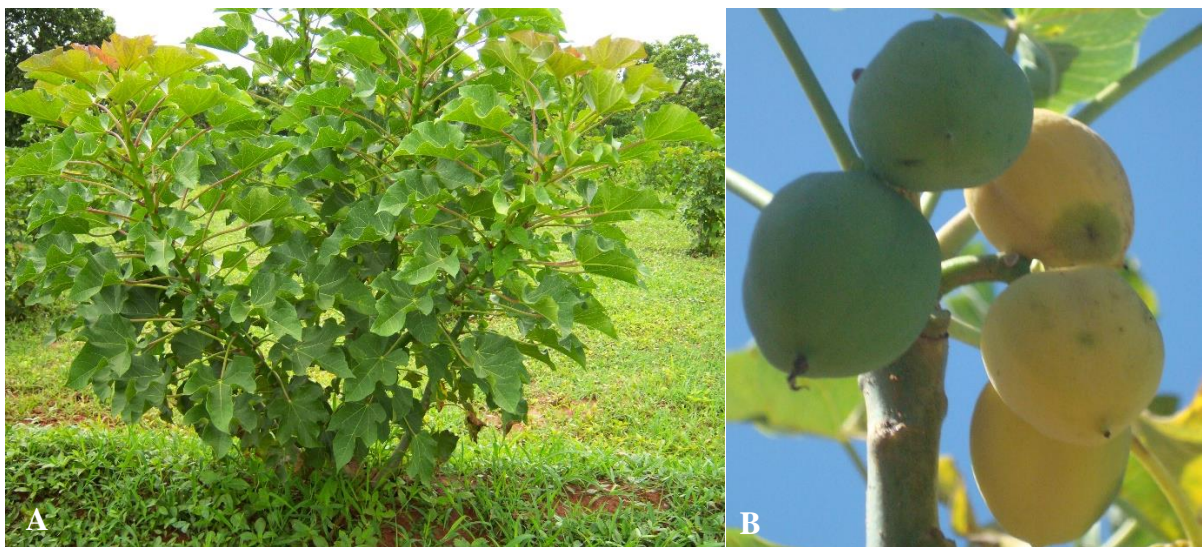
A torta e o farelo, coprodutos da extração mecânica ou por solvente do óleo, respectivamente, ricos em proteína de boa qualidade, são empregados na fabricação de ração, no caso da soja e do algodão, ou como adubo orgânico, no caso do pinhão-manso (MAKKAR; BECKER, 2009).

## 2.1 Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)

O gênero *Jatropha* tem cerca de 170 espécies de pequenas árvores, arbustos, subarbustos ou ervas amplamente distribuídas nos trópicos. As espécies mais comuns deste gênero são *J. curcas* L., *J. chevalieri* Beille, *J. elliptica* Muell. Arg., *J. gaumeri* Greenm., *J. glandulifera* Roxb., *J. gossypifolia* L., *J. Grossidentata* Pax Et. Hoffm., *J. integerrima* Jacq., *J. macrantha*, *J. mahafalensis* Jum e H. Perrier, *J. multifida* L., *J. nana* Dalz., *J. podagrica* Hook, *J. pohliana* Muell. Arg., *J. tanjorensis* Ellis e Saroja, *J. unicostata* e *J. weddelliana* Baillon (SABANDAR *et al.*, 2013). Algumas destas espécies, como *J. platyphylla* (com cerca de 60% de óleo livre de éster de forbol), são comestíveis no México, por exemplo (EDRISI *et al.*, 2015).

*Jatropha curcas* L. é uma árvore perene polivalente, de importância econômica significativa, que mede de 5 a 7m de altura, pertencente à família Euphorbiaceae, com uma

madeira macia e uma expectativa de vida de até 50 anos. É nativa do México e América Central e distribuída por toda a América Latina, África, Índia e Sudeste Asiático - distribuição pantropical (ACHTEN *et al.*, 2008; EDRISI *et al.*, 2015), com a meso-América como centro da diversidade genética para a espécie, havendo pouca variação no material cultivado fora desta região (KING *et al.*, 2009). É uma planta monoica cujas inflorescências terminais contêm flores unissexuais, que florescem apenas uma vez por ano, durante a estação chuvosa, em regiões úmidas ou sob condições de irrigação (PRAKASH *et al.*, 2007). A Figura 2 apresenta a planta *J. curcas* jovem e seus frutos em diferentes estádios de maturação.



**Figura 2.** (A) árvore de jovem de *J. curcas* e (B) frutos de *J. curcas* em diferentes estádios de maturação.

Fonte: A autora.

É uma espécie bem adaptada, o que permite que cresça em várias condições, podendo crescer em uma gama de climas e solos, incluindo áreas marginais, degradadas e contaminadas, e apresentando baixos requerimentos nutricionais (ACHTEN *et al.*, 2008; EDRISI *et al.*, 2015).

Esta espécie tem se mostrado altamente resistente à estresse biótico e abiótico, além de apresentar crescimento rápido, fácil propagação, pequeno período de gestação e maior teor de óleo, o que faz dela uma matéria-prima muito promissora para a produção de biodiesel (ABHILASH *et al.*, 2011; BALDINI; RARANCIUC; VISCHI, 2012; EDRISI *et al.*, 2015; MAKKAR; BECKER, 2009). Existem perspectivas promissoras nos programas de biodiesel com relação à *Jatropha* spp. em vários países (EDRISI *et al.*, 2015; KING *et al.*, 2009). No Brasil, esta cultura foi uma promessa no lançamento do Plano Nacional de Biodiesel, que tinha a mamona como destaque, bem como o girassol, porém apresentando espaço para outras oleaginosas.

Em países asiáticos, africanos e latino-americanos, grandes plantações de *Jatropha* spp. foram feitas, por seus benefícios ambientais visíveis. Estas plantações foram apontadas como sendo responsáveis por revitalizar áreas marginais e degradadas, alcançar a segurança energética e aliviar a pobreza rural por meio do emprego e da sustentabilidade na produção de biocombustíveis (ABHILASH *et al.*, 2011; ARIZA-MONTOBBIO *et al.*, 2010; EDRISI *et al.*, 2015; KANT; WU, 2011).

Os países em desenvolvimento que adotaram a produção de *Jatropha* spp. em larga escala apresentaram como motivos seu potencial para a produção de biodiesel, o maior teor de óleo, quando comparado a outras culturas de biocombustíveis, a capacidade de crescer e recuperar vários tipos de solos, o fato desta espécie não precisar de muita irrigação e insumos agrícolas, sua resistência a pragas e à fácil colheita pelo tamanho e arquitetura da planta (ABHILASH *et al.*, 2011; ACHTEN *et al.*, 2008; EDRISI *et al.*, 2015), e alguns países mostram muito interesse por programas de biocombustível de *J. curcas* (EDRISI *et al.*, 2015; SALE; DEWES, 2009).

Há mais de um milhão de hectares cultivadas por *J. curcas*, em todo o mundo e 85% delas estão em países asiáticos como Índia, China e Mianmar, 12% estão na África e 2% na América Latina. O líder em plantações de *J. curcas* é a Índia, com uma área de cerca de 300.000 hectares (EDRISI *et al.*, 2015).

O melhoramento das práticas agronômicas e genéticas levou a um aumento significativo do rendimento, em todas as principais culturas oleaginosas, um programa semelhante para *J. curcas* e agregação de valor aos coprodutos da extração do seu óleo contribuiria significativamente para a utilização desta espécie na produção de biocombustível (HE *et al.*, 2011).

Assim, para melhorar a sustentabilidade econômica da cadeia de biodiesel de *J. curcas*, são necessários investimentos no desenvolvimento de variedades de alto rendimento e teor de óleo, no melhoramento genético da espécie, o aumento da resistência a doenças e padronização das práticas agronômicas (EDRISI *et al.*, 2015; MAKKAR; BECKER, 2009), além da exploração adequada dos coprodutos, após a extração do óleo (torta e farelo de sementes), uma vez que esta representa cerca de 70% (p/p) das sementes processadas e tem um teor nutricional elevado, com altos níveis de aminoácidos essenciais e proteínas (MAKKAR; BECKER, 2009).

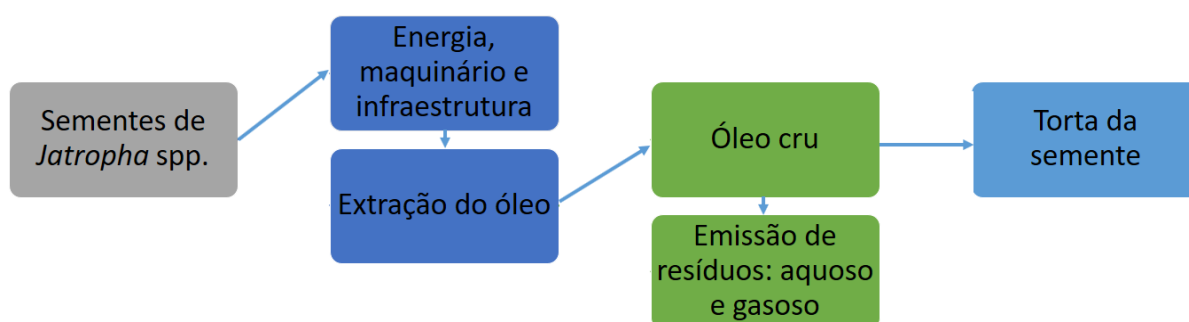
A maioria das variedades de *J. curcas* cultivadas no mundo são tóxicas, apenas uma variedade não tóxica é encontrada no México (KING *et al.*, 2009; MAKKAR; BECKER, 1997) e as sementes desta variedade são consumidas pela população local, após torrefação (KING *et al.*, 2009). A única diferença entre as sementes tóxicas e não tóxicas de *J. curcas* é a

concentração de ésteres de forbol entre 0 e 0,09mg/g, não havendo diferenças no nível de aminoácidos, inibidor de tripsina, lectina, fitato, curcina e saponina entre eles (HE *et al.*, 2011; INSANU *et al.*, 2013; MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998; MAKKAR; BECKER, 1997).

## 2.2 Óleo de *Jatropha curcas*

O óleo de semente de pinhão-manso tem sido tradicionalmente usado, para a produção de sabão ou vela, iluminação e lubrificante, mas a sua composição de ácidos graxos é adequada para nutrição humana (INSANU *et al.*, 2013) e excelente para utilização como combustível (LIANG *et al.*, 2009). Apesar da sua composição altamente nutritiva, o óleo de *J. curcas* não é comestível em razão de sua toxicidade, o que faz dele uma ótima opção para a produção de biodiesel, já que não compete com a indústria alimentícia (BOSE; KEHARIA, 2014).

Para a produção de biodiesel, as sementes de pinhão-manso devem ser secas no forno (à 105°C) ou ao sol (por 3 semanas) e seu óleo extraído. Para tanto, são necessários insumos como máquinas e energia, além da infraestrutura, enquanto os coprodutos da extração são tortas ou farelos das sementes (Figura 3), dependendo se a extração do óleo for mecânica ou por solvente químico (ACHTEN *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Diagrama do processo de extração de óleo de *Jatropha* spp.  
Fonte: adaptado de ACHTEN *et al.*, 2008.

A escolha do método de extração depende do objetivo de utilização do óleo. Os dois procedimentos de extração, mecânica e química, são bem estabelecidos e ambos apresentam vantagens e desvantagens quanto à adequação, centralização, eficiência da extração e fatores ambientais e de saúde (ACHTEN *et al.*, 2008).

A extração mecânica do óleo das sementes é conduzida por prensagem, por uma prensa manual de *ram*, que extrai de 60-65% do óleo disponível, ou uma prensa de parafuso

acionada por motor, com extração de 75-80% do óleo (ACHTEN *et al.*, 2008). A extração química do óleo pode ocorrer por diferentes solventes como *n*-hexano, protease A, CO<sub>2</sub> supercrítico, bioetanol e álcool isopropílico. O método de *n*-hexano é o mais comum deles, apesar de representar riscos à saúde e ao ambiente (ACHTEN *et al.*, 2008).

O óleo bruto de pinhão-mansão tem composição e características semelhantes ao óleo de Colza como combustível. A qualidade de óleo depende da interação entre ambiente e genética, que determina o tamanho, o peso e teor de óleo da semente (KAUSHIK *et al.*, 2007). O óleo de semente de pinhão-mansão tem mais de 75% de ácidos graxos insaturados, sendo composto majoritariamente de ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:2) e a proporção entre estes dois é dependente do grau de maturação dos grãos no momento da colheita (ACHTEN *et al.*, 2008), além disso apresentam teores de amido e açúcares solúveis inferiores a 6% (MARTINEZ-HERRERA *et al.*, 2006).

A escolha do uso de óleo de *J. curcas* transesterificado (biodiesel, isto é, ésteres metílicos) ou não depende do objetivo do uso e da infraestrutura disponível, mas, no geral, óleos transesterificados obtêm melhores resultados do que óleos naturais, puros ou em mistura. Além do uso como combustível, transesterificado em ésteres etílicos ou não, puro ou misturado com diesel fóssil, o óleo de *J. curcas* tem sido usado para produzir biocidas (inseticida, moluscicida, fungicida e nematocida) (SHANKER; DHYANI, 2006). A Figura 4, abaixo, apresenta as sementes, o óleo e a torta das sementes do pinhão-mansão.



**Figura 4.** (A) Frutos secos de *J. curcas*, aberto. (B) Sementes secas de *J. curcas*. (C) Óleo de semente de *J. curcas*. (D) Torta resultante da extração mecânica do óleo das sementes de *J. curcas*.  
Fonte: A autora.

### 2.3 Torta de sementes de pinhão-mansó (TSPM)

São gerados, aproximadamente, 500 g de torta de semente de *J. curcas* (TSPM) para cada quilo de semente prensada para extração de óleo (ZANZI; PEREZ; SOLER, 2008) e o teor médio de proteína bruta em TSPM é de 58,1% e o teor energético bruto é 18,2 MJ/kg. Dependendo da eficiência da extração, o teor médio de óleo na torta fica entre 9-12% de óleo por peso de torta, o que influencia no seu valor energético. Além de proteínas de alta qualidade, essa torta contém todos os aminoácidos essenciais, com exceção da lisina, mas tem várias toxinas e, por isso, não é utilizável como forragem (FRANCIS; EDINGER; BECKER, 2005).

A composição química média da TSPM desidratada é 60% de proteína, 0,6% de gordura, 9% de cinzas, 4% de fibra e 26% de carboidratos (RAKSHIT *et al.*, 2008). Ela tem mais nutrientes orgânicos que cama de frango e estrume de gado, contendo altos teores de nitrogênio, fósforo e matéria orgânica e, por este motivo, é altamente eficiente como fertilizante. Além disso, suas toxinas, principalmente ésteres de forbol, fazem com que ela tenha ação biopesticida / inseticida e moluscicida (FRANCIS; EDINGER; BECKER, 2005).

Este coproduto pode ainda ser usado para a produção de biogás, por digestão anaeróbia. O rendimento do gás pode variar, de acordo com o método de extração do óleo, que pode ser de 0,6 m<sup>3</sup>/kg de TSPM (extração mecânica) ou de 0,5 m<sup>3</sup>/kg de farelo de semente de pinhão-mansoso (extração por solventes químicos), utilizando-se consórcios microbianos como inóculo (RADHAKRISHNA, 2007), mas com uso de esterco de porco como inóculo, o rendimento é de apenas 0,446 m<sup>3</sup> de gás por kg de torta seca (STAUBMANN *et al.*, 1998).

A utilização dos resíduos como fertilizante e na produção de biogás pode reduzir os custos do cultivo de *J. curcas* L., além de reduzir seu impacto ambiental. No entanto a utilização destes coprodutos na nutrição animal seria o ideal, caso a destoxicação seja viável (ACHTEN *et al.*, 2008). A composição de aminoácidos e proteínas deste coproduto é ainda mais interessante que a de farelo de soja para a utilização na alimentação animal (GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014).

#### **2.4 Toxicidade de *Jatropha curcas* L.**

As sementes de pinhão-mansoso cruas, cozidas ou torradas, demonstraram toxicidade em estudos com animais monogástricos e poligástricos podendo ser letal, dependendo da dose (MENDONÇA; RIBEIRO, 2013). Os sinais de intoxicação incluem diarreia, dispneia, desidratação e perda de peso, além de aumento de aspartato aminotransferase, amônia e potássio, e diminuição da proteína total no soro sanguíneo (AREGHEORE; BECKER; MAKKAR, 2003), hemorragia nos rins, pulmões, retículo, baço e rúmen e necrose e degeneração do fígado (INSANU *et al.*, 2013). Em crianças os principais sintomas são vômito (95% dos casos), diarreia (50%) e cefaleia (40%) (INSANU *et al.*, 2013).

Metabólitos secundários, como lectinas, curcinas e inibidores de tripsinas, são substâncias tóxicas ou irritantes já relatadas em pinhão-mansoso (MAKKAR; BECKER, 1997). Os inibidores de tripsina e as lectinas são termolábeis e podem ser inativados por tratamentos térmicos (GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014). O curcina é abundante em *J. curcas*, ela pertence à família de proteínas inativadoras de ribossomos (RIP) do tipo I, que são menos tóxicas que os RIP tipo II (HE *et al.*, 2011), ela rompe a ligação N-glicosídica entre o rRNA 28S e a adenina, o que bloqueia a tradução de proteínas (INSANU *et al.*, 2013).

O pinhão-mansoso apresenta ainda os alcaloides 5-OH-pirrolidin-2-ona e pirimidin-2,4-diona; cumarinas, tais como marmesina, tomentina, propacina e jatrofina; e os flavonoides apigenina, vitexina e isovitexina (INSANU *et al.*, 2013).

Acreditava-se que a lectina era a responsável pela toxicidade da *Jatropha* spp., entretanto, apesar de a intoxicação apresentar atividade de inibidores de tripsina e lectinas, elas são reduzidas por tratamento térmico (AREGHEORE; BECKER; MAKKAR, 2003). Em 1997, o elevado nível de ésteres de forbol em *J. curcas* foi, então, identificado como o principal responsável pela toxicidade da espécie (MAKKAR; BECKER, 1997).

Os ésteres de forbol são substâncias tóxicas termoestáveis que se mantêm presentes na torta, mesmo após a extração do óleo, tornando-a inviável para nutrição animal, sem destoxificação prévia (GOMES, 2015). Estas substâncias são capazes de suportar temperaturas de torrefação, de 160°C durante 30 minutos (AREGHEORE; BECKER; MAKKAR, 2003; MAKKAR; BECKER, 1997). São moléculas com afinidade pelos receptores da membrana de fosfolípidios e ativam a proteína quinase C (PKC) (MENDONÇA; RIBEIRO, 2013), levando a uma resposta miogênica, ampliando a eficácia de agentes cancerígenos, agindo, assim, como cocarcinógenos (GOMES 2015; GOEL *et al.*, 2007).

Além destas substâncias, a TSPM tem alguns fatores antinutricionais. Os fatores antinutricionais (fitoquímicos) podem ser divididos em quatro: fatores que afetam a digestão de proteínas, como inibidores de tripsina, taninos e lectinas; fatores que afetam a absorção de minerais, que incluem fitatos, gossipol, pigmentos, oxalatos e glucosinolatos; antivitaminas; e substâncias diversas, como micotoxinas, cianogênicos, nitratos, alcaloides, fitoestrogênios e saponinas (INSANU *et al.*, 2013).

Os fatores antinutricionais de *J. curcas* incluem fitato (ácido fítico em forma de sal), taninos e saponinas. O ácido fítico diminui a absorção de minerais e proteínas, no trato gastrointestinal, pela formação de complexos insolúveis entre os cátions polivalentes e as proteínas (LIANG *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2008). Os taninos, também, formam complexos com proteínas, que são precipitadas e tornam-se insolúveis, inibindo a digestão de proteínas e aminoácidos (REHMAN; SHAH, 2005).

O fitato é um importante componente antinutricional de *J. curcas*, sendo sintetizado, a partir da fosforilação total do mioinositol e diminui a biodisponibilidade de proteínas e minerais di e tri-valentes, como cálcio, ferro, zinco, cobre, magnésio entre outros, por se complexar fortemente com elementos carregados positivamente (GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014; GOMES, 2015; SELLE e RAVINDRAN, 2007). Ele é a principal forma de estoque de fósforo no tecido vegetal, nas formas de inositol mono, di, tri, tetraquis e pentaquisfosfato (KOHLMEIER, 2003) e esse fósforo é liberado para absorção pela ação de fitases produzidas por microrganismos do rúmen, ou adicionadas à ração de monogástricos.

As saponinas causam hemólise das hemácias, além de reduzirem a palatabilidade da dieta, e formar espuma quando em contato com solução aquosa (FRANCIS *et al.*, 2001), ela ainda reduz a digestibilidade por complexar-se com proteínas, inibindo a hidrólise da quimiotripsina (SHIMOYAMADA *et al.*, 1998). Em peixes foi observada alteração da viscosidade intestinal, inibindo a absorção de alguns nutrientes, levando-os à morte (FRANCIS; MAKKAR; BECKER, 2001).

A presença destas substâncias impossibilita o uso de sementes de pinhão-mansão e derivados para alimentação de animais. No Brasil a torta de pinhão-mansão é utilizada apenas como adubo orgânico, graças à sua composição, rica em nitrogênio, fósforo e potássio e outros minerais (GOMES, 2015). No entanto é possível inativar algumas destas substâncias, por exemplo, a dupla extração por solvente utilizando hexano e etanol com 20% de umidade, a 126°C, pressão de 2 bar, por 10 minutos inativa completamente os inibidores de tripsina e lectina (INSANU *et al.*, 2013). Tratamento térmico (120°C por 30 minutos) seguido por extração com solvente para remoção de ésteres de forbol (metanol, hidróxido de sódio ou de potássio, por exemplo), também, pode resultar na eliminação da maioria dos fatores antinutricionais e toxinas de *J. curcas* (MAKKAR; BECKER, 1997).

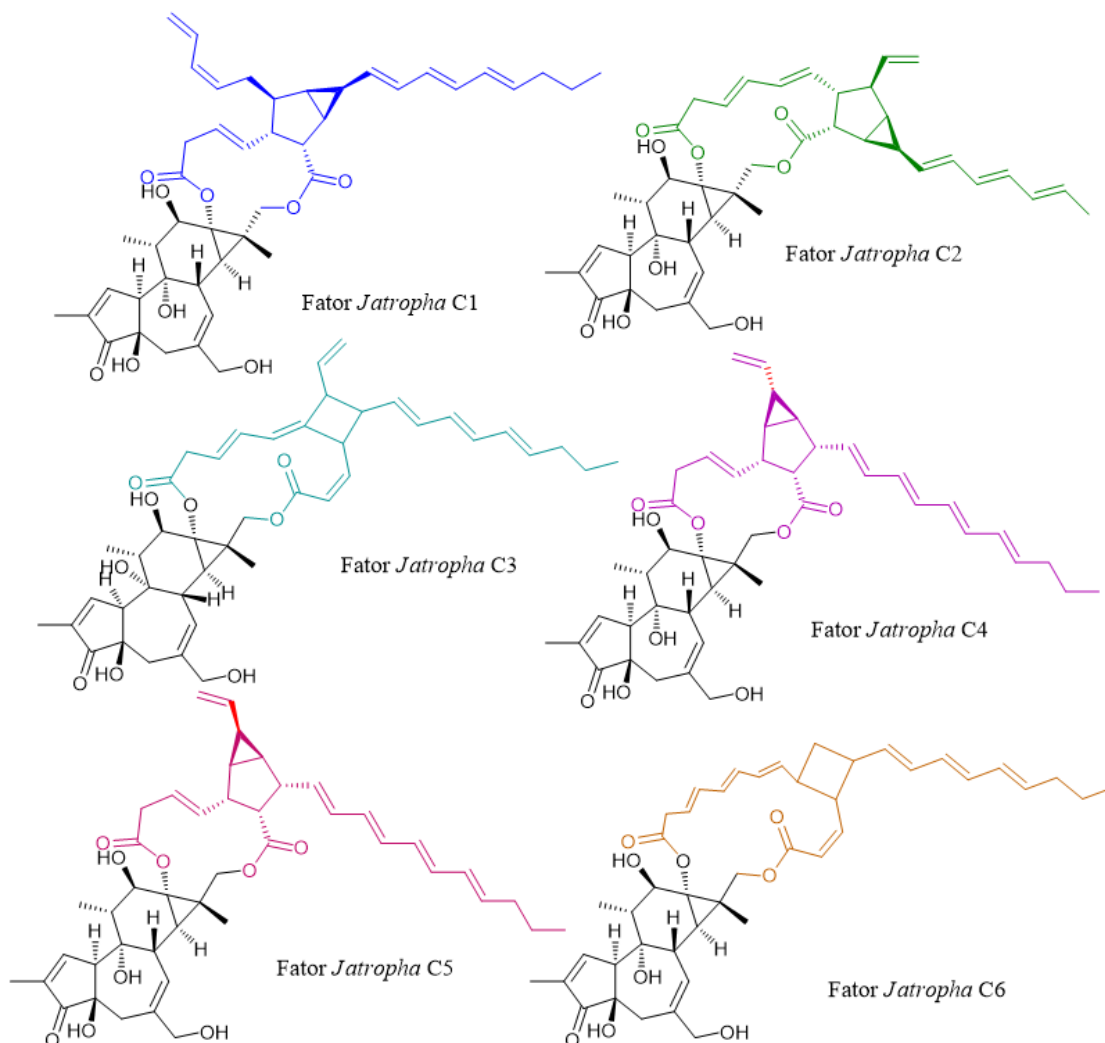
Alguns trabalhos relatam, ainda, a eficiência de tratamentos biológicos na degradação de algumas destas substâncias. Phengnuam e Suntornsuk (2013), por exemplo, estudaram o efeito das fermentações sólida e submersa de TSPM por *Baillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*, na degradação de substâncias tóxicas e, durante 5 dias de fermentação submersa, *B. licheniformis* reduziu as concentrações de ácido fítico e inibidor de tripsina em 42% e 75%, respectivamente, mas não houve alteração nas concentrações de lectina. Os ésteres de forbol podem ser degradados por ambas as espécies. O máximo de redução foi observado com fermentação submersa, em cerca de 60% com *B. licheniformis* e, aproximadamente, 40% com *B. subtilis*. A fermentação submersa foi a mais eficaz para a degradação do éster de forbol por ambas as espécies a qual foi diretamente proporcional ao crescimento bacteriano.

Os *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus nigericans*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma longibrachiatum*, também, foram testados para a degradação de fatores antinutricionais, por Beluwe e Sam (2010), e os resultados foram satisfatórios. Estes fungos reduziram os inibidores de tripsina de 20,51% para 8,23, 8,15, 8,01, 6,50 e 7,98%; a lectina de 34,36% para 15,25, 14,75, 13,98, 7,58 e 14,10%; as saponinas de 2,47% para 0,53, 0,33, 0,22, 0,13 e 0,43%; e os fitatos foram reduzidos de 9,10% para 4,32, 4,18, 3,88, 2,70 e 4,12%, respectivamente. Luz e colaboradores (2013 e 2014) investigaram a ação do macrofungo *Pleurotus ostreatus* na degradação de taninos e ácido fítico, bem como a conversão deste ácido

fítico em fósforo livre por este fungo. Os taninos foram reduzidos em mais de 50%, em 15 dias de cultivo e quase 100%, em 60 dias, enquanto o ácido fítico foi reduzido, para um terço de sua concentração inicial, no primeiro estudo e 100% em 60 dias de cultivo, com um aumento proporcional do fosforo livre em, aproximadamente, 70%.

## 2.5 Éster de forbol

Os ésteres de forbol são o principal impedimento comercial de torta e farinha de *J. curcas* como matéria-prima para nutrição animal. Durante a extração de óleo das sementes, 70-75% dos ésteres de forbol saem no óleo e 25-30% permanecem fortemente ligados à torta ou farelo, com cerca de 1-3 mg/g, e 3-6 mg/g no óleo de *J. curcas* (GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014). Em 2002, Haas, Sterk e Mittelbach isolaram seis ésteres diterpênicos intramoleculares (chamados de fatores de *Jatropha*: C1-C6) de óleo de semente e todas as moléculas possuem a mesma porção de diterpeno, nomeadamente, 12-desoxi-16-hidroxi-forbol (Figura 5) (BALDINI *et al.*, 2014; GOEL *et al.*, 2007).



**Figura 5.** Estruturas moleculares de ésteres de forbol.

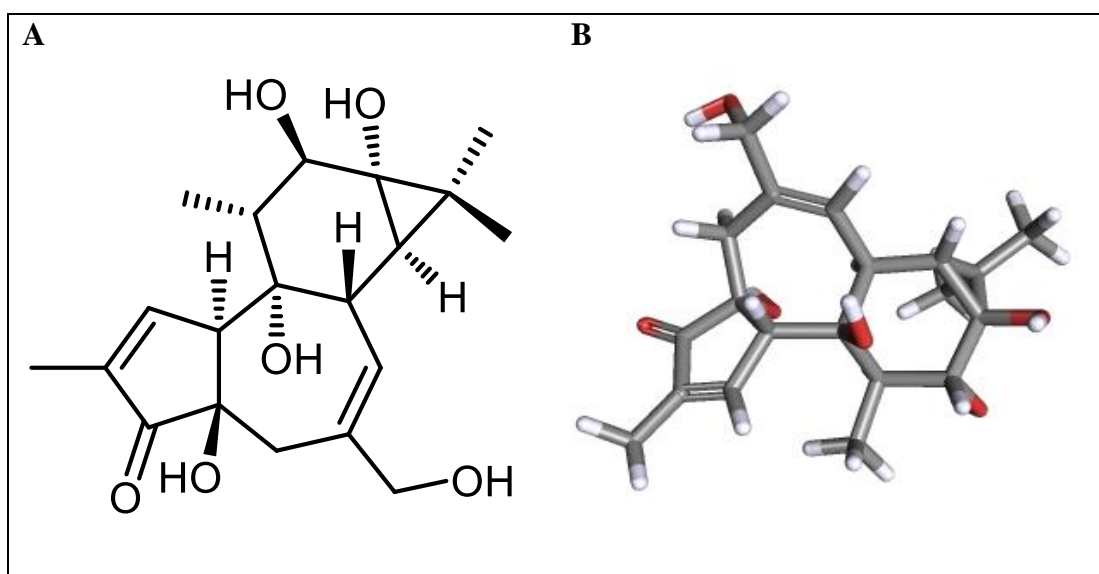
Fonte: adaptado de BALDINI *et al.*, 2014.

O fator C1 tem um biciclohexano, um grupo vinílico, resíduo nonatrieno e cadeia éster de carbonila simples no carbono-12. O fator C2 difere do fator C1 no comprimento da cadeia de carbono (C-6 no fator C1 e C-8 no fator C2). Os fatores C3 e C6 têm anel ciclobutano que é trissubstituída no fator C6 e tetrasubstituída no fator C3. C4 e C5 foram isolados como epímeros, pois não são separados por cromatografia. O comprimento, a orientação e a posição das cadeias de carbono destes fatores são diferentes do fator C1 (GOEL *et al.*, 2007; HAAS; STERK; MITTELBAACH, 2002).

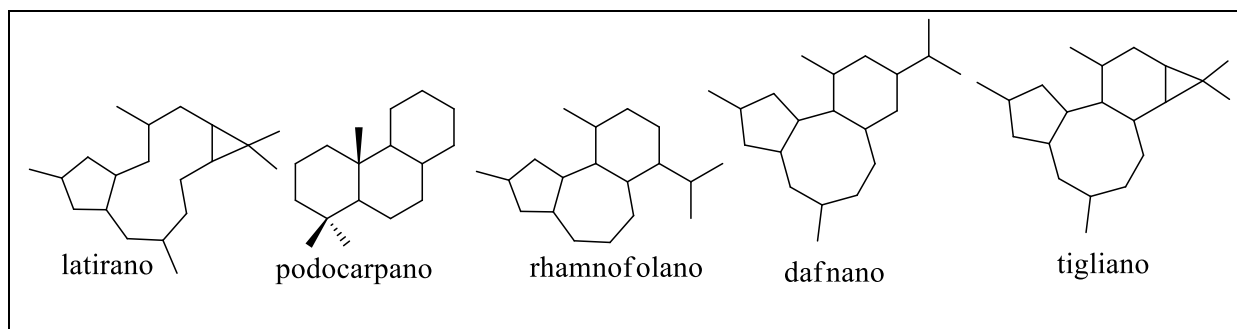
Ésteres de forbol são os derivados de diterpenos tetracíclicos mais potentes e tóxicos, comumente encontrados em plantas dos gêneros *Anthosthema*, *Croton*, *Euphorbia*, *Jatropha*, *Ostodes*, *Sapium* e *Wikstroemia*, como nas espécies *Sapium indicum*, *S. japonicum*, *Euphorbia frankiana*, *E. cocrulescência*, *E. ticulli*, *Croton spareiflorus*, *C. tigilium*, *C. ciliatoglandulifer*, *Excoecaria agallocha*, e *Homalanthus nutans* (GOEL *et al.*, 2007).

Estes fatores diferem em seus padrões de hidroxilação e na estereoquímica dos seus sistemas de anéis, e o mais comum e mais estudado dos ésteres da família Euphorbiaceae é oforbol-12-miristato-13-acetato (PMA) ou 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (DEVAPPA *et al.*, 2013; HAAS, STERK; MITTELBAACH, 2002; MAKKAR; BECKER, 1997), mais tóxico que o 12-O(N-metilaminobenzoil)13-O-acetil-14-desoxi-forbol, também, muito comum e com ação pró-inflamatória rápida (GOEL *et al.*, 2007). O 4 $\beta$ -12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato foi o primeiro éster de forbol encontrado em plantas, no Sudeste Asiático (GOEL *et al.*, 2007).

Os ésteres de forbol são moléculas que apresentam um grupamento denominado forbol (Figura 6) e um diterpeno. Entre o grupo de terpenoides isolados de *J. curcas* os mais importantes biologicamente são os latirano, podocarpano, rhamnfolano, dafnano e tigliano (Figura 7), classificados de acordo com sua estrutura química (INSANU *et al.*, 2013).



**Figura 6.** Representação 2D (A) e 3D (B) do núcleo estrutural em comum dos ésteres de forbol.  
Fonte: adaptado de INSANU *et al.*, 2013.



**Figura 7.** Estruturas básicas dos esqueletos diterpenoides de *J. curcas* L.  
Fonte: adaptado de INSANU *et al.*, 2013.

O diterpeno mais comumente encontrado nos cultivares tóxico de *J. curcas* é o tigliano (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2012; GOEL *et al.*, 2007; GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014; INSANU *et al.*, 2013) e o latirano (INSANU *et al.*, 2013). A grande variedade de ésteres de forbol ocorre em decorrência da hidroxilação dessa estrutura básica em diferentes posições e à ligação éster a várias porções ácidas (GOEL *et al.*, 2007). A hidroxilação é encontrada na posição C12 e C13 do esqueleto de tigliano (GOEL *et al.*, 2007; INSANU *et al.*, 2013).

A hidroxilação do tigliano em diferentes posições e a posterior ligação éster a várias porções ácidas resulta na formação de grandes variedades estruturais apresentadas pelos ésteres de forbol (GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014). O forbol (Figura 6) contém cinco grupos hidroxila com reatividade diferente quanto à acilação. As duas categorias de forbols,  $\alpha$  (inativo) e  $\beta$  (ativo), diferem-se no grupo OH do anel C, o que resulta na disposição espacial do anel D (GOEL *et al.*, 2007; GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014).

Os ésteres de forbol inativos ( $\alpha$ ) são lipofílicos (hidrofóbicos) e têm propriedades físico-químicas semelhantes às dos ésteres ativos ( $\beta$ ), mas são incapazes de ativar as PKC em virtude das mudanças conformacionais (GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014; HAAS; STERK; MITTELBACH, 2002). O tipo de ésteres de forbol e sua quantidade individual dependem da variedade e das condições do solo/clima durante o crescimento das plantas (MARTINEZ-HERRERA *et al.*, 2006). Os ésteres de forbol são instáveis e susceptíveis à oxidação, hidrólise, transesterificação e epimerização durante procedimentos de isolamento (HAAS; STERK; MITTELBACH, 2002). A estrutura dessas moléculas pode ser determinada por métodos espectroscópicos, como a ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) e técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) (GOEL *et al.*, 2007).

As concentrações de ésteres de forbol em TSPM dependem do cultivar da *J. curcas*, do solo cultivado, da idade das sementes e da eficiência de extração do óleo. A literatura apresenta os teores de éster de forbol, em torta de sementes sem casca da Nicarágua, que é de 1,78 mg/g de amostra seca (AREGHEORE; BECKER; MAKKAR, 2003); do Zimbabwe, de 0,70 mg/g (CHIVANDI *et al.*, 2004); e de quatro províncias da Tailândia, com concentrações menores de 0,21-0,47 mg/g de TSPM (DONLAPORN; SUNTORNSUK, 2011).

Foram relatados acessos atóxicos (comestíveis) no México, nos Estados de Quintana Roo e Vera Cruz, em que, também, há cultivares tóxicos, assim como em Morelos. He e colaboradores (2011) avaliaram os teores de éster de forbol em sementes de *J. curcas* coletadas em Madagascar, na Tanzânia, no Suriname e nos Estados de Puebla, Quintana Roo, Vera Cruz e Chiapas, no México. Esses autores relataram que todas as amostras de sementes obtidas de fora do México continham de 120-515  $\mu\text{g/g}$  de éster de forbol e a maioria das amostras do

México não possui quantidades detectáveis destes ésteres, com exceção da amostra obtida do estado de Chiapas, que continha 270 µg de éster de forbol por g de semente. Esses resultados sugerem que o consumo de sementes de *J. curcas* no México deve ser, rigorosamente controlado, para evitar intoxicações por consumo equivocado.

Geralmente, os ésteres de forbol (mg/g matéria seca) são distribuídos por quase todas as partes da planta de *J. curcas*, como nas raízes (0,55), na madeira (0,09), na casca marrom externa (0,39), na casca verde interna (3,08), nos brotos (1,18-2,10), nas hastes (0,78-0,99), nas folhas (1,83-2,75), nas flores (1,39-1,83) e nos grãos (2-6), com exceção do látex (MAKKAR; BECKER, 2009).

Os efeitos biológicos dos ésteres de forbol apresentam relação entre estrutura e atividade, dentre as quais, a principal e mais investigada é a promoção de tumores, resultado na sua interferência a diferenciação celular. Eles são considerados cocarcinogênicos, pois promovem tumores, na presença de indutores químicos. A promoção do crescimento tumoral se dá pela ativação de PKCs, que catalisam a fosforilação de outras proteínas envolvidas na transdução de sinal, resultando na diferenciação celular descontrolada (DEVAPPA *et al.*, 2013; GOEL *et al.*, 2007). Os ésteres de forbol ligam-se aos domínios de cisteína das PKCs, afetando a biossíntese de proteínas, as atividades de várias enzimas, o DNA, as poliaminas, os processos de diferenciação celular e a expressão gênica (GOEL *et al.*, 2007).

Além de promover tumores, os ésteres de forbol alteram a morfologia celular, induzem agregação plaquetária, servem como mitogênio linfocitário, elevam os níveis de GMP cíclico, estimulam a ornitina descarboxilase, estão envolvidos na modulação de respostas inflamatórias, modulam positiva ou negativamente a nocicepção e limitam a captação de ferro pelas células, por inibirem a capacidade de transferência de ligação e modificarem os receptores (DEVAPPA *et al.*, 2013; GOEL *et al.*, 2007).

As respostas inflamatórias e vasculares induzidas por ésteres de forbol estão resumidas na Figura 8. A principal ação dos ésteres de forbol nas membranas biológicas é sua ação sobre a PCK. Os ésteres de forbol ligam-se a receptores de membrana fosfolipídicos, causando modificação nas atividades desses receptores, alterando a adesão celular, aumento da ingestão de 2-desoxiglucose e outros nutrientes, induzindo a síntese de ácido araquidônico e de prostaglandinas, inibindo os fatores de crescimento epidérmico e o metabolismo lipídico (GOEL *et al.*, 2007).



**Figura 8.** Etapas dos eventos celulares que culminam na resposta inflamatória induzida por intoxicações de ésteres de forbol.

Fonte: adaptado de GOEL *et al.*, 2007.

Além dos efeitos tóxicos já mencionados, alguns ésteres de forbol que ocorrem naturalmente têm efeitos benéficos. Os ésteres de forbol isolados de *Jatropha gossypifolia* e dos frutos de *Ostodes paniculata*, por exemplo, são inibidores de tumores e possuem atividade antileucêmica contra a leucemia linfocítica P-388. Os isolados *Croton tiglium* inibem a replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e os efeitos citopáticos (CPEs). 20ng/mL de TPA, também, podem produzir alterações estruturais nos parasitas *Leishmania amazonenses*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*, além da atividade antimicrobacteriana observada em vários derivados de forbol (GOEL *et al.*, 2007).

A destoxificação da TSPM e a obtenção de sementes não tóxicas são os principais interesses com *J. curcas*, dada a crescente utilização desta espécie em estudos com dieta animal (BALDINI *et al.*, 2014). Para tanto, a determinação, quantificação e remoção das substâncias tóxicas, principalmente, dos ésteres de forbol, são essenciais para o consumo e aplicações de TSPM e ou outros derivados do pinhão-mansão.

### 2.5.1 Determinação de éster de forbol

Os métodos de isolamento dos ésteres de forbol envolvem derivatização de seus grupos funcionais, principalmente, acilação ou esterificação de grupos hidroxila por agentes químicos. Eles são, então, separados utilizando diferentes protocolos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A pureza dos ésteres isolados pode ser deduzida por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gás-líquido (GLC), espectrometria de massas (MS), ou HPLC com espectrometria de massa em tandem por ionização por eletropulverização (HPLC-MS-MS) (GOEL *et al.*, 2007).

A utilização de um método robusto e confiável, para determinação ésteres de forbol, é muito importante para o uso seguro de todo e qualquer componente de *J. curcas*. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com um detector de UV (HPLC-UV,  $\lambda = 280$  nm) tem sido relatada como um método bem estabelecido, para detectar e quantificar ésteres de forbol, em sementes de *Jatropha* spp., amêndoas, sêmolos e óleo (BALDINI *et al.*, 2014; DEVAPPA; BINGHAM; KHANAL, 2013; HAAS; STERK; MITTELBAACH, 2002; HE *et al.*, 2011; MAKKAR *et al.*, 2009). Os ésteres de forbol, também, podem ser determinados por cromatografia em camada delgada e espectrofotometria de massas (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2012), ou por HPLC/DAD ( $\lambda = 280$  nm) (BALDINI *et al.*, 2014). No entanto esses métodos demandam longo tempo de análise e consomem maior quantidade de solventes dispendiosos (DEVAPPA; BINGHAM; KHANAL, 2013; MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998; MAKKAR *et al.*, 2009).

A quantificação dos teores de éster de forbol, em outras matrizes, como as folhas de *J. curcas*, seria interessante, pois facilitaria a determinação do caráter tóxico ou não tóxico dos cultivares, economizando tempo. Além disso, a determinação de éster de forbol em tecidos animais permitiria avaliar se um animal, alimentado com éster de forbol, seria seguro ou não para consumo humano (BALDINI *et al.*, 2014).

No entanto a determinação de ésteres de forbol por HPLC-UV é inadequada para matrizes como folhas e tecidos animais, pela presença de substâncias interferentes que tornam difícil a identificação e quantificação dos ésteres. Um detector mais seletivo, como espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS), ou um procedimento analítico de purificação da amostra, resolveriam as limitações da detecção dos ésteres em outras matrizes, mas esta purificação pode ser demorada e ineficaz (BALDINI *et al.*, 2014). Este método (LC-MS/MS) já foi utilizado para determinação de éster de forbol em óleo de semente de *J. curcas* e amostras de fígado de cabra (LIU *et al.*, 2013; ICHIHASHI *et al.*, 2011).

Os tempos de retenção dos ésteres na coluna cromatográfica encontram-se entre 8-13 minutos. Os dois primeiros picos num cromatograma, geralmente, correspondem às estruturas dos fatores C1 e C2, o terceiro pico corresponde à estrutura dos fatores C3 ou C6 e o pico 5 diz respeito à estrutura dos fatores C4 e C5 (BALDINI *et al.*, 2014; DEVAPPA; BINGHAM; KHANAL, 2013; MAKKAR *et al.*, 2009). A estrutura dos fatores C3 ou C6 pode, ainda, ser atribuída ao pico 4 em uma coluna de fase reversa C8 (HAAS; STERK; MITTELBAACH, 2002). Liu e colaboradores (2013) utilizaram HPLC-UV acoplado à espectrometria de massas ( $\lambda = 280$  nm), com coluna de fase reversa C18 e relataram cinco picos bem separados e os atribuíram aos fatores de *Jatropha* C1, C2, C5, C3-C4 e C6, respectivamente.

Baldini e colaboradores (2014) avaliaram a concentração de éster de forbol ( $\mu\text{g/g}$ ) em sementes e folhas de *J. curcas* e fígado de cabra, determinados por HPLC-UV e LC-MS/MS e observaram que a detecção de ésteres de forbol com base nos espectros UV apresenta interferência de outros metabólitos coextraídos da amostra e eluídos no mesmo período de tempo que os ésteres de forbol. Como os padrões puros de éster de forbol comerciais não são facilmente adquiridos, os métodos preliminares de cromatografia e espectrometria de massas são, comumente, feitos com 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato, pela sua similaridade química (BALDINI *et al.*, 2014; DEVAPPA; BINGHAM; KHANAL, 2013; MAKKAR *et al.*, 2009).

O uso de espectrometria de massa em tandem por Devappa, Bingham e Khanal (2013) e Baldini *et al.*, (2014) resultou em maior seletividade e um limite de detecção inferior em relação ao método tradicional de identificação e quantificação de ésteres de forbol (HPLC-UV), para o qual o limite de detecção foi de 0,4-0,8  $\mu\text{g/g}$ .

Devappa, Bingham e Khanal (2013) utilizaram três diferentes métodos de extração de éster de forbol: extração por vórtex (método A), no qual as amostras maceradas com metanol e esferas de vidro sob agitação em vórtex; método de sonicação (método B), quando os grãos são pulverizados em pilão com nitrogênio líquido, liofilizados e sonicados por 30 minutos com metanol; e método de Soxhlet (método C), no qual a amostra é colocada numa unidade de extração Soxhlet ligada a um balão de fundo plano com metanol como solvente. Considerando o tempo, o consumo de solvente e a eficiência da extração de ésteres de forbol, o método A foi considerado o melhor, seguido do método C. A mais rápida identificação e quantificação dos ésteres de forbol foi realizada utilizando colunas mais curtas (20 e 50mm), com tempo de execução (<6 minutos) inferior aos 38 minutos do método de HPLC tradicional (MAKKAR; SIDDHURAJU; BECKER, 2007).

Pereira *et al* (2015) avaliaram a eficiência da extração de ésteres de forbol apenas com dióxido de carbono e a extração com dióxido de carbono e etanol, como cossolvente, em diferentes valores de temperaturas e pressão e concluíram que os extratos obtidos usando o cossolvente, a 70°C e 500 bar, durante 5 horas de extração, é a mais satisfatória, removendo 61% da concentração inicial de éster presente na torta.

## 2.6 Destoxificação via degradação de ésteres de forbol

A remoção dos ésteres de forbol das sementes de pinhão-mansão tem sido mediada por tratamentos de lavagem com solvente ou por biotransformação (por meio de fungos, leveduras ou bactérias) (AREGHEORE; BECKER; MAKKAR, 2003; BARROS *et al.*, 2011; HAAS; MITTELBAACH, 2000; JOSHI; MATHUR; KHARE, 2011; MAKKAR *et al.*, 2009).

Foram feitas tentativas de remoção de ésteres de forbol em TSPM usando tratamentos químicos com bicarbonato de sódio, etanol, metanol ou tratamento térmico, e ozonização, mas com pouca eficácia, removendo apenas 44 a 75% destes ésteres (GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014). A maioria dos métodos químicos e físicos utilizados para reduzir o teor de ésteres de forbol em TSPM envolvem combinações alcalinas, altas temperaturas e solventes (AREGHEORE; BECKER, K.; MAKKAR, 2003; MAKKAR *et al.*, 2009; MARTINEZ-HERRERA *et al.*, 2006), que podem entrar na lista de processos não amigáveis ao meio ambiente (HIDAYAT *et al.*, 2014).

O efeito do refino tradicional do óleo de semente de *J. curcas* sobre os teores de ésteres de forbol foi analisado durante cada passo do refino. A degomagem e a desodorização não apresentaram quase nenhum efeito sobre os teores de éster de forbol no óleo, no entanto a desacidificação e clareamento do óleo reduziram até 55% dos teores de ésteres de forbol (HAAS; MITTELBAACH, 2000).

Makkar e colaboradores (2009) encontraram certo grau de destoxificação durante a degomagem. Eles observaram a remoção de alguns ésteres de forbol nas gomas ácidas e na água de lavagem. O tratamento com sílica não diminuiu os ésteres de forbol, mas a desodorização a 260°C a 3 mbar de pressão com 1% de injeção de vapor degradou 100% dos ésteres de forbol no óleo de semente de pinhão-mansão.

O tratamento térmico, a 121°C por 30 minutos, de farelo de *J. curcas*, seguido de quatro lavagens com 92% de metanol, foi capaz de reduzir os ésteres de forbol para um nível tolerável, de 0,09 mg/g de farelo. Esta combinação de tratamento físico (temperatura) e químico (metanol) foi a que apresentou o melhor resultado de degradação de éster de forbol observada por

Aregheore, Becker e Makkar (2003), que investigaram tratamentos químicos, com diferentes concentrações de metanol, NaOH e NaOCl, após autoclavagem por 30 minutos.

A utilização de éter de petróleo e etanol (mistura de solventes) misturados, com tratamento químico utilizando 0,07% de NaHCO<sub>3</sub> é capaz de eliminar 95,8% de éster de forbol (MARTINEZ-HERRERA *et al.*, 2006). A redução de cerca de 89% de éster de forbol em TSPM submetida a um tratamento alcalino com solução aquosa de 2% de NaOH e 2% de Ca(OH)<sub>2</sub>, seguido por autoclavagem a 121°C por 30 minutos foi observada por Rakshit *et al* (2008). Devappa e Swamylingappa (2008) utilizaram a extração proteica a pH básico com precipitação isoelétrica e injeção de vapor como estratégia de destoxicação de *J. curcas* e obtiveram redução dos níveis de inibidores de tripsina, fitato, taninos e saponina em mais de 90% e níveis indetectáveis de ésteres de forbol.

A instabilidade dos ésteres de forbol e sua suscetibilidade à oxidação, hidrólise, transesterificação e epimerização levaram Gogoi, Niyogi e Tyagi (2014) a avaliar o efeito da radiação gama na degradação oxidativa dos ésteres de forbol em TSPM. O efeito de radiação sobre proteínas já foi estudado antes e esses autores apontam que níveis de radiação de 45 ou 59 kGy não têm efeito sobre o índice de eficiência proteica ou sobre as composições de aminoácidos das proteínas. A irradiação dos cereais com dose elevada pode, inclusive, melhorar o valor nutricional das proteínas, como ocorre em farelo de trigo, por exemplo, que quando irradiado com 50 kGy tem um aumento considerável na utilização de proteína líquida, de 36,0% para 40,3% (GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014).

Foram selecionadas doses de radiação na gama de 30 kGy a 125 kGy, para os testes de degradação de ésteres de forbol em TSPM. A quantidade de éster de forbol na torta não irradiada foi de 0,29 mg/g e reduziu 33,4% com radiação de 30 kGy; 78% com 50 kGy; 80,5% com 70 kGy, 92% com radiação de 100 kGy; e 97,6% irradiado com 125 kGy. O limite de 0,09 mg/g de éster de forbol (considerado atóxico) já pode ser alcançado com a exposição da torta a 50 kGy (GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014).

A presença de água aumenta a sensibilidade dos ésteres de forbol à radiação, então, a água foi utilizada como sensibilizante e sua concentração foi variada de 50% a 150% do peso total da torta (p/p). A degradação dos ésteres foi realmente facilitada pelo sensibilizador, aumentando a degradação dos ésteres de forbol de 33,4 para 45,6, 61,6 e 73,1% em tortas irradiadas com 30kGy, quando se adicionou 50, 100 e 150% (p/p) de água, respectivamente. Este processo ocorre graças à dissociação da molécula de água nos radicais livres H<sup>+</sup> e OH<sup>-</sup>, que iniciam a degradação dos ésteres (GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014).

A destoxificação de óleo de sementes de *J. curcas* por irradiação ultravioleta (UV) foi testada pela exposição do óleo sob uma lâmpada ultravioleta, durante 40 minutos a 25°C (por 10 vezes), entre os comprimentos de onda de 220 a 400 nm, seguido da lavagem com etanol a 65%, e incubação a 50°C com agitação constante durante 1 hora. Este estudo permitiu concluir que a combinação de irradiação UV e lavagem com etanol (65%) pode remover completamente os ésteres de forbol do óleo, melhorando, inclusive, suas qualidades (XIAO *et al.*, 2015).

A extração de ésteres de forbol utilizando solução aquosa de 80% de etanol ou metanol seguido por inativação de lectinas por tratamento térmico (66% de umidade, 121°C durante 30 minutos) foi eficiente, porém esses processos são demorados e não favoráveis ao ambiente (GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014), diferente dos tratamentos biológicos.

Tratamentos biológicos utilizando microrganismos são eficientes para reduzir substâncias tóxicas presentes em plantas, como: gossipol em farelo de sementes de algodão utilizando *Geotrichum candidum* (SUN; LIU; DU, 2008) e ricina em sementes de mamona por *Paecilomyces variotii* (MADEIRA; MACEDO; MACEDO, 2011). Os fungos de podridão branca (Basidiomicetos e alguns Ascomicetos) são conhecidos como destoxificadores de xenobióticos, polifenólicos e corantes sintéticos, por secretarem enzimas extracelulares capazes de agir sobre tais substâncias (ALBERTS *et al.* 2009).

O tratamento biológico de destoxificação de TSPM por meio do uso de microrganismos pode ser mais eficiente e gerar outros bioprodutos de maior valor agregado durante o processo, como enzimas, cogumelos comestíveis e insumos para nutrição animal (LUZ *et al.*, 2013).

Beluwe e Sam (2010) testaram a ação dos fungos *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma longibrachitum* sobre os ésteres de forbol em torta de semente de *J. curcas* e o *A. niger* mostrou-se eficiente na degradação dos ésteres de forbol, com uma taxa residual de éster de forbol de apenas 0,003 mg/g após sete dias de incubação, a menor taxa entre as TSPM tratadas.

Tratamento de torta de semente de *J. curcas* por incubação em estado sólido com fungos de podridão-branca foi capaz de promover a diminuição do teor de ésteres de forbol para níveis atóxicos (BARROS *et al.*, 2011). A utilização dos fungos de podridão-branca *Bjerkandera adusta*, *Ganoderma resinaceum* e *Phlebia rufa* foram estudados para fins de destoxificação de TSPM. *G. resinaceum* apenas reduziu os teores de éster de forbol de 0,8 para 0,6 mg/g, mas *B. adusta* e *P. rufa* reduziram os teores de ésteres de forbol para níveis não tóxicos em 30 dias de cultivo axênico, o que sugere que os fungos de podridão-branca podem ser potencialmente utilizados na destoxificação de TSPM (BARROS *et al.*, 2011).

Dez diferentes fungos de podridão branca: *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes hirsute*, *Trametes zonata*, *Trametes gibbosa* e *Trametes versicolor*, também, foram testados quanto à habilidade em degradar ésteres de forbol em TSPM. A fermentação reduziu os teores de éster de forbol de 1,072 mg/g da TSPM *in natura* (controle) até níveis indetectáveis, nas tortas fermentadas por *G. lucidum* e *T. zonata*. Os fungos do gênero *Pleurotus* spp. Testados, também, apresentaram degradação, reduzindo os ésteres de forbol em mais de 70%, nos 20 dias de ensaio (BOSE; KEHARIA, 2014).

Os macrofungos do gênero *Pleurotus* spp. são excelentes produtores de enzimas extracelulares e *P. ostreatus* foi testado para a degradação de éster de forbol em FES de torta de semente de *J. curcas* (Jc), Jc + 10% de serragem de eucalipto (JcEs), e Jc + 10% de casca de eucalipto (JcEb) por Luz e colaboradores (2014). Nos 15 primeiros dias, as concentrações de éster de forbol foram reduzidas para menos da metade e, em 45 dias, a degradação de éster de forbol foi de 100%, em todas as formulações. Os autores atribuíram esta degradação à capacidade do fungo em deslignificar a parede celular vegetal.

Os fungos não são os únicos microrganismos capazes de degradar os ésteres de forbol. O processo de FES de TSPM pela bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, estirpe PseA, foi descrito como eficiente na degradação completa dos ésteres de forbol, em apenas nove dias de cultivo. Após os três primeiros dias de fermentação, houve redução de 47% e 26% dos picos 1 e 2 de éster de forbol, registrados no cromatograma, respectivamente e, após 6 dias, foram observados 73% e 60% de redução (JOSHI; MATHUR; KHARE, 2011).

Diferentes espécies do gênero *Bacillus*, também, foram testadas por Chang e colaboradores (2014) para a degradação de ésteres de forbol em TSPM, por FES e submersa (FSM). Os teores de ésteres de forbol na torta de sementes reduziu 86,0%, 83,2% e 93,0% com *B. sonorensis* D12, *B. subtilis* H8 e *B. smithii* G16 durante 3 dias de FES, respectivamente, enquanto na FSM, os teores de redução de ésteres de forbol na TSPM foram de 76,5%, 77,1%, 78,4%, 85,5% e 92,0% com *B. smithii* G16, *B. sonorensis* D12, *B. licheniformis* A3, *B. subtilis* H8 e *B. coagulans* C45, durante 3 dias de incubação, respectivamente. No geral, as populações de *Bacillus* aumentaram à medida que os ésteres de forbol reduziam, indicando que estas substâncias podem ser usados para o crescimento destas bactérias.

Em outro estudo com *Bacillus* para degradação de substâncias tóxicas de TSPM demonstrou-se que *B. licheniformis* e *B. subtilis* podem degradar os ésteres de forbol em 60% e 40%, respectivamente, durante 5 dias de incubação. Neste período, *B. licheniformis* em FSM

reduziu as concentrações de ésteres de forbol em 62% (PHENGNUAM; SUNTORNSUK, 2013).

Além dos tratamentos de destoxificação supracitados, o tratamento enzimático pode ser uma alternativa interessante na degradação dos ésteres de forbol de *J. curcas*. Os microrganismos mencionados são excelentes produtores de enzima, principalmente, os fungos de podridão branca, e a degradação destes ésteres por fermentação microbiana sugere o papel das enzimas neste processo. A ligação éster entre a porção de forbol e o ácido graxo do éster de forbol pode, em tese, ser hidrolisada por lipases, mas os dados sobre a hidrólise enzimática de éster de forbol, ainda, são muito limitados (HIDAYAT *et al.*, 2014).

As sementes de *J. curcas* produzem lipases durante sua germinação. Hidayat e colaboradores (2014) revelaram que sementes com o teor de éster de forbol de 1,05 mg/g apresentam degradação total destes ésteres durante a germinação. Estes autores correlacionam esta degradação com a sua atividade de lipase, comprovando que as sementes germinadas na fase de crescimento 4 tem 2,8 vezes menos éster de forbol que a fase 3 e 15,2 vezes menos que a fase 2. Eles investigaram, ainda, a degradação de ésteres de forbol em TSPM incubadas com lipases isoladas de sementes, no estágio 4 de germinação, com diferentes valores de atividade enzimática e durante diferentes tempos de hidrólise. O teor de éster diminuiu 16,7 vezes ao se adicionar à menor quantidade de lipase avaliada (10U), chegando a um teor de éster de forbol de 0,06 mg/g, satisfazendo a exigência de uma TSPM não tóxica (HIDAYAT *et al.*, 2014). Na avaliação da influência do tempo de hidrólise por 19,17 U de lipase na degradação dos ésteres de forbol demonstrou-se que o teor de éster de forbol reduziu 7,5 vezes, nas primeiras 8 horas de hidrólise e 16 vezes em 20 horas. Em 12 horas de reação, o teor de éster de forbol na TSPM foi de 0,08 mg/g, considerado atóxica (<0,09 mg/g) (HIDAYAT *et al.*, 2014).

Os estudos de destoxificação por degradação enzimática de ésteres de forbol em TSPM são escassos e não há relatos de testes da eficácia da destoxificação com uso do material tratado em células ou animais (ensaios pré-clínicos de toxicidade *in vitro* e *in vivo*) ou na nutrição de animais (aves, suínos, peixes e ruminantes). Deste modo, faz-se necessário mais estudos para saber quais enzimas podem atuar no processo de degradação dos ésteres de forbol e como escalonar o processo de modo economicamente viável para inserção desta torta na alimentação animal.

### 3 INTEGRAÇÃO DAS CADEIAS PRODUTIVAS DO BIODIESEL E NUTRIÇÃO ANIMAL

A integração das cadeias de produção de biodiesel e ração animal é fundamentada, principalmente, com utilização de farelos de soja na alimentação de monogástricos e poligástricos e de farelos e tortas de algodão para caprinos e bovinos de corte e leiteiro.

Alguns fatores devem ser considerados para a escolha de um resíduo na alimentação animal, tais como as suas características nutricionais; a quantidade de resíduo disponível; a proximidade entre a fonte produtora e o local de consumo; os custos de transporte, condicionamento e armazenagem; e a presença de substâncias tóxicas e/ou antinutricionais (RODRIGUES; RONDINA, 2013).

A inclusão de microrganismos na nutrição animal tem sido um campo de estudo com várias finalidades, desde o aumento da digestibilidade e sanidade (pro e prebióticos), como agentes capazes de degradar as substâncias tóxicas ou antinutricionais presentes nos formulados de nutrição animal, como o fitato, por exemplo. Esta é uma estratégia promissora, no entanto os processos fermentativos ocorrem mais lentamente e, para tratamentos em larga escala, podem ser necessárias grandes áreas. Além disso, é necessário aprofundar-se no estudo da segurança do produto final, uma vez que estes microrganismos podem secretar substâncias nocivas, conferindo ao produto toxicidade semelhante ou superior à previamente apresentada pelo produto *in natura* (SINGH *et al.*, 2010). Nesse sentido, a utilização dos extratos enzimáticos dos microrganismos, em substituição ao uso do próprio microrganismo, tem sido uma alternativa mais segura e promissora.

Deste modo, as tortas de pinhão-manso e outras oleaginosas que contenham fatores tóxicos ou antinutricionais, quando submetidas ao processo de destoxificação, podem ser aproveitadas em cenários alternativos para os criadores de aves, suínos e peixes, desde que devidamente comprovados a segurança (testes toxicológicos), eficácia e a viabilidade econômica para o uso destas tortas (ANDRADE; NASCENTES; COSTA, 2013).

O apelo político para o uso deste tipo de estratégia de uso de biomassas está no cultivo sustentável, nas potencialidades do aproveitamento de resíduos lignocelulósicos e no fato de as oleaginosas locais serem fontes geradoras de emprego e renda para diversas regiões do Brasil. Ressalta-se que o biodiesel não depende somente do processo de inserção da agricultura e produção das oleaginosas, mas também da pecuária e criação de suínos, aves e peixes.

Assim como ocorre com a soja, que é a fonte proteica mais utilizada para nutrição animal e produção de Biodiesel no Brasil, outras plantas oleaginosas, como o pinhão-manso, podem

ser inseridas neste cenário. A construção e sucesso do programa brasileiro de biodiesel depende da estruturação de uma rede de oferta de óleo vegetal e agregação de valor aos coprodutos, em arranjos produtivos locais sustentáveis (QUIRINO *et al.*, 2013).

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHILASH, P. C.; *et al.* Revisited *Jatropha curcas* as an oil plant of multiple benefits: critical research needs and prospects for the future. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, p. 127–31, 2011.

ACHTEN, W. M. J.; *et al.* *Jatropha* biodiesel production and use. **Biomass and bioenergy**, n. 32, p.1063-1084, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETROLEO (BRASIL). **Boletim Mensal de Biodiesel**. Brasília, DF, novembro, 2016. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br> > Acesso em: 14 de janeiro de 2017.

ALBERTS, J. F.; *et al.* Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 47–52, 2009.

ANDRADE, F. P.; NASCENTES, C. C.; COSTA, L. M. Caracterização química de resíduos de biomassa da cadeia produtiva de biodiesel no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15, n.3, p.225-231, 2013.

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. **Journal of Natural Sciences**, v. 21, p. 50-56, 2003.

ARIZA-MONTOBBIO, P.; *et al.* The political ecology of *Jatropha* plantations for biodiesel in Tamil Nadu, India. **Journal of Peasant Studies**, v. 37, p. 875–97, 2010.

BALDINI, M.; *et al.* Determination of phorbol esters in seeds and leaves of *Jatropha curcas* and in animal tissue by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 268–276, 2014.

BALDINI, M.; RARANCIUC, S.; VISCHI, M. Toxicity of *Jatropha curcas* L. as a biofuel crop and options for management. **CAB Reviews**. v. 7, p. 1–13, 2012.

BARROS, C. J. **Prestes a completar dez anos, programa nacional de biodiesel falha em incluir semiárido**, Salvador 02 de junho de 2014. Disponível em <<http://reporterbrasil.org.br/2014/06/prestes-a-completar-dez-anos-programa-nacional-de-biodiesel-falha-em-incluir-camponeses/>> Acesso em 28 de fevereiro de 2017.

BARROS, C. R. M. de; *et al.* The potential of white-rot fungi to degrade phorbol esters of *Jatropha curcas* L. seed cake. **Engineering in Life Sciences**, v. 11, p. 107–110, 2011.

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

BELEWU, M. A.; SAM, R. Solid state fermentation of *Jatropha curcas* kernel cake: Proximate composition and antinutritional components. **Journal of Yeast and Fungal Research**. v. 1, n.3, p. 44-46, 2010.

BOSE, A.; KEHARIA, H. Phorbol ester degradation in *Jatropha* seed cake using white rot fungi. **Biotechnology**, n. 4, p. 447–450, 2014.

CAPDEVILLE, G.; LAVIOLA, B. G. **Pinhão-manso: insucesso ou erro de estratégia?**. Comunicado Técnico, 11 Set 2013.

CHANG, C-F.; *et al.* Phorbol esters degradation and enzyme production by *Bacillus* using *Jatropha* seed cake as substrate. **International Journal of Environmental Pollution and Remediation**, v. 2, n. 1, 2014.

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**, v. 7, p. 1001-1005, 2004.

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

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**, v. 92, p. 1519–1525, 2012.

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

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**, v. 88, n. 5, p. 911–919, 2008.

DIAS, L. A. S.; *et al.* Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível. **Universidade Federal de Viçosa**, 1. ed. Viçosa, MG, 2007.

DONLAPORN, S.; SUNTORNSUK, W. Toxic compound, anti-nutritional factors and functional properties of protein isolated from detoxified *Jatropha curcas* seed cake. **International Journal of Molecular Science**, v. 12, p. 66-77, 2011.

DRUMOND, M. A.; *et al.* Agronomic performance of different genotypes of physic nut in the semi-arid zone of Pernambuco state. **Ciência Rural**, v. 40, p. 44-47, 2010.

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

EDRISI, S. A.; *et al.* *Jatropha curcas* L.: A crucified plant waiting for resurgence. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 855–862, 2015.

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

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

GOEL, G.; *et al.* Phorbol Esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, 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**, v. 7, p. 305-309, 2014.

GOMES, T. G. **Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-manso por basidiomicetos e seu potencial como substrato para produção de enzimas de interesse industrial.** Dissertação - Universidade Federal do Tocantins, 2015.

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

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

HE, W.; *et al.* Analysis of seed phorbol-ester and curcumin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 1183-1190, 2011.

HIDAYAT, C.; *et al.* Enhancing indigenous lipase activity of germinated *Jatropha curcas* L. seeds for the enzymatic degradation of phorbol ester. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 71–76, 2014.

ICHIHASHI, K.; *et al.* Dynamic analysis of phorbol esters in the manufacturing process of fatty acid methyl esters from *Jatropha curcas* seed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 851–861, 2011.

INSANU, M.; *et al.* Rational use of *Jatropha curcas* L. in food and medicine: from toxicity problems to safe applications. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, p. 107–119, 2013.

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

KANT, P.; WU, S. The extraordinary collapse of *Jatropha* as a global biofuel. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 7114–5, 2011.

KASUYA, M. C. M.; *et al.* Bio-detoxification of *Jatropha* seed cake and its use in animal feed. Biodiesel- Feedstocks. **Production and Applications**. Cap. 11, p. 309-330, 2012.

KAUSHIK, N.; *et al.* Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. **Biomass and Bioenergy** v. 31, p. 497–502, 2007.

KING, A. J.; *et al.* Potential of *Jatropha curcas* as source of renewable oil and animal feed. **Journal Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 2897–905, 2009.

KOHLMEIER, M. Water-soluble vitamins and non-nutrients: inositol. In: Nutrient metabolism: structures, functions and genetics. **San Diego: Academic**, p. 634-642, 2003.

LAVIOLA, B. G.; *et al.* **The importance of *Jatropha* for Brazil.** In: CARELS, N.; SUJATHA, B.; BAHADUR, B. (Ed.). *Jatropha*, Challenges for a New Energy Crop. Springer, p. 71-94, 2012.

LIANG, J.; *et al.* Effect of soaking and phytase treatment on phytic acid, calcium, iron and zinc in rice fractions. **Food Chemistry**, v. 115, p. 789-794, 2009.

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**, v. 47, p. 29–32, 2013.

LIU, Z.; *et al.* Effect of wheat pearling on flour phytase activity, phytic acid, iron, and zinc content. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 521-527, 2008.

LUZ, J. M. R. da; *et al.* Bio-detoxification of *Jatropha curcas* seed cake by *Pleurotus ostreatus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 11, p. 1148-1156, 2014.

LUZ, J. M. R. da; *et al.* Production of edible mushroom and degradation of antinutritional factors in *Jatropha* biodiesel residues. **Food Science and Technology**, v. 50, p. 575-580, 2013.

MADEIRA, J. V. Jr.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7343–7348, 2011.

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

MAKKAR, H. P. S.; 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. ***Jatropha curcas* toxicity: identification of toxic principle(s).** In: 5<sup>th</sup> International symposium on poisonous plants. May 19 -23, San Angelo, Texas, USA, 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**, v. 86, p. 173–181, 2009.

MAKKAR, H. P. S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. A Laboratory Manual on Quantification of Plant Secondary Metabolites. **Humana Press**, New Jersey, p. 101–105, 2007.

MARTINEZ-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**, v. 96, p. 80–89, 2006.

MENDONÇA, S.; RIBEIRO, J. A. A. **Desafios na destoxificação da torta de pinhão-mansão.** In: RODRIGUES, C.; ABDELNUR, P. V. Destoxificação e aproveitamento das tortas de

pinhão-manso e mamona: perspectivas em pesquisa, desenvolvimento e inovação. Série Documentos, Brasília-DF, 2013.

MENDONÇA, S. Toxidez do pinhão-manso. **Biodiesel BR**, n. 17, p. 59, 61, jun./jul. 2010.

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

PEREIRA, C. S. S.; *et al.* Extração supercrítica dos ésteres de forbol da torta de *Jatropha curcas*: avaliação preliminar do uso do etanol como co-solvente. **Revista Teccen**, v. 08, n. 2, p. 37-43, 2015.

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

PRAKASH, A. R.; *et al.* **Floral biology and flowering behaviour of *Jatropha curcas***. In: FACT seminar on *Jatropha curcas* L. agronomy and genetics, Wageningen, The Netherlands, March 26–28. Wageningen: FACT Foundation; 2007.

QUIRINO, B. F.; *et al.* **Critical analysis of feedstock availability and composition, and new potential resources for biodiesel production in Brazil**. In: Biofuels in Brazil - Fundamental Aspects, Recent Developments, and Future Perspectives, 2013.

RADHAKRISHNA, P. **Contribution of de-oiled cakes in carbono sequestration and as a source of energy, in Indian agriculture need for a policy initiative**. In: Proceedings of the fourth international biofuels conference, New Delhi, India, February 1–2. New Delhi: Winrock International India; p. 65–70, 2007.

RAKSHIT, K. D.; *et al.* Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3621–3625, 2008.

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

ROCHA, R. B.; *et al.* Selection efficiency for increasing physic nut oil content. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 44 50, 2012.

RODRIGUES, F. V.; RONDINA, D. Alternativas de uso de subprodutos da cadeia do biodiesel na alimentação de ruminantes: glicerina bruta. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p.91-99, 2013.

SABANDAR, C. W.; *et al.* Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): a review. **Phytochemistry**, v. 85, p. 7–29, 2013.

SALE, N. A. C. ; DEWES, H. Opportunities and challenges for the international trade of *Jatropha curcas*-derived biofuel from developing countries. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 515–23, 2009.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 135, p. 1–41, 2007.

SHANKER, C.; DHYANI, S. K. Insect pests of *Jatropha curcas* L. and the potential for their management. **Current Science**, v. 91, p.162–3, 2006.

SHIMOYAMADA, M.; *et al.* Effects of soybean saponins on chymotryptic hydrolyses of soybean proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 46, n. 12, p. 4793-4797, 1998.

SINGH, S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 200–216, 2010.

SINGH, M. P.; *et al.* Fermentative production of self-toxic fungal metabolites. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v. 37, n. 4, p. 335-340, 2010.

STAUBMANN, R.; *et al.* A complex of 5-hydroxypyrrrolidin-2-one and pyrimidine-2,4-dione isolated from *Jatropha curcas*. **Phytochemistry**, v.50, n. 2, p. 337–338, 1998.

SUN, Z. T.; LIU, C.; DU, J. H. Optimisation of fermentation medium for the detoxification of free gossypol in cottonseed powder by *Geotrichum candidum* G07 in solid-state fermentation with response surface methodology. **Annals of Microbiology**, v. 58, p. 683–690, 2008.

XIAO, Jh.; *et al.* Detoxification of *Jatropha curcas* oil by ultraviolet irradiation combined with ethanol washing. **Grasas y Aceites**, v. 66, n. 1, p. 1-8, 2015.

ZANZI, R.; PEREZ, J. A. S.; SOLER, P. B. **Production of biodiesel from *Jatropha curcas* in the region of Guantamo in Cuba**. In: Proceedings of the 3rd international congress university-industry cooperation, Ubatuba, Brazil, 2008.

## CAPÍTULO II

**PROCESSO DE DESTOXIFICAÇÃO DA TORTA DA SEMENTE  
DE *Jatropha curcas* L. (PINHÃO-MANSO) UTILIZANDO ENZIMAS  
EXTRACELULARES DE MACROFUNGOS**

**PROCESS OF DETOXIFICATION OF *Jatropha curcas* L. SEED  
CAKE (PINHÃO-MANSO) USING MACROFUNGAL  
EXTRACELLULAR ENZYMES**

## 1 INTRODUÇÃO

*Jatropha curcas* L. (pinhão-manso) é uma espécie de planta tropical e subtropical que tem considerável atenção como uma potencial matéria-prima para a produção de biodiesel, por meio da extração do óleo de suas sementes (ABHILASH *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2010). Algumas características têm sido elencadas como vantagens para o cultivo desta oleaginosa para fins de composição da matriz de biocombustíveis, tais como: tolerância à seca, crescimento rápido, fácil propagação, pequeno período de gestação e maior teor de óleo (ACHTEN *et al.*, 2008).

O cultivo de *J. curcas* despertou muito interesse por parte de alguns países como Índia, Malásia, China e Tailândia, por ser uma alternativa à composição da matriz energética, a ponto de ser inserido em programas de biodiesel (ABHILASH *et al.*, 2011). Entretanto há questões a serem trabalhadas para que esta cultura se torne uma realidade agrícola de países tropicais. Capdeville e Laviola (2013) descrevem que o conhecimento agrônomo sobre a planta ainda está em fase inicial, pois a cultura é perene e, assim, as análises de produtividade, sanidade, métodos de colheita, entre outros, são postuladas após cinco anos de cultura estabelecida. Outras questões, também, devem ser levadas em consideração, como os aspectos ambientais, pela inserção de plantas em ambientes não naturais; econômicos, como a destinação do óleo e dos coprodutos; e toxicológicos, quanto ao melhoramento genético para obtenção de acessos com menores teores de ésteres de forbol (ABHILASH *et al.*, 2011).

A maioria dos acessos conhecidos de *J. curcas* geram sementes com substâncias tóxicas, como os ésteres de forbol, que causam graves problemas de saúde pública e animal associadas a quadros de intoxicação alimentar, tais como irritação da pele, efeitos purgativos e morte (HONORATO *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2012; MENDONÇA e LAVIOLA, 2009). Os ésteres de forbol contidos nas sementes desta planta podem atuar como agentes cocancerígenos ou promotores de tumor (GOEL *et al.*, 2007). O uso das tortas ou farelos de sementes oleaginosas para nutrição animal é de fundamental importância para a viabilidade econômica e manutenção de culturas de plantas oleaginosas, como a soja, por exemplo. Deste modo, para que a cultura do pinhão-manso tenha maior aceitação, faz-se necessário o aproveitamento da torta ou farelo de suas sementes. O resíduo da semente atende os valores nutricionais exigidos como matéria-prima para o desenvolvimento de formulações empregadas em rações animais, desde que os fatores tóxicos e antinutricionais sejam eliminados (KING *et al.*, 2009).

A torta de semente de pinhão-manso (TSPM) pode representar, dependendo do método de extração, até 50% do peso total das sementes, com valor energético de 18,2 MJ/kg e teores

de proteína bruta de até 58,1%, com todos os aminoácidos essenciais, com exceção da lisina (FRANCIS; EDINGER; BECKER, 2005). O destino da TSPM, na maioria das vezes, ainda, é o de fertilizante orgânico, em função das dificuldades impostas em processos de destoxificação confiáveis e economicamente viáveis.

As estratégias para redução ou degradação dos ésteres de forbol nos acessos tóxicos de *J. curcas* têm sido desde melhoramento genético clássico e molecular até os tratamentos físicos, químicos, biológicos ou combinados nas TSPM. As análises moleculares visam identificar os genes responsáveis pela produção de substâncias tóxicas e seus mecanismos de bloqueio no genoma de *J. curcas*. Os tratamentos físicos de destoxificação de TSPM são baseados, geralmente, no calor ou radiação; os químicos são basicamente extrações com solventes orgânicos ou álcoois de cadeias curtas, como etanol e metanol; e os tratamentos biológicos são, em sua maioria, por cultivo de fungos, leveduras ou bactérias (*Bacillus* spp. ou *Pseudomonas* spp.) (KING *et al.*, 2009).

A destoxificação lança mão de cultivos microbianos tanto por fermentação em estado sólido (FES) como por fermentação submersa (FSM) para degradar substâncias tóxicas (BELEWU; SAM, 2010; GOEL *et al.*, 2007; JOSHI; MATHUR; KHARE, 2011; KUMAR; SHARMA, 2008; SAETAE; SUNTORNSUK, 2011). Os fungos do filo Basidiomycota e alguns do filo Ascomycota, conhecidos como fungos da podridão branca (ou do inglês “*White rot fungi*” - WRF), ou simplesmente como macrofungos, têm ganhado relevância dentro do cenário de destoxificação biológica de TSPM. (BARROS *et al.*, 2011; BELUWE; SAM, 2010; BOSE; KEHARIA, 2014; GOMES, 2015; JOSHI; MATHUR; KHARE, 2011; KASUYA *et al.*, 2012; LUZ *et al.*, 2014; LUZ *et al.*, 2013).

Os macrofungos são conhecidos na área de biorremediação como excelentes agentes destoxificadores, na degradação de compostos organofosforados e substâncias fenólicas de água residual da indústria têxtil (corantes), bem como na biossorção de metais pesados. Estes microrganismos são produtores naturais de enzimas extracelulares oxidativas, hidrolíticas, proteolíticas, lipolíticas, entre outras. Em trabalhos recentes demonstram-se atividades para algumas enzimas, durante o cultivo dos macrofungos em TSPM, como xilanases, celulases, pectinases, lipases, proteases, manganês peroxidases (MnP) e lacases e sugerem-se que estas podem ser responsáveis pela degradação dos ésteres de forbol (CHANG *et al.*, 2014, GOMES, 2015; HIDAYAT *et al.*, 2014; JOSHI; KARE, 2011; XIAO *et al.*, 2011). Entretanto não há, até o momento, nenhum trabalho publicado relatando o efeito direto das enzimas extracelulares dos macrofungos sobre TSPM.

A utilização destas enzimas em substituição aos microrganismos seria uma alternativa, uma vez que é possível superexpressá-las em microrganismos tais como leveduras (*Pichia pastoris*). Mas, faz-se necessário saber qual ou quais enzimas estão envolvidas na via bioquímica dos macrofungos capazes de degradar os ésteres de forbol. Deste modo, este trabalho teve como objetivo utilizar enzimas extracelulares de macrofungos no processo de destoxificação, por meio da degradação dos ésteres de forbol presentes em TSPM.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismos

Os macrofungos utilizados neste trabalho fazem parte da Coleção de Microrganismos e Microalgas aplicados à biorrefinaria da Embrapa Agrogenia, Brasília, Distrito Federal. Eles foram identificados por morfologia clássica. São eles: *Grifola frondosa* CC028 (F1), *Pannus lecomtei* CC040 (F2), *Fistulina hepatica* CC102 (F3), *Pleurotus sapidus* CC110 (F4), *Pleurotus ferulae* CC111 (F5), *Trametes versicolor* CC124 (F6), *Pleurotus pulmonarius* CC154 (F7), *Coprinus comatus* CC159 (F8), *Pleurotus florida* CC335 (F9), *Ganoderma lucidum* CC351 (F10), *Pleurotus eryngii* CC353 (F11), *Pleurotus ostreatus* CC389 (F12), *Pleurotus ostreatus* CC403 (F13), *Pleurotus citrinopileatus* CC416 (F14), *Pleurotus* ssp. CC420 (F15), *Amylosporus* spp. EF016 (F16) e *Pleurotus pulmonarius* EF88 (F17). Estes macrofungos foram escolhidos com base em trabalhos prévios já realizados na Embrapa Agroenergia (Brasília DF) (GOMES, 2015; ARAUJO, 2017, ainda não publicados). Os macrofungos foram repicados em placas de petri com meio Ágar Batata Dextrose (BDA) e incubados em estufa a 28°C, para crescimento e obtenção de massa micelial para obtenção do inóculo.

### 2.2 Extrato bruto enzimático de macrofungos por fermentação submersa (EBE-FSM)

O meio de cultura foi preparado em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL com 2,5g de TSPM (massa seca) e 50mL de água destilada. O material foi preparado em triplicata para o cultivo de cada macrofungo e autoclavado a 121°C, 1 atm de pressão, por 20 minutos. A inoculação foi conduzida por meio de discos contendo os micélios dos macrofungos. Cinco discos miceliais de 8mm de diâmetro foram transferidos para cada frasco. Os frascos foram incubados, sem agitação, a 28°C, por sete dias em estufas com circulação de ar forçada. Os extratos brutos (enzimas extracelulares) foram obtidos por meio de filtração utilizando gaze de fio de algodão e funil de Buchner, em tubos Falcons de 50 mL estéreis, que foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm. Os sobrenadantes do processo de centrifugação foram

considerados como extratos brutos enzimáticos da fermentação submersa (EBE-FSM). Os extratos brutos foram utilizados no processo de destoxificação por meio de degradação dos ésteres de forbol contidos em TSPM. Os EBE-FSM não utilizados de imediato no processo de destoxificação foram acrescidos de 0,02% de azida sódica e acondicionados a 4°C.

### **2.3 Extrato bruto enzimático de macrofungos por fermentação em estado sólido (EBE-FES)**

O meio de cultura foi preparado em frascos tipo Erlenmeyer de 50mL com 10g de TSPM (massa seca) e 23,3mL de água destilada (70% de umidade). O material foi preparado em triplicata para o cultivo de cada macrofungo e autoclavado a 121°C, 1 atm de pressão, por 20 minutos. A inoculação foi conduzida por meio de discos contendo os micélios dos macrofungos. Oito discos miceliais de 8 mm de diâmetro foram transferidos para cada frasco. Os frascos foram incubados a 28°C, em estufas com circulação de ar forçada, até a colonização total do substrato pelo fungo. Para a obtenção dos extratos brutos (enzimas extracelulares), os conteúdos dos frascos foram transferidos para frascos Erlenmeyer estéreis de 250 mL, que foram acrescidos de 40 mL de triton X-100 a 1% e incubados em shaker a 4°C e 180 rpm, por 40 minutos. O material foi, então, filtrado utilizando gaze de fio de algodão e funil de Buchner, em tubos Falcon de 50 mL estéreis, que foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm. Os sobrenadantes do processo de centrifugação foram considerados como extratos brutos enzimáticos da fermentação em estado sólido (EBE-FES). Os extratos brutos foram utilizados no processo de destoxificação por meio da degradação dos ésteres de forbol contidos em TSPM. Os EBE-FES não utilizados de imediato no processo de destoxificação foram acrescidos de 0,02% de azida sódica e acondicionados a 4°C.

### **2.4 Destoxificação enzimática de TSPM por meio de degradação de ésteres de forbol**

Os ensaios foram realizados em tubos Falcon de 50 mL, com 1 g de TSPM autoclavada com 1mL de água destilada, acrescidos de 5 mL dos EBE-FSM ou EBE-FES e 0,02% de azida sódica, para evitar contaminação microbiana. Os EBE-FSM ou EBE-FES foram incubados a 37°C por 72 h, a 230 rpm de agitação. Os controles foram feitos utilizando água destilada autoclavada no lugar dos extratos enzimáticos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.5 Extração dos ésteres de forbol**

Após as 72 horas de incubação, os tubos Falcon foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm e as TSPM utilizadas nos ensaios com EBE-FSM ou EBE-FES foram

transferidas dos tubos Falcon para placas de petri para secagem a 60°C. Depois de secas, as TSPM dos ensaios foram trituradas utilizando pistilos em gral e transferidas para tubos Falcon novos. Os frascos com as TSPM trituradas foram acrescidos de 15 mL de metanol, macerados com bastões de teflon por 1 minuto, sonicados por 3 minutos em banho de gelo e centrifugadas a 8000 rpm por 8 minutos à temperatura ambiente. O procedimento foi repetido três vezes, reunindo-se os sobrenadantes em balões de fundo redondo de 100 mL. O metanol foi removido por rotaevaporação a 40°C e sob pressão de 100 mbar. Os resíduos foram ressuspensos com metanol e estes extratos metanólicos foram transferidos para tubos Falcon de 5 mL e armazenados a -20°C até o momento da quantificação dos ésteres de forbol.

## **2.6 Quantificação dos ésteres de forbol**

Os extratos metanólicos de cada ensaio de destoxicação foram descongelados, agitados vigorosamente e 1,2 mL destes foram transferidos para microtubos de 1,5 mL. Os microtubos foram centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos, a 8°C e 1 mL destes foi transferido para vials de 2 mL. A quantificação dos ésteres extraídos foi realizada em cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC), marca Waters, modelo Acquity I-Class, composto por bomba binária, autoamostrador, detector PDA e MS e forno de colunas, acoplado a espectrômetro de massas, marca Waters, modelo Xevo TQD, Coluna marca Waters, modelo Acquity HSS T3 (150 x 2.1 mm, 1.8 µm), com pré-coluna modelo VanGuard Acquity HSS T3 (5 x 2.1 mm, 1.8 µm), mantidas a 45°C em modo gradiente de eluição, sendo o solvente Fase A = água/ácido fórmico 100/0,1 (V/V) e Fase B = acetonitrila/metanol/ácido fórmico 70/30/0,1 (V/V); vazão = 0,4 mL/min; iniciando-se com 70% Fase B, aumentando linearmente em 10 minutos para 100% de B, mantendo 100% de B por 1 minuto e reequilibrando nas condições iniciais por 4 minutos. A detecção ocorreu em  $\lambda$  280 nm, e as condições do MS foram: Capillary 3.50 kV; Desolvation Temp 350°C; Desolvation Gas 650 L/h; Cone Gas 20 L/h; MRM 693.5>293.0, Cone 30V, Collision 20V.

## **2.7 Determinação de proteínas solúveis totais nos EBE-FSM ou EBE-FES**

As proteínas solúveis totais nos extratos foram determinadas pelo método BCA (ácido bicinconínico) na razão de 1:8. Neste processo, 25 µL dos extratos enzimáticos são misturados a 200µL do reagente de trabalho (RT), que consiste de 50 partes do reagente A e 1 parte do reagente B, do kit de detecção. As amostras foram diluídas 5 vezes em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 mol/L pH 5. Uma curva de diluição foi feita, variando-se as concentrações de proteínas com água destilada, obtendo-se 8 pontos num gráfico de regressão

linear e, a partir da equação da reta obtida, pode-se calcular a concentração de proteínas solúveis totais em mg de proteínas por mL de extrato (mg/mL).

## 2.8 Determinação de atividades enzimáticas nos EBE-FSM ou EBE-FES

Todos os extratos enzimáticos foram avaliados quanto ao teor de proteínas totais e atividade de lacase. As atividades de peroxidases totais, manganês peroxidase, lipase, esterase, xilanase, CMCCase, FPase, protease e beta-glicosidase foram avaliadas apenas nos extratos que apresentaram bons resultados de destoxificação.

### 2.8.1 Lacase

A atividade de lacase foi determinada pela reação de 180  $\mu\text{L}$  do extrato diluído em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5, na proporção de 1:1 (v:v) com 40  $\mu\text{L}$  de ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) 5 mM. A mistura reacional para ABTS continha 0,45 mM do ABTS, 90 mM de tampão acetato de sódio pH 5,0, e 1 mL de amostra diluída 10 vezes com água destilada. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da absorbância em 420 nm, durante 90 segundos à 25°C.

$$\Delta\text{Abs} \times 10^6 = \text{Enzima (U/L)}$$

$$\epsilon \times R \times T$$

em que:

$\Delta\text{Abs}$  = valor de absorbância,

$\epsilon$  = Lacase: 36000  $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,

R = volume (mL) do sobrenadante,

T = Tempo de reação (min).

### 2.8.2 Peroxidases totais e manganês peroxidase

As atividades das peroxidases totais foram determinadas tal qual a atividade de lacase, mudando apenas a quantidade de extrato enzimático, de 180 para 140  $\mu\text{L}$  e adicionando 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM à mistura reacional. A reação, também, foi revelada pelo ABTS e a leitura feita a 420 nm. A atividade de manganês peroxidase foi determinada pelo método proposto por Kuwahara *et al.* (1984). A mistura reacional consistiu de 50 mg/mL de vermelho de fenol, 50 mM de sulfato de manganês, 50 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 12,5 mM de lactato de sódio, 500 mg/mL de albumina bovina e tampão succinato de sódio pH 4,5, sendo adicionados 0,5 mL do extrato. Após 5 minutos a 30°C, a reação foi interrompida pela adição de 40 mL de NaOH, 2 M. A

formação do produto de oxidação foi quantificada pela variação da absorbância (610 nm). O cálculo das atividades de manganês peroxidase e das outras peroxidases (totais) é o mesmo feito para lacase (GOMES, 2015).

### **2.8.3 CMCase, xilanase e FPase**

Os ensaios enzimáticos para determinação de CMCase (endoglicanase) e xilanase presentes nos extratos foram realizados adicionando-se, em tubos de ensaio, 50  $\mu$ L de extrato e 100  $\mu$ L de solução de 1 % dos substratos (carboximetilcelulose e xilana). Os tubos foram incubados por 30 minutos a 50°C. Após este tempo, foram adicionados 300  $\mu$ L de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), preparado segundo Ghose (1987) e os tubos com os ensaios foram fervidos por 10 minutos. Adicionaram -se 1,5 mL de água para leitura do ensaio no espectrofotômetro a 540 nm. Para o ensaio de FPase (celulases totais), foi utilizado como substrato papel Whatman número 1 em forma de discos de 7 mm de diâmetro e 20  $\mu$ L de extrato, que foram incubadas por 1 hora a 50°C. O ensaio de FPase foi interrompido e analisado como descrito acima para CMCase, com DSN e fervura. Para determinação da quantidade de açúcar redutor liberado, durante os ensaios enzimáticos, foram construídas as curvas de calibração com os monossacarídeos que formam as cadeias principais dos respectivos polissacarídeos. Para a calibração foi utilizada uma solução estoque de 2 mg/mL para cada açúcar redutor quantificado pelo método DNS, originalmente proposto por Miller (1959) e modificado por Ghose (1987) (GUSAKOV; KONDRATYEVA; SINITSYN, 2011). Uma curva de diluição foi feita variando as concentrações de açúcar redutor com água destilada, obtendo-se 5 pontos num gráfico de regressão linear e a partir da equação da reta obtida pelo método DNS. Para todos os ensaios enzimáticos, foi utilizado U/mL como unidade de açúcar redutor liberada durante todo o tempo do ensaio enzimático. Unidade internacional (U) representa a quantidade que a enzima necessita para liberar 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto (GHOSE,1987; GUSAKOV; KONDRATYEVA; SINITSYN, 2011).

### **2.8.4 Proteases**

A determinação das atividades proteolíticas foi realizada de acordo com o protocolo de Charney e Tomarelli (1947) com adaptações. Os ensaios, para proteases presentes no extrato, ocorreram em microtubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 250  $\mu$ L do extrato bruto enzimático, 250  $\mu$ L de azocaseína, incubados em banho-maria a 37°C por 40 minutos. Após o término da incubação, a reação foi paralisada com TCA (ácido tricloroacético). No preparo do

branco da amostra, para que não haja reação enzimática, o TCA é adicionado antes do extrato enzimático. Para o branco do aparelho, adicionaram-se 125 µL de azocaseína, 125µL de tampão acetato de sódio pH 5. As amostras foram centrifugadas a 6000 rpm, por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos limpos, então, adicionaram -se 250 µL de KOH 0,5M. A leitura em espectrofotômetro foi conduzida a 430 nm. Para o cálculo da atividade de protease foi utilizada a fórmula:

$$X = ((\text{Abs}/0,001) \times t \times V \text{ extrato} \times V \text{ E.C}) \times \text{Volume total do ensaio}$$

em que:

Abs = Absorbância ensaio - Absorbância branco,

t = tempo em minutos no banho-maria,

V = volume,

E.C = ensaio colorimétrico.

### 2.8.5 Lipases e esterases

A determinação da atividade de lipases e esterases foi feita por método titulométrico de acordo com protocolo de Diaz *et al.* (2006). O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis na reação de hidrólise. Para os ensaios enzimáticos foi feita uma emulsão com 2,5 mmol/L de tampão Tris-HCL pH 7,0; 150 mmol/L de NaCl; 2mmol/L de CaCl<sub>2</sub>; 3% de goma arábica e o triacilglicerol (substrato da enzima). Para determinação de lipases usou-se como substrato óleo de oliva (66mmol/L) e tributirina (66mmol/L) para o ensaio enzimático de esterases (GOMES, 2015).

## 2.9 Análises estatísticas

Os dados de atividades enzimáticas foram expressos como a média ± E.P.M. (erro padrão da média), e os grupos foram comparados utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey (p<0,5; p<0,05 e p<0,01), utilizando software estatístico Statística versão 12 (Statsoft, Tulsa, EUA). A correlação entre as atividades de lacase e teores de proteínas solúveis totais e a taxa de degradação dos ésteres de forbol foi feita pelos coeficientes de correlação de Spearman, com p<0,05.

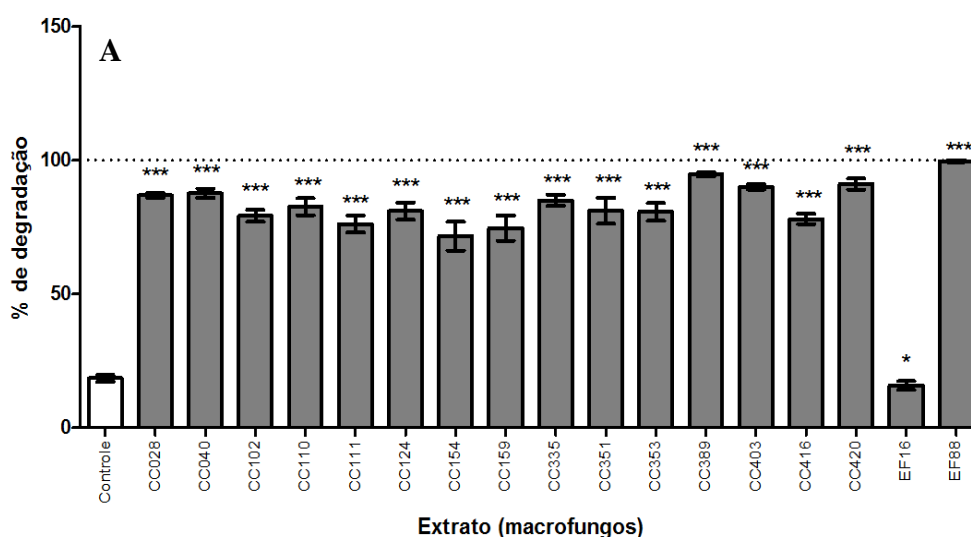
Estes mesmos parâmetros foram submetidos a um tratamento antes da análise estatística e foram convertidos por  $\log_{10}(x + 1)$ . Os dados transformados foram submetidos a estatísticas multivariadas por métodos não supervisionados, Análise de Componentes Principais (PCA), realizado em software Canoco 4.5 (Biometris-Plant Research International, Wageningen,

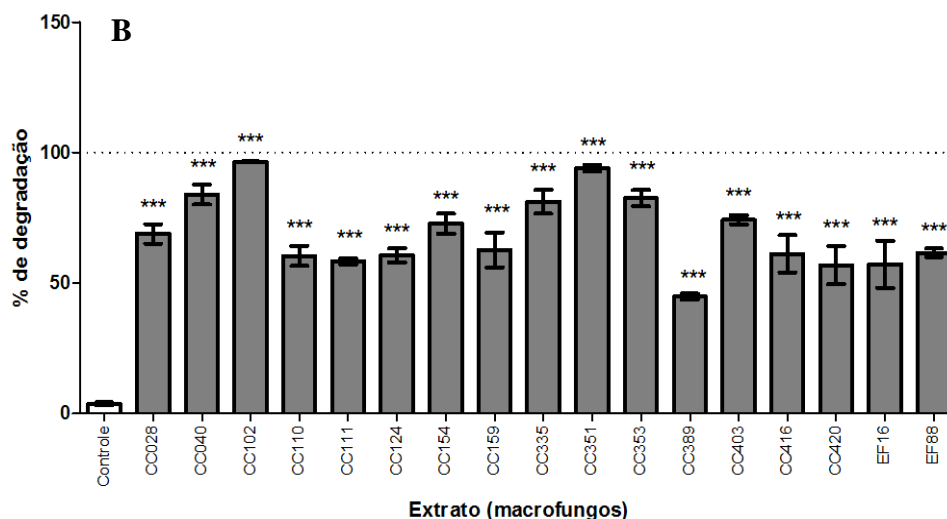
NLD). A relação entre os diferentes métodos avaliados para propor clusters de acordo com a similaridade entre os parâmetros avaliados foi obtida por relação entre os parâmetros avaliados e os métodos foram determinados por análise exploratória por PCA.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A TSPM *in natura* apresentava 2,1mg de éster de forbol por grama de torta, e a autoclavagem (controle) resultou numa redução de 18% dos ésteres de forbol na torta. Luz *et al.* (2014) e Kasuya *et al.* (2012) relataram uma redução, em média, de 20% do teor de éster de forbol, após a autoclavagem da torta de semente de *J. curcas*. Entretanto Aregheore, Becker e Makkar (2003) não observaram degradação desta substância durante a autoclavagem ou no tratamento térmico a 160°C por 30 minutos.

O melhor resultado de degradação de ésteres de forbol foi observado, ao se utilizar o extrato de cultivo submerso do F17 (*P. pulmonarius* EF88), seguido dos extratos de cultivo sólido dos macrofungos F3 (*F. hepática* CC102) e F10 (*G. lucidum* CC351), com 98 e 96% de degradação, respectivamente. No geral, a degradação dos ésteres de forbol foi mais eficiente pelos extratos de cultivo submerso que pelos extratos de cultivo sólido, com 12 dos 17 extratos, com taxas de degradação iguais ou superiores a 80%, contra apenas 8 entre os extratos de fermentação em estado sólido (FES) (Figura 1).





**Gráfico 1.** Gráfico sobre as taxas de degradação de éster de forbol em TSPM tratadas com extratos brutos enzimáticos resultantes da FSM (A) e da FES (B) de TSPM pelos fungos de podridão-branca selecionados. CC028 (*G. frondosa*) F1, CC040 (*P. lecomtei*) F2, CC102 (*F. hepatica*) F3, CC110 (*P. sapidus*) F4, CC111 (*P. ferulae*) F5, CC124 (*T. versicolor*) F6, CC154 (*P. pulmonarius*) F7, CC159 (*C. comatus*) F8, CC335 (*P. florida*) F9, CC351 (*G. lucidum*) F10, CC353 (*P. eryngii*) F11, CC389 (*P. ostreatus*) F12, CC403 (*P. ostreatus*) F13, CC416 (*P. citrinopileatus*) F14, CC420 (*Pleurotus* spp.) F15, EF16 (*Amylospor* sp.) F16 e EF88 (*P. pulmonarius*) F17. Foi realizada análise de variância ANOVA, teste a posteriori de Tukey. Diferença estatisticamente significativa com p-valor = \*0,5; \*\*0,1; e \*\*\*0,05; em relação ao controle.

Esta diferença entre os potenciais de degradação pode ter ocorrido em decorrência da concentração de água no substrato (FES e FSM) e da diferença nos tempos de crescimento dos fungos, para a obtenção dos extratos. Os cultivos submersos foram conduzidos por apenas 7 dias, enquanto as fermentações em estado sólido foram mantidas pelo tempo necessário para a colonização total do substrato pelos fungos, que foi de 7 dias para o CC040, 9 para EF16, CC124, CC159, CC335, CC351 e CC403, 10 dias para o CC111, 11 dias para o crescimento de EF88, CC028, CC102 e CC389, 12 dias para CC353, 13 para CC154, 14 dias para CC110, 15 para CC420 e 31 dias para CC416. O *Amylospor* spp. EF16 não apresentou crescimento em 7 dias de cultivo submerso e, por este motivo, o extrato de cultivo submerso deste fungo não apresentou atividade na degradação de ésteres de forbol. Este mesmo isolado colonizou apenas a metade da TSPM com 70% de umidade, em até 40 dias de incubação, apresentando, também, uma porcentagem de degradação relativamente baixa.

A composição química de *J. curcas* é relatada como apropriada para promover um bom crescimento microbiano, apesar de suas toxinas (JOSHI; MATHUR; KHARE, 2011). Barros *et al.* (2011), ao estudarem a degradação de ésteres de forbol por fungos de podridão-branca, concluíram que eles podem ser utilizados como uma possível abordagem para o tratamento biológico de tortas oleaginosas.

Entre os extratos das fermentações submersas de TSPM, os extratos dos fungos do gênero *Pleurotus* se destacaram quanto à eficiência em degradar os ésteres de forbol, em 72 horas. Os melhores resultados destes extratos foram do F17 (*P. pulmonarius* EF88), F12 e F13 (*P. ostreatus* CC389 e CC403) e do F15 (*Pleurotus* ssp. CC420), com redução de 100, 94,6, 90,7 e 90,3% dos ésteres de forbol, respectivamente. Os três últimos deixaram teores residuais de éster de forbol de 0,113, 0,197 e 0,206 mg/g, respectivamente, não resultando em TSPM destoxificada. Os extratos de cultivo sólido destes fungos não apresentaram resultados tão bons, com apenas 75,6, 65,0, 83,6 e 68,2% de degradação dos ésteres de forbol, resultando em concentrações residuais de 0,516, 0,739, 0,346 e 0,672 mg/g, de éster de forbol, respectivamente.

O resultado de degradação de ésteres de forbol pelo cultivo axênico de *P. pulmonarius* EF88 por Gomes (2015) sugere que a utilização do EBE da FSM deste fungo, em 72 horas, é mais eficiente que seu crescimento em estado sólido na TSPM por 30 dias (Tabela 1). Outras condições de cultivo podem ter influenciado este resultado, como a temperatura, o pH e a concentração de enzimas no meio. O contato facilitado das enzimas com a TSPM (agitação) pode, ainda, ter contribuído com a destoxificação.

Luz e colaboradores (2014) observaram que as concentrações de éster de forbol e fatores antinutricionais em TSPM não são tóxicas para *P. ostreatus*, sugerindo que este fungo pode ser utilizado para degradar substâncias lignocelulósicas nesta torta e aumentar a produção de matéria orgânica, o conteúdo de carboidratos e a digestibilidade deste coproduto. Na Tabela 1, é possível observar os diversos resultados obtidos com esta espécie de fungo, dentre outras.

**Tabela 1.** Principais resultados descritos na literatura sobre a degradação de ésteres de forbol em TSPM, por meio do cultivo de algumas espécies de fungos, utilizando fermentação em estado sólido (FES).

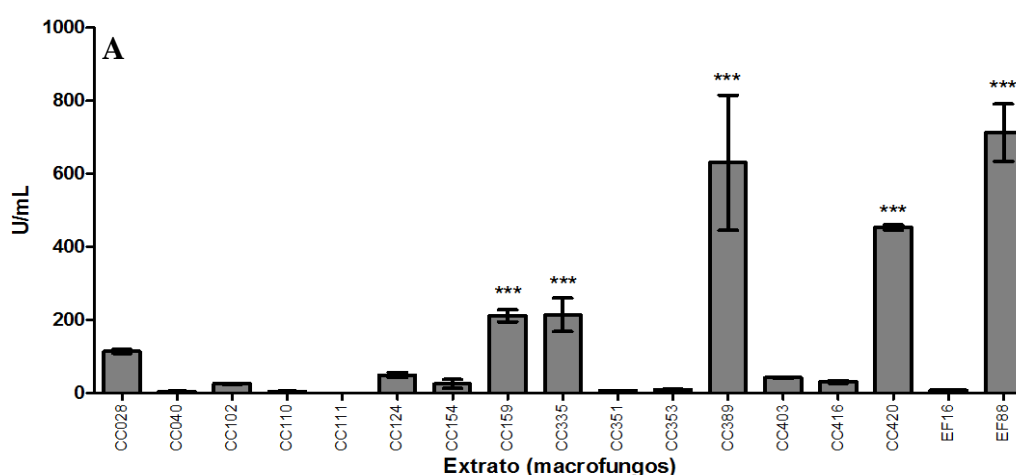
Microrganismo	Degradação	Tempo	Referência
<i>Pleurotus ostreatus</i>	37%	15 dias	LUZ <i>et al.</i> , 2014
	60%	45 dias	
	99%	60 dias	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	91%	30 dias	LUZ <i>et al.</i> , 2013
	99%	45 dias	
	99%	60 dias	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	58%	15 dias	KASUYA <i>et al.</i> , 2012
	85%	30 dias	
	99%	45 dias	
<i>Ganoderma lucidum</i>	100%	20 dias	BOSE; KEHARIA, 2014
<i>Trametes zonata</i>	100%		
<i>Trametes gibbosa</i>	91,7%		
<i>Trametes versicolor</i>	89%		
<i>Trametes hirsute</i>	81,6%		
<i>Pleurotus sapidus</i>	76%		
<i>Pleurotus ostreatus</i>	72,5%		
<i>Pleurotus florida</i>	67,9%		
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	67,9%		
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	44,9%		
<i>Phlebia rufa</i>	97%	30 dias	BARROS <i>et al.</i> , 2011
<i>Bjerkandera adusta</i>	91%		
<i>Ganoderma resinaceum</i>	20%		
<i>Aspergillus niger</i>	76,9%	7 dias	BELUWE; SAM, 2010
<i>Rhizopus nigricans</i>	23,1%		
<i>Penicillium chrysogenum</i>	15,4%		
<i>Trichoderma longibrachitum</i>	15,4%		
<i>Rhizopus oligosporus</i>	7,7%		
<i>Aurantioporus pulcherrimus</i>	41%	30 dias	*GOMES, 2015
<i>Ganoderma lucidum</i>	42%		
<i>Agaricus spp.</i>	54%		
<i>Agaricus fuscofibrillosus</i>	62%		
<i>Agaricus mediofuscus</i>	71%		
<i>Ascopolyporus ssp.</i>	76%		
<i>Panaeolus antillarum</i>	78%		
<i>Lentinus strigellus</i>	88%		
<i>Amyloporus spp.</i>	95%		
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	97%		

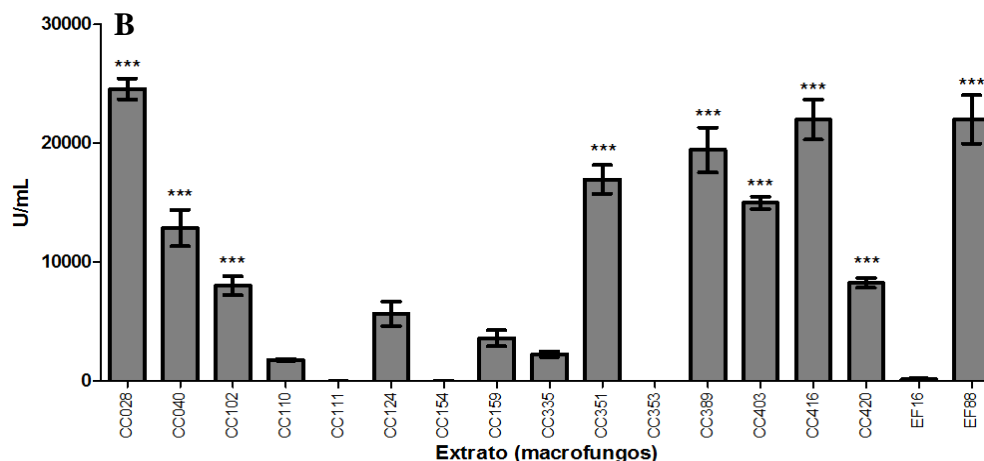
\*Resultados obtidos na Embrapa Agroenergia e que motivaram o planejamento e execução deste trabalho de biodestoxificação por via enzimática (extratos brutos dos cultivos dos macrofungos).

Os extratos brutos enzimáticos das duas cepas de *P. ostreatus* (CC389 e CC403), avaliadas neste estudo, degradaram apenas 65 e 84% dos ésteres de forbol, restando 0,74 e 0,35 mg/g de éster, respectivamente, com os extratos da FES, e 95 e 91% dos mesmos (apenas 0,2 e 0,21 mg/g), com os extratos da FSM. Entretanto o ensaio de fermentação submersa foi conduzido por apenas 72 horas, enquanto os autores supracitados conduziram fermentações por até 60 dias para obter este resultado de destoxificação (<0,009mg/g).

O potencial para degradar estes ésteres foi explicado na literatura pela capacidade do *P. ostreatus* de degradar a lignina e substâncias como clorofenóis e hidrocarbonetos aromáticos, pelas atividades de lacases e manganês peroxidases (KASUYA *et al.*, 2012; LUZ *et al.*, 2014). No trabalho de Luz *et al.* (2014), a atividade máxima destas enzimas ocorreu no 30º dia de incubação, quando a degradação total dos ésteres de forbol, ainda, não havia sido observada, portanto outras enzimas podem ter influenciado na degradação. A maior atividade de celulase e xilanase foram observadas entre o 15º e o 45º dia de incubação, quando a degradação dos ésteres de forbol foi de 37 e 60%, respectivamente (LUZ *et al.*, 2014).

As atividades de lacase nos extratos enzimáticos de *P. ostreatus*, no presente trabalho foram bem maiores nos extratos de cultivo sólido que nos de cultivo submerso, enquanto a degradação dos ésteres de forbol foi, significativamente, maior com os extratos da FSM. Nos extratos resultantes da FES, as atividades de lacase foram 19062 U/mL e 9924 U/mL, para CC389 e CC403, respectivamente, enquanto os extratos dos mesmos fungos crescidos em estado submerso apresentaram 629,6 e 42,4U/mL, respectivamente (Figura 2).





**Gráfico 2.** Gráfico da atividade de lacase nos extratos brutos enzimáticos resultantes da FSM (A) e da FES (B) de TSPM pelos fungos de podridão-branca selecionados. CC028 (*G. frondosa*) F1, CC040 (*P. lecomtei*) F2, CC102 (*F. hepatica*) F3, CC110 (*P. sapidus*) F4, CC111 (*P. ferulae*) F5, CC124 (*T. versicolor*) F6, CC154 (*P. pulmonarius*) F7, CC159 (*C. comatus*) F8, CC335 (*P. florida*) F9, CC351 (*G. lucidum*) F10, CC353 (*P. eryngii*) F11, CC389 (*P. ostreatus*) F12, CC403 (*P. ostreatus*) F13, CC416 (*P. citrinopileatus*) F14, CC420 (*A. fuscosuccinea*) F15, EF16 (*Amylosporopus* sp.) F16 e EF88 (*P. pulmonarius*) F17. Foi realizada análise de variância ANOVA, teste a posteriori de Tukey. Diferença estatisticamente significativa com p-valor = \*0,5; \*\*0,1; e \*\*\*0,05; em relação ao controle.

A análise de correlação demonstrou que há uma relação direta ( $<0,05$ ) entre a atividade de lacase nos extratos de cultivo submerso e o seu potencial de destoxificação (Tabela 2). A maior atividade de lacase entre os extratos de cultivo submerso (712,3 U/mL) foi observada no extrato com maior potencial de degradação dos ésteres de forbol, o extrato de FSM do EF88, com 100% de degradação, seguido do CC389 (629,57 U/mL), segundo melhor EBE-FSM, com 94,63% de degradação dos ésteres de forbol. A Tabela 2 mostra a análise de correlação de Spearman com  $p < 0,05$  entre as atividades de lacase e os teores de proteínas solúveis totais nos EBE-FSM e suas taxas de degradação dos ésteres de forbol.

**Tabela 2.** Coeficientes de correlação de Spearman entre a degradação de éster de forbol, concentração de proteínas totais e atividade de lacase nos EBE-FSM.

Correlação de Spearman	Degradação	Proteínas	Lacase
Degradação	-		
Proteínas	-0,23804	-	
Lacase	0,70136*	-0,17928	-

Os resultados experimentais dos diferentes tratamentos foram analisados utilizando coeficientes de correlação de Spearman, em que \* $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Entre os extratos de cultivo sólido, o do CC028 apresentou a maior atividade de lacase observada, com 23407,82 U/mL, seguidos do CC416 (21708,64 U/mL) e EF88 (21543,89 U/mL), que degradaram 80,47, 75,97 e 75,61% dos ésteres de forbol, respectivamente, não

havendo correlação entre as atividades de lacase e o potencial de degradação dos ésteres de forbol pelos EBE-FES (Tabela 3). O extrato de FES com maior potencial de degradação de ésteres de forbol (CC102) apresentou uma atividade de lacase de 8145,4 U/mL e o segundo melhor extrato (CC351) 15894,24 U/mL.

**Tabela 3.** Coeficientes de correlação de Spearman entre a degradação de éster de forbol, concentração de proteínas totais e atividade de lacase nos EBE-FES.

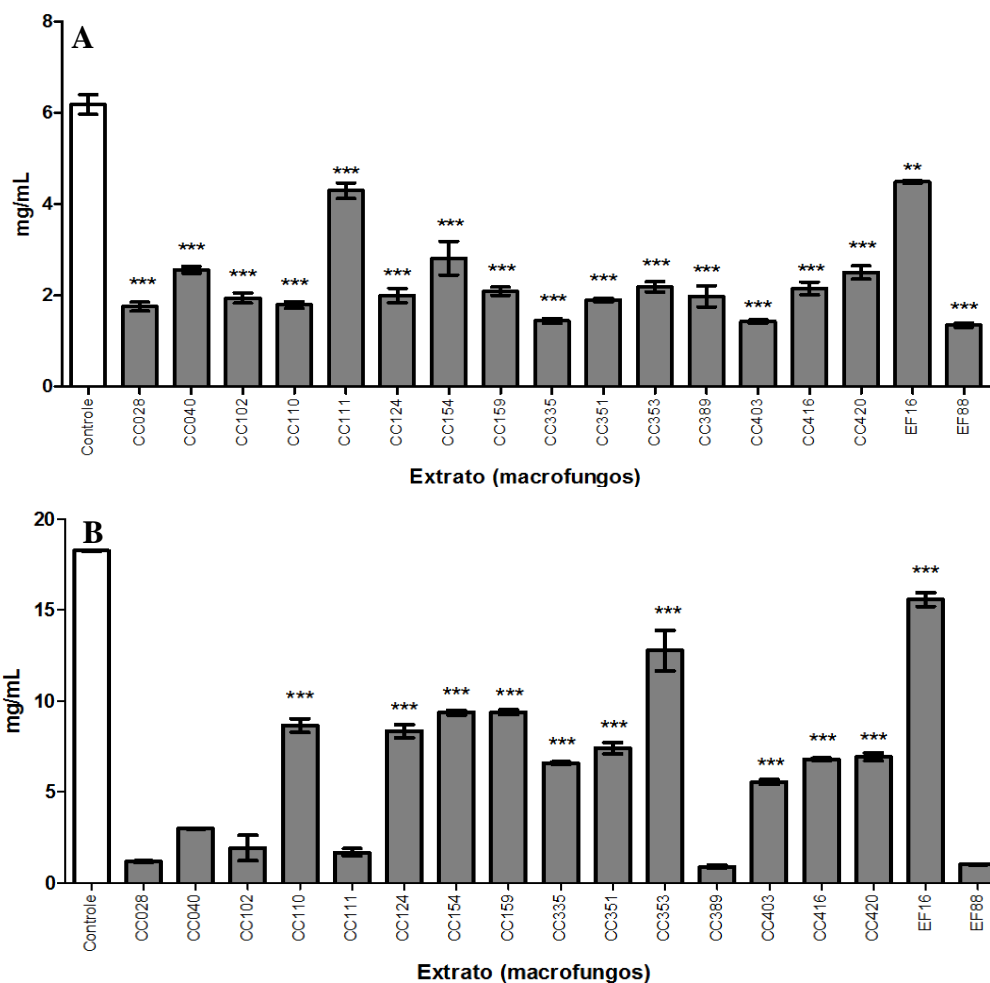
Correlação de Spearman	Degradação	Proteínas	Lacase
Degradação	-		
Proteínas	0,07232	-	
Lacase	0,37104	-0,23653	-

Os resultados experimentais dos diferentes tratamentos foram analisados utilizando coeficientes de correlação de Spearman, em que \*p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Luz e colaboradores (2014) observaram que *P. ostreatus* apresenta alta atividade de ligninases quando cultivado em TSPM com serragem de eucalipto e de xilanase nesta torta com casca de eucalipto, mas baixas atividades de celulasas e lacases. Eles sugeriram que a alta disponibilidade de monossacarídeos no substrato influenciou a expressão diferencial de lignocelulasas e observaram importante produção de biomassa e atividade enzimática em torta de semente de *J. curcas* sem adição de nenhum outro resíduo lignocelulósico.

Entre os extratos da FES, os mais eficientes na degradação dos ésteres de forbol foram o F3 (*F. hepatica* CC102), o F10 (*G. lucidum* CC351), o F2 (*P. lecomtei* CC040) e o F11 (*P. eryngii* CC353), com 98, 96, 89 e 88,5% de degradação, respectivamente (Figura 1B). Os dois primeiros resultaram em taxas residuais de éster de forbol de 0,045 e 0,075mg/g nas tortas, respectivamente, podendo ser consideradas atóxicas (<0,09mg/g).

Bose e Keharia (2014) conduziram as FES da TSPM a 30°C, por 20 dias e, nestas condições, o *G. lucidum* degradou completamente os ésteres de forbol. No presente trabalho, o extrato de cultivo sólido desta espécie (F10 - CC351) degradou 96% dos ésteres de forbol, resultando em uma TSPM atóxica (0,08 mg/g), e o extrato da FSM reduziu 81% destes ésteres, nas 72 horas de ensaio, sugerindo que esta cepa *G. lucidum* CC351 apresenta considerável eficiência na degradação dos ésteres de forbol, apresentando, inclusive, degradação superior à encontrada por Gomes (2015), com a mesma espécie, em 30 dias de cultivo (Tabela 1).



**Gráfico 3.** Gráfico das concentrações de proteínas solúveis totais em EBE de FSM (A) e em EBE de FES (B) de TSPM pelos fungos de podridão-branca selecionados. CC028 (*G. frondosa*) F1, CC040 (*P. lecomtei*) F2, CC102 (*F. hepatica*) F3, CC110 (*P. sapidus*) F4, CC111 (*P. ferulae*) F5, CC124 (*T. versicolor*) F6, CC154 (*P. pulmonarius*) F7, CC159 (*C. comatus*) F8, CC335 (*P. florida*) F9, CC351 (*G. lucidum*) F10, CC353 (*P. eryngii*) F11, CC389 (*P. ostreatus*) F12, CC403 (*P. ostreatus*) F13, CC416 (*P. citrinopileatus*) F14, CC420 (*Pleurotus* ssp.) F15, EF16 (*Amylospor* sp.) F16 e EF88 (*P. pulmonarius*) F17. Foi realizada análise de variância ANOVA, teste a posteriori de Tukey. Diferença estatisticamente significativa com p-valor = \*0,5; \*\*0,1; e \*\*\*0,05; em relação ao controle.

Os extratos de cultivo sólido e submerso do F6 (*T. versicolor* CC124) degradaram 76 e 80% dos ésteres de forbol, respectivamente, menos que o observado por Bose e Keharia (2014), em 20 dias. No entanto deve-se considerar o tempo de atividade dos extratos sobre a TSPM, que foi de apenas 72 horas. Os extratos do *P. sapidus* CC110 (F4) e do *P. florida* CC335 (F9), em 72 horas, foram mais eficientes na degradação desta substância que as estirpes destas espécies utilizadas por Bose e Keharia (2014), com 73,8 e 85,4% de degradação pelos extratos de FES e 86 e 84,4% pelos extratos de FSM, respectivamente, o que indica que os extratos enzimáticos destas cepas crescidas em TSPM é eficiente na degradação dos ésteres de forbol deste coproduto.

Alguns autores atribuem a degradação dos ésteres de forbol à atividade de lipase (BOSE; KEHARIA, 2014; HIDAYAT *et al.*, 2014; JOSHI; MATHUR; KHARE, 2011), no entanto o extrato de cultivo submerso de EF88, que apresentou o melhor resultado de degradação de ésteres de forbol (100%), não apresentou atividades de lipases ou esterases, sugerindo que a degradação destes ésteres foi conduzida por outras enzimas.

As proteínas solúveis totais foram mensuradas em todos os extratos, a fim de estimar o seu teor de enzimas e os EBE de FES de todos os fungos apresentaram concentrações maiores de proteínas solúveis totais, quando comparados aos EBE das FSM (Figura 3). A análise de correlação apontou que não existe uma relação direta (ou inversa) entre as concentrações de proteínas solúveis totais nos extratos e as taxas de degradação de ésteres de forbol pelos extratos (Tabelas 2 e 3). Até porque a obtenção do extrato resultou na solubilização de muitas proteínas vegetais da TSPM, incubada por 72 horas (controle), e a degradação das proteínas observadas nos tratamentos com os EBE podem apontar para uma presença de proteases nos extratos.

*Pannus lecomtei* CC040 (F2) apresentou um resultado surpreendente na degradação dos ésteres de forbol, para os extratos de ambos os cultivos. Ainda não há relatos na literatura da eficiência desta espécie na degradação desta substância e, por isso, a capacidade dos seus EBE de FES e FSM em degradar os ésteres de forbol em 89,3 e 88,3%, respectivamente, bem como a sua velocidade de crescimento na TSPM chama a atenção neste trabalho. Das atividades enzimáticas investigadas no EBE da FSM de EF88, o melhor dos extratos testados, a maior é a atividade de lacase, com 583,99 U/mL, seguido das peroxidases totais, com 64,09 U/mL e das proteases (43,64 U/mL). A tabela a seguir (Tabela 4) mostra uma comparação entre as atividades enzimáticas dos extratos de cultivo submerso de *P. pulmonarius* EF88 e *P. lecomtei* CC040.

**Tabela 4.** Valores de atividades enzimáticas nos EBE de FSM de *P. pulmonarius* EF88 e *P. lecomtei* CC040.

Enzimas	EF88	CC040
Proteínas totais (mg/mL)	1,91±0,05	2,55±0,08
Lacase (U/mL)	583,99±3,22	101,89±2,26
Protease (U/mL)	43,64±1,71	336,67±8,96
Peroxidases totais (U/mL)	64,09±0,87	25,56±0,87
Mn Peroxidase (U/mL)	0,14±0,03	0,04±0,004
Fpase (U/mL)	0,10±0,00	0,25±0,01
CMCase (U/mL)	0,05±0,00	0,06±0,00
Xilanase (U/mL)	0,04±0,00	0,06±0,00
Beta-glicosidase (U/mL)	0,01±0,00	0,01±0,00

Lipase (U/mL)	ND*	ND*
Esterase (U/mL)	ND*	ND*

Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=3), com análise de variância ANOVA, teste a posteriori de Tukey. \*ND = Não detectado.

FES e FSM de TSPM, também, foram avaliadas por Chang et al. (2014), neste caso, utilizando cinco estirpes de *Bacillus*. A FSM, durante 3 dias, por *B. smithii*, *B. sonorensis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *B. coagulans* reduziu o teor de ésteres de forbol em 76,5%, 77,1%, 78,4%, 85,5% e 92,0%, respectivamente. E tiveram produção máxima de xilanase (1,40 $\pm$ 0,0 U/mL em 3 dias), de lipase (59,03 $\pm$ 0,26 U/mL em 7 dias), de celulase (17,03 $\pm$ 4,90 U/mL em 2 dias) e de protease (15,95 $\pm$ 0,35 U/mL em 7 dias), respectivamente. Em sete dias de cultivo submerso, as cinco espécies de *Bacillus* degradaram 100% dos ésteres de forbol. Na FES de 20g de TSPM com 50% de umidade inicial, a 25°C, durante 3 dias, por *B. sonorensis*, *B. subtilis* e *B. smithii* apresentaram redução de 86,0%, 83,2% e 93,0% de éster de forbol, respectivamente. A produção enzimática foi superior à do cultivo submerso, com produção máxima de protease (14,13 $\pm$ 0,30 U/g) e de lipase (3,87 $\pm$ 0,64 U/g) em 4 dias e de xilanase (9,72 $\pm$ 0,97 U/g) em 3 dias de cultivo por *B. smithii* e de celulases (2,94 $\pm$ 0,06 U/g) por *B. sonorensis* em 2 dias de cultivo (CHANG et al., 2014).

No presente trabalho, pode-se observar que existe uma correlação entre a degradação de éster de forbol e o aumento da atividade de lacase e das peroxidases totais (Tabela 5). Phengnum e Suntornsuk (2013) avaliaram o potencial da FES e FSM de TSPM por *Bacillus*, na degradação dos ésteres de forbol e observaram que *B. licheniformis* e *B. subtilis* podem degradar 60% e 40% destas substâncias em 5 dias de FSM, respectivamente. O método mais eficiente para degradar os ésteres de forbol foi a fermentação submersa por *B. licheniformis*, que resultou em redução de 62% dos ésteres de forbol, o que foi relacionado à atividade de esterases, que atingiu o máximo de 300 U/mL no final da fermentação, quando os ésteres de forbol foram reduzidos de 103,5  $\mu$ g/g para 39,4  $\mu$ g/g. A produção máxima de protease (0,9 U/mL) foi observada no final de fermentação por *B. licheniformis*.

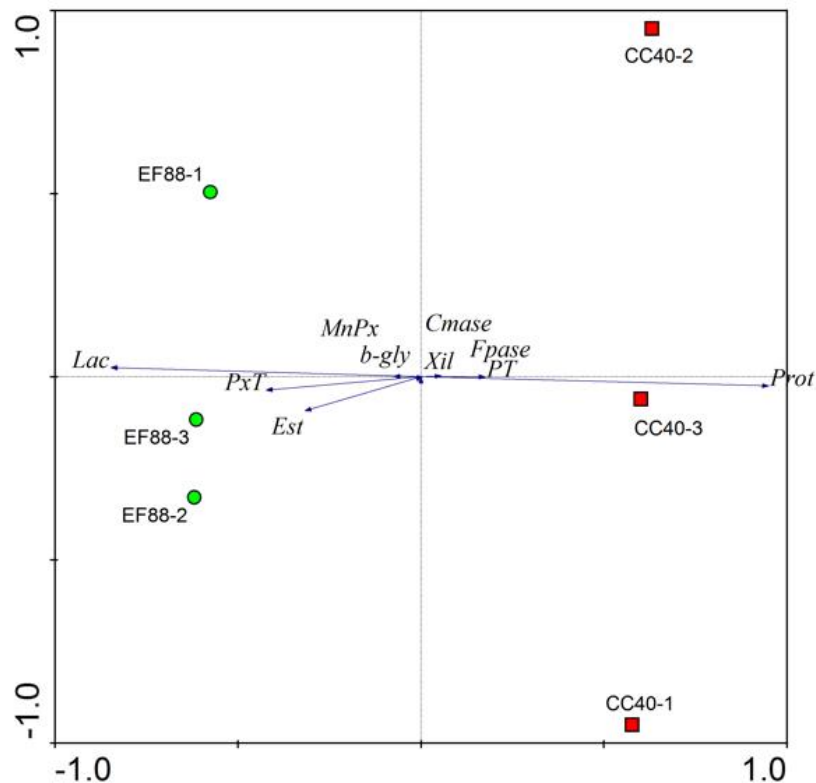
**Tabela 5.** Coeficientes de correlação de Spearman entre a degradação de éster de forbol, concentração de proteínas totais, atividade de lacase, peroxidases totais, proteases, Manganês peroxidase, Fpase, CMCCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase nos EBE-FSM dos fungos EF88 e CC040.

Correlação de Spearman	Degradação de éster (%)	Proteínas totais (mg/mL)	Lacase (U/mL)	Peroxidases totais (U/mL)	Protease (U/mL)	Manganês Peroxidase (U/mL)	Fpase (U/mL)	CMCase (U/mL)	Xilanase (U/mL)	$\beta$ -glicosidase (U/mL)
Degradação de éster (%)	-									
Proteínas totais (mg/mL)	-0,84067*	-								
Lacase (U/mL)	0,84067*	-0,77143	-							
Peroxidases totais (U/mL)	0,89865*	-0,94286*	0,71429	-						
Protease (U/mL)	-0,92763*	0,77143	-0,65714	-0,88571*	-					
Manganês Peroxidase (U/mL)	0,98561*	-0,77143	0,88571*	0,82857*	-0,88571*	-				
Fpase (U/mL)	-0,7537	0,77143	-0,65714	-0,88571*	0,82857*	-0,71429	-			
CMCase (U/mL)	-0,57977	0,2	-0,54286	-0,42857	0,54286	-0,65714	0,6	-		
Xilanase (U/mL)	-0,69573	0,94286*	-0,6	-0,82857*	0,6	-0,6	0,54286	-0,08571	-	
$\beta$ -glicosidase (U/mL)	-0,7045	0,30861	-0,61721	-0,46291	0,52463	-0,77152	0,37033	0,83324*	0,1543	-

Os resultados experimentais dos diferentes tratamentos foram analisados utilizando coeficientes de correlação de Spearman, em que \*p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

As enzimas, também, foram o foco do trabalho de Xiao *et al.* (2011), que avaliaram o tratamento enzimático (5 mg/g de celulase + 10mg/g de pectinase), por 1 hora, a 50°C e pH 4,5-5,0 combinado com a lavagem com metanol e etanol. Eles observaram remoção total dos ésteres de forbol, ao se utilizar o tratamento enzimático com 60 ou 65% destes álcoois e atribuíram o sucesso deste tratamento à capacidade das enzimas (celulase e pectinase) destruírem a parede celular das plantas, expondo os componentes intracelulares, que podem então ser lavados pelos álcoois de cadeia curta (etanol e metanol).

A PCA das enzimas presentes nos EBE-FSM de EF88 e CC040 e degradação dos ésteres de forbol por eles (Figura 4) demonstrou valores iguais a 0,99 (PC-1) e 0,006 (PC-2), para os dois primeiros componentes principais, que mostraram uma variância acumulada de 99,6%. Observa-se que ocorre um aumento da degradação dos ésteres de forbol, em função do aumento das atividades de lacase e peroxidases, enquanto o aumento de proteases, CMCase, xilanase e FPase está relacionado com a diminuição da degradação de éster de forbol, apesar da literatura apontar a ação de proteases na degradação de ésteres (PHENGNUAM; SUNTORNSUK, 2013) e mencionar que a ação das celulases, xilanases e manganês peroxidases sobre parede celular vegetal pode auxiliar nesta destoxificação (CHANG *et al.*, 2014; JOSHI; KARE, 2011; KASUYA *et al.*, 2012; LUZ *et al.*, 2014; XIAO *et al.*, 2011).



**Gráfico 4.** PCA das enzimas presentes nos EBE-FSM de EF88 e CC040 e da atividade na degradação dos ésteres de forbol.

#### 4 CONCLUSÕES

Os resultados da presente investigação permitem concluir que os extratos enzimáticos de alguns fungos de podridão-branca têm a capacidade de degradar os ésteres de forbol em TSPM. As enzimas liberadas no meio com 5% de TSPM, durante sete dias de crescimento de *P. pulmonarius* EF88, são capazes de reduzir os ésteres de forbol para níveis indetectáveis em apenas 72 horas e os EBE de FES e FSM de *P. lecomtei* apresentaram resultados inéditos de degradação destes ésteres, podendo representar uma fonte alternativa de enzimas degradadoras. A destoxificação enzimática é mais rápida que as fermentações microbianas descritas e processos de otimização podem agilizar ainda mais a ação destas enzimas.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHILASH, P. C.; *et al.* Revisited *Jatropha curcas* as an oil plant of multiple benefits: critical research needs and prospects for the future. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, p. 127–31, 2011.

ACHTEN, W. M. J.; *et al.* *Jatropha* bio-diesel production and use. **Biomass and bioenergy**, n. 32, p.1063-1084, 2008.

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. **Journal of Natural Sciences**, v. 21, p. 50-56, 2003.

BARROS, C. R. M.; *et al.* The potential of white-rot fungi to degrade phorbol esters of *Jatropha curcas* L. seed cake. **Engineering in Life Sciences**. v. 11, p. 107–110, 2011.

BELEWU, M. A.; SAM, R. Solid state fermentation of *Jatropha curcas* kernel cake: Proximate composition and antinutritional components. **Journal of Yeast and Fungal Research**. v. 1, n.3, p. 44-46, 2010.

BOSE, A.; KEHARIA, H. Phorbol ester degradation in *Jatropha* seedcake using white rot fungi. **Biotechnology**, n. 4, p. 447–450, 2014.

CAPDEVILLE, G.; LAVIOLA, B. **Pinhão Manso: insucesso ou erro de estratégia?** Brasília,2013. Disponível em:<<https://www.biodieselbr.com/noticias/materia-prima/jatropha/pinhao-manso-insucesso-erro-estrategia-100913.htm>>Acesso em: 01 de março de 2017.

CHANG, C-F.; *et al.* Phorbol esters degradation and enzyme production by *Bacillus* using *Jatropha* seed cake as substrate. **International Journal of Environmental Pollution and Remediation**, v. 2, n. 1, 2014.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal Biology Chemical**, v. 23, p. 501-505, 1947.

DIAZ, J. C. M.; *et al.* Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 1042-1050, 2006.

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

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

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257–268, 1987.

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

GOMES, T. G. **Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-mansão por basidiomicetos e seu potencial como substrato para produção de enzimas de interesse industrial.** Dissertação - Universidade Federal do Tocantins, 2015.

GUSAKOV, A. V.; KONDRATYEVA, E. G.; SINITSYN, A. P. Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. **International Journal of Analytical Chemistry**, p. 1-4, 2011.

HIDAYAT, C.; *et al.* Enhancing indigenous lipase activity of germinated *Jatropha curcas* L. seeds for the enzymatic degradation of phorbol ester. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 71–76, 2014.

HONORATO, C. A.; *et al.* Avaliação toxicológica da torta de pinhão-mansão *Jatropha curcas* em ratos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária** (Impresso), v. 23, p. 55-59, 2016.

JOSHI, C.; KHARE, S. K. Utilization of deoiled *Jatropha curcas* seed cake for production of xylanase from thermophilic *Scytalidium thermophilum*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1722–1726, 2011.

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

KASUYA, M. C. M.; *et al.* Bio-detoxification of *Jatropha* seed cake and its use in animal feed. Biodiesel- Feedstocks. **Production and Applications**. Cap. 11, p. 309-330, 2012.

KING, A. J.; *et al.* Potential of *Jatropha curcas* as source of renewable oil and animal feed. **Journal of Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 2897–905, 2009.

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

KUWAHARA, M.; *et al.* Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, p. 247-250, 1984.

LI, Z.; *et al.* System approach for evaluating the potential yield and plantation of *Jatropha curcas* L. on a global scale. **Environmental Science & Technology**, v. 44, p. 2204–2209, 2010.

LUZ, J. M. R.; *et al.* Bio-detoxification of *Jatropha curcas* seed cake by *Pleurotus ostreatus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 11, p. 1148-1156, 2014.

LUZ, J. M. R.; *et al.* Production of edible mushroom and degradation of antinutritional factors in *Jatropha* biodiesel residues. **Food Science and Technology**, v. 50, p. 575-580, 2013.

MENDONÇA, S; LAVIOLA, B. G. **Uso Potencial e Toxidez da Torta de Pinhao-mansão.** Comunicado Técnico (Embrapa Agroenergia), v. 1, p. 1-8, 2009.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.

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

SAETAE, D.; SUNTORNSUK W. Antifungal activities of ethanolic extraction from *Jatropha curcas* seed cake. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 319-324, 2011.

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