UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ALESSANDRA DE CÁSSIA ROMERO

Resíduos da produção de biodiesel: Avaliação de moléculas bioativas e potencial de aplicação na alimentação animal

Piracicaba
2013

ALESSANDRA DE CÁSSIA ROMERO

Resíduos da produção de biodiesel: Avaliação de moléculas bioativas e potencial de aplicação na alimentação animal

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla

Piracicaba
2013

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

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

Romero, Alessandra de Cássia
Resíduos da produção de biodiesel: avaliação de moléculas bioativas e potencial de aplicação na alimentação animal / Alessandra de Cássia Romero; orientador Adibe Luiz Abdalla. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
113 f. : il.

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

1. Análise de alimentos para animal 2. Caroço de algodão 3. Cromatografia líquida de alta eficiência 4. Intoxicação por plantas em animal 5. Mamona 6. Metabólitos secundários 7. Pinhão-manso 8. Subprodutos para animais 9. Sustentabilidade I. Título

CDU 636.087.2 : (543.062 +615.918)

DEDICATÓRIA

Dedico e agradeço a Deus, primeiro Autor em tudo em minha vida.

Dedico essa conquista a minha melhor definição de amor, MINHA FAMÍLIA:

Aos meus pais, com os quais aprendi pelo exemplo de amor, dedicação e honra. À minha mãe, Fátima Romero, por sempre ter acreditado mesmo quando parecia impossível, por ter me incentivado e apoiado incondicionalmente – você é o meu melhor exemplo de sucesso! Ao meu pai, Sidnei Romero, porque a atitudes valem mais do que mil palavras. Aos meus irmãos, Daniele Romero de Nadai e Rafael Romero, dedico e agradeço.

A Mariana Schievano Danelon, amiga de sempre e para todas as horas, mesmo quando nossos diferentes interesses científicos tornaram a conversa quase incompreensível, não paramos de falar!

AGRADEÇO POR TODOS OS MOMENTOS NOS QUAIS, MESMO AUSENTES, VOCÊS SEMPRE PERMANECERAM COMIGO!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla, pela confiança e apoio incondicionais, pelo conhecimento generosamente transmitido e por sempre ter acreditado nesse projeto.

Ao Prof. Dr. Helder Louvandini pelo apoio, constante incentivo e entusiasmo durante a realização desse projeto.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e à Coordenação do Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências, pela oportunidade e infraestrutura oferecidas para realização do curso de doutorado e da pesquisa proposta.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências, Neuda, Daiane, Fábio e Sônia, pelo auxílio e atenção dispensados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão de bolsa de doutorado.

Aos técnicos do LANA Maria Regina S. R. Peçanha, Lécio Aparecido Castilho e Joaquim Everaldo M. Santos pela constante atenção, auxílio para realização das análises e amizade desde o início de minha pós-graduação.

À Dra. Niurca González Ybarra e a profª Dra. Juana Luz Galindo Blanco (Universidad de Havana).

Aos Drs. Eduardo Micotti da Glória e Maria Antonia Calori-Domingues, pelo apoio e amizade.

Aos profs. Drs. Marisa Ap. Bismara Regitano d´Arce e Severino M. de Alencar e Valdemar Tornisielo.

A todos os funcionários (e amigos) da Biblioteca da Esalq e do Cena, pelo apoio e auxílio constantes desde nosso primeiro contato.

Ao Dr. Amadeo Regitano Neto (IAC), Dr. Bruno Galvêas Laviola (Embrapa), Prof. Dr. Luis Fernando Sanglade (ESALQ/USP).

A todos, muito obrigada!

Aos amigos: Ronaldo Carlos Lucas (além de tudo de bom que eu já sabia a seu respeito, ainda descobri o quanto você é atencioso, quando mais precisei! Obrigada!), Achilles Acerbi e família, Aline Caetano, Carmem Maia (thank you!), Carina Nazato, Eduardo Micotti da Gloria, Elisvete Tertuliano, Ivani Valarini Zambell, Lilia Raquel Fé (UFPI), Maria Antonia Calori-Domingues, Maria Regina Peçanha, Natasha Deguer Misko, Amr Salah Morsy e Yosra Soltan, pelo apoio e amizade desde que os conheço.

Aos colegas da Pós-graduação e do grupo LANA: Ana Cláudia Koki Sampaio, Aline Campeche, Amr Salah Morsy, Andressa Natel, Bernardo Berenchtein, Carina Nazato, Edgar Franco Gomes, Emiliana Romagnoli, Erika Canova, Fernanda Campos, Gisele Fagundes, Juliano Issakovicz, Patrícia Godoy, Patrícia Pimentel, Ronaldo Carlos Lucas, Tiago Paim, Yosra Soltan, pelo companheirismo, amizade e conhecimentos compartilhados junto ao grupo LANA.

Aos colegas do Laboratório de Ecotoxicologia: Franz Vilca Zirena, Rafael Leal, Sérgio Monteiro, Nádia Hortense, pelo auxílio e amizade.

Aos estagiários e bolsistas do LANA: Fabiana Aparecida Garcia, Tais Cavallaro Martins, Tali Pereira Lima Aspis, Adibe Luiz Abdalla Filho, Ingrid Mariano, Rodolfo Pereira, Vitor Guerrini, Jade Soares, Laura Oliveira e todos os que passaram pelo LANA, ainda que brevemente.

A todos que, ainda que indiretamente, me ajudaram na execução desse trabalho.

Muito obrigada!

"A glória de Deus é encobrir as coisas, mas a glória dos reis é esquadrinhá-las."

Pv. 25:2

RESUMO

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

A crescente demanda por fontes de energia limpas e sustentáveis tem impulsionado a busca por matérias-primas alternativas para a produção de biocombustíveis. Dentre as fontes vegetais não utilizadas para a alimentação, a mamona, o pinhão-manso e o caroço de algodão apresentam elevados teores de óleo para produção de biodiesel e potencial para utilização dos resíduos na alimentação de ruminantes. Entretanto, para que esses "resíduos" adquiram *status* de coprodutos, é necessário avaliar sua toxicidade, para administrá-los em níveis seguros ou realizar sua destoxificação. Este estudo teve por objetivo mensurar o teor das moléculas biotivas gossipol, ricina e ésteres de forbol em tortas de caroço de algodão, mamona e pinhão-manso, respectivamente, a fim de avaliar o potencial de utilização desses subprodutos na alimentação de ruminantes, considerando a ação dessas biomoléculas na fermentação ruminal *in vitro* em diferentes níveis de substituição ao farelo de soja do concentrado. O delineamento experimental foi totalmente casualizado, utilizando três níveis de adição de biomoléculas extraídas das tortas, simulando a substituição da soja do concentrado em 33,3 66,6 e 100% e adicionadas sobre uma dieta base (controle), e um nível de torta em substituição a 22,2% ao farelo de soja do concentrado da mesma dieta base dos demais tratamentos, a fim de avaliar possíveis diferenças de ação da biomolécula *in natura* na torta ou extraída. Os dados foram analisados por regressão linear e quadrática, ANOVA e teste de Dunnett para comparação das médias dos tratamentos em relação ao controle. As metodologias em CLAE (HPLC) para quantificação das biomoléculas foram adaptadas e validadas. As concentrações das biomoléculas nas tortas analisadas estiveram dentro da faixa citada pela literatura, sendo que o gossipol e a ricina poderiam ser adicionados na alimentação de ruminantes nos teores propostos neste estudo, proporcionando níveis de ingestão inferiores aos citados como tóxicos pela literatura. Da mesma forma, a produção de gases na fermentação ruminal *in vitro* não demonstrou ocorrência de efeitos destas biomoléculas sobre a microbiota ruminal. Os níveis de adição de pinhão-manso propostos poderiam ocasionar toxicidade pela ingestão de ésteres de forbol. No bioensaio com pinhão-manso, foram observados efeitos com 22,2% de adição de torta sobre a taxa de eficiência de conversão do metano, sugerindo que os ésteres de forbol estejam bioativos apenas na torta *in natura* ou ainda que a presença de outro composto tóxico, sozinho ou sinergia com os ésteres de forbol, possa ter interferido na microbiota ruminal. A viabilidade da inclusão das tortas de caroço de algodão e mamona *in natura* não foi negada por este estudo, entretanto, é necessário considerar a concentração de suas biomoléculas e o manejo animal correto. Para a utilização de pinhão-manso *in natura* em qualquer nível de adição, ainda são necessários novos estudos sobre a toxicidade dos ésteres de forbol nas tortas e sua possível sinergia com outros compostos tóxicos. A identificação e quantificação dos ésteres de forbol antes e após o tratamento de destoxificação constituem os principais entraves para que a utilização da torta de pinhão-manso se torne um coproduto da alimentação animal.

Palavras chave: Moléculas bioativas. Toxicidade. Alimentação animal. Coprodutos do biodiesel. Sustentabilidade.

ABSTRACT

ROMERO, A. C. **Residues from biodiesel production: evaluation of bioactive molecules and potential application in animal nutrition.** 2013. 113 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

The growing demand for sustainable and clean energy sources has increased the search of alternative raw materials for the production of biofuels. Castor-oil plant, jatropha and cotton seeds are among the plant resources that are not used for food although they have high level of oil for biodiesel production and might have considerable potential to use their residues to feed ruminants. However, for these "residues" to achieve status of co-products it is necessary to evaluate its toxicity before using them at safe levels or to perform its detoxification. This study aimed to measure the content of gossypol, ricin and phorbol esters bioactives molecules in cottonseed, castor and jatropha meals respectively in order to evaluate the potential of the use of these co-products to feed ruminants, considering the action of these biomolecules in ruminal fermentation *in vitro* into different substitution levels of soybean meal in the concentrate. The experimental design was completely randomized; one level of a meal by replacing 22,2% of soy in its concentrate and three levels by adding biomolecules extracted from meals simulating the replacement of 33,3, 66,6 and 100% of soy in its concentrate in the same diet base (control) of others treatment in order to evaluate differences of effects of biomolecules *in natura* both in a meal or extracted. The results were analyzed by linear and quadratic regression, ANOVA and Dunnett´s test for comparison of averages of treatments compared to control. The HPLC methodologies to quantify the biomolecules were adapted and validated. The biomolecules' concentrations were within the values were quoted in the literature and both the gossypol as ricin could be added in the feeding of ruminants at the levels proposed in this report, providing intake levels below those quoted as toxic in literature. Likewise, the gas production in rumen fermentation *in vitro* showed no effects of biomocules on rumen microbial. According to the literature, the jatropha levels proposed could cause toxicity by the content of phorbol esters ingested. In the bioassay with jatropha, effects on methane efficiency rate were observed when 22,2% of meal were added, suggesting that phorbol esters are bioactives only in meal *in natura* or even the presence of other toxic compound, alone or in synergy with phorbol esters, might have affected the ruminal microflora. The viability of cottonseed and castor meal *in natura* inclusion was not denied by this report, however, it is extremely necessary to consider their concentration of biomolecules and correct animal handling. For the use of jatropha *in natura* at any level of addition further studies are still needed on the toxicity of phorbol esters in meal *in natura* and its possible synergy with other toxic compounds. The identification and quantification of phorbol esters before and after detoxification treatment has still being a main barrier to jatropha meal becomes a co-product of animal nutrition.

Keywords: Bioactives molecules. Toxicity. Animal feed. Co-products of biodiesel. Sustainability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cromatogramas de amostras com os picos de ésteres de forbol (a) e espectros dos picos apresentados na literatura (b). (Fonte: adaptado de Makkar et al. (2009), à esquerda; Devappa, Makkar e Becker (2010), à direita)..... 55

Figura 2 - Deslintamento do caroço de algodão em ácido sulfúrico 66

Figura 3 - Sementes de mamona (à esquerda) e óleos obtidos na prensagem dos caroços de algodão (à direita, à frente) e de mamona (à direita, ao fundo) 67

Figura 4 - (a) Sementes de pinhão-manso com albúmen escurecido (1), albúmen granuloso (2), albúmen acinzentado e comparação entre semente com albúmen e sem (4); (b) Sementes de pinhão-manso com aspecto normal (1 e 2) e albumens considerados com aspecto homogêneo 69

Figura 5 - Amostras de sementes Embrapa (esquerda), tortas sem e com casca (centro) e aspecto do óleo obtido (direita) 69

Figura 6 - (a) Cromatograma de amostra de torta de algodão (pico do gossipol em destaque). (b) Espectro UV do gossipol obtido a 254 nm..... 70

Figura 7 - (a) Cromatograma de amostra de torta de caroço de algodão, com pico de gossipol presente naturalmente na amostra em destaque; (b) Cromatograma de amostra de torta de caroço de algodão com adição de padrão de gossipol (cocromatografia). O destaque em verde indica a pureza do pico de gossipol 71

Figura 8 - Curva analítica do gossipol 72

Figura 9 - Extrato contendo gossipol obtido após maceração em acetona (após16 horas) 73

Figura 10 - Cromatograma de padrão de ricina A (24,644 minutos, em destaque) 75

Figura 11 - Espectro UV do pico de ricina (214 nm) 76

Figura 12 - (a) Cromatograma de amostra de torta de mamona; (b) Cromatograma de torta de mamona com adição de padrão de ricina 77

Figura 13 - Curva analítica da ricina de cadeia A 78

Figura 14 - (a) Cromatograma de amostra de óleo de pinhão-manso. (b) Espectros dos picos nos tempos de retenção entre 27 e 30 minutos (de 1 a 4, em destaque)..... 82

Figura 15 - Cromatograma com picos residuais de ésteres de forbol na amostra de torta de pinhão-manso parcialmente destoxificada 83

Figura 16 - Cromatograma com os picos de ésteres de forbol na amostra de torta tóxica 83

Figura 17 - Curva analítica dos ésteres de forbol (padrão 12, 13-diacetato de forbol) 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento de óleo e resíduos vegetais por tipo de extração 24

Tabela 2 - Programação do sistema de eluição em gradiente do gossipol 50

Tabela 3 - Programação do sistema de eluição em gradiente da ricina 52

Tabela 4 - Programação do sistema de eluição em gradiente dos ésteres de forbol 56

Tabela 5 - Composição bromatológica da dieta base LANA-CENA/USP 58

Tabela 6 - Planejamento experimental da produção de gases pela fermentação ruminal *in vitro* 64

Tabela 7 - Caracterização das sementes de pinhão-manso quanto ao peso médio por semente e porcentagem de cascas 68

Tabela 8 - Teor de gossipol livre nas amostras de torta de algodão 73

Tabela 9 - Estimativa de ingestão diária (total e por quilo de peso corpóreo) de gossipol livre considerando os níveis de consumo propostos no bioensaio em cada torta de caroço de algodão analisada 74

Tabela 10 - Teor de ricina nas amostras de torta de mamona 78

Tabela 11 - Estimativa de ingestão diária (total e por quilo de peso corpóreo) de ricina considerando os níveis de consumo propostos no bioensaio em cada torta de mamona analisada 80

Tabela 12 - Teor de ésteres de forbol nas tortas e seus respectivos óleos 85

Tabela 13 - Estimativa de ingestão diária (total e por quilo de peso corpóreo) de ésteres de forbol considerando os níveis de consumo propostos no bioensaio em cada torta de pinhão-manso analisada 87

Tabela 14 - Matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD $g.kg^{-1}$) (valor médio ± desvio padrão) e fator de partição (valor médio ± desvio padrão) da fermentação ruminal *in vitro* 90

Tabela 15 - Nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$ $g.MS^{-1}$) (valor médio ± desvio padrão) da fermentação ruminal *in vitro* por 24 horas de incubação 91

Tabela 16 - Produção total de gases e de metano em relação à matéria orgânica verdadeiramente degradada (GP ml.g $MOVD^{-1}$ ± desvio padrão e CH_4 ml.g $MOVD^{-1}$ ± desvio padrão) e eficiência da conversão do metano (Eficiência CH_4% ± desvio padrão) na fermentação ruminal *in vitro*..... 93

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 REVISÃO DA LITERATURA 21

2.1 Questão energética e poluição 21

2.2 Biodiesel 21

2.3 Cadeia de produção do biodiesel: as oleaginosas 23

2.4 Fontes vegetais alternativas para produção de biodiesel 25

2.4.1 Algodoeiro e coprodutos do beneficiamento do algodão 25

2.4.1.1 Gossipol 27

2.4.1.2 Utilização dos coprodutos do algodão na alimentação animal 29

2.4.2 Mamona (*Ricinus communis* L.) 32

2.4.2.1 Ricina 33

2.4.2.2 Utilização da mamona na alimentação animal 35

2.4.3 Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) 38

2.4.3.1 Ésteres de forbol 39

2.4.3.2 Alternativas para utilização do pinhão-manso na alimentação animal 41

2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): moléculas bioativas 44

3 MATERIAL E MÉTODOS 48

3.1 Obtenção e preparo das tortas 48

3.2 Análise do gossipol livre (GL) 49

3.2.1 Extração do gossipol em torta de algodão 49

3.2.2 Detecção/quantificação: cromatografia líquida de alta eficiência 49

3.2.3 Avaliação da metodologia para análise do gossipol 50

3.3 Análise de ricina (RCA) 51

3.3.1 Extração da ricina em torta de mamona 51

3.3.2 Detecção/quantificação: cromatografia líquida de alta eficiência 52

3.3.3 Avaliação da metodologia para análise da ricina 53

3.4 Análise de ésteres de forbol 53

3.4.1 Extração de ésteres de forbol em torta de pinhão-manso 53

3.4.2 Detecção/quantificação: cromatografia líquida de alta eficiência 55

3.4.3 Avaliação da metodologia para análise dos ésteres de forbol 57

3.5 Bioensaio: produção de gases da fermentação ruminal *in vitro* 57

3.5.1 Animais doadores de inóculo 57
3.5.2 Preparo das dietas 58
3.5.3 Obtenção das biomoléculas 58
3.5.4 Preparo do inóculo 59
3.5.5 Produção de gases 59
3.5.6 Análise de nitrogênio amoniacal e extensão do desaparecimento da matéria orgânica (MOVD) 60
3.5.7 Produção de metano 61
3.5.8 Parâmetros para avaliação da fermentação ruminal *in vitro* 62
3.5.9 Delineamento e análise estatística 62

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 66
4.1 Caracterização dos coprodutos obtidos após a prensagem dos caroços 66
4.1.1 Coprodutos do caroço de algodão 66
4.1.2 Coprodutos da mamona 67
4.1.3 Coprodutos do pinhão-manso 68
4.2 Análise do gossipol livre (GL) 70
4.2.1 Detecção/quantificação: cromatografia líquida de alta eficiência 70
4.2.2 Avaliação da metodologia para análise do gossipol livre 70
4.2.3 Teor de gossipol livre em tortas de caroço de algodão 72
4.3 Análise da ricina (RCA) 75
4.3.1 Detecção/quantificação: cromatografia líquida de alta eficiência 75
4.3.2 Avaliação da metodologia para análise da ricina 76
4.3.3 Teor de ricina em tortas de mamona 78
4.4 Análise de ésteres de forbol 82
4.4.1 Detecção/quantificação: cromatografia líquida de alta eficiência 82
4.4.2 Avaliação da metodologia para análise dos ésteres de forbol 83
4.4.3 Teor dos ésteres de forbol em tortas de pinhão-manso 85
4.5 Bioensaio: produção de gases da fermentação ruminal *in vitro* 89
4.5.1 Parâmetros para avaliação da fermentação ruminal *in vitro* 89

5 CONCLUSÕES 96

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 97

REFERÊNCIAS 99

1 INTRODUÇÃO

Várias discussões sobre medidas corretivas e preventivas ao efeito estufa, assim como a crescente demanda mundial por energia, têm impulsionado a busca por fontes de energia mais limpas e renováveis. Em atendimento a essa demanda, as pesquisas sobre a utilização de biocombustíveis estão em franco desenvolvimento.

A inserção do biodiesel na matriz energética brasileira ocorreu por meio da Lei 11.097/2005, que normatiza a adição deste biocombustível ao diesel convencional, provocando um aumento na demanda de produção do óleo vegetal e, consequentemente, uma necessidade crescente de diversificação das fontes utilizadas para a sua produção.

A produção do biodiesel no Brasil ainda apresenta a produção da biomassa como principal custo, sendo que aproximadamente 80% dos gastos encontram-se na cadeia produtiva da oleaginosa para extração do óleo, constituindo um desafio a ser superado pela indústria (ALMEIDA; BOMTEMPO; DE SOUZA E SILVA, 2007).

Por apresentar uma cadeia produtiva fortemente consolidada, a soja ainda é a principal matéria-prima utilizada para a extração do óleo para biodiesel no Brasil. Entretanto, considerando que a utilização desta *commoditie* para produção de biodiesel compete com a indústria de alimentos, a busca por fontes vegetais alternativas para a indústria do biodiesel tornou-se imperativa. Somado a isso, há o fato de que o Brasil conta com ampla extensão territorial com condições edafoclimáticas favoráveis ao cultivo de uma gama de oleaginosas que podem ser utilizadas para a extração do biodiesel.

Com o aumento da produção do biodiesel a partir de matérias-primas vegetais alternativas, serão geradas grandes quantidades de fibras residuais na forma de torta ou farelo, com potencial para utilização na adubação orgânica, na geração de energia ou ainda, na alimentação animal, que constitui uma possibilidade de agregar valor a cadeia produtiva dessas oleaginosas.

Se a alimentação animal constitui um elo entre a indústria do biodiesel e a pecuária, a utilização dos resíduos da extração de óleo para produção de biodiesel na alimentação de ruminantes constitui uma oportunidade de uso sustentável dos recursos dessa cadeia, com potencial não apenas para aumentar a produção animal, como também diminuir a emissão de gases de efeito estufa pela mitigação do metano.

Para que esse potencial de utilização se concretize, é necessário estudar a viabilidade da utilização desses subprodutos na alimentação animal, considerando não apenas o seu valor nutricional, mas também a sua toxicidade efetiva. Embora estudos enfocando o perfil químico e bromatológico de oleaginosas que podem ser utilizadas para a produção de biodiesel venham sendo frequentemente publicados na literatura, ainda é necessário aprofundar a análise destes subprodutos quanto à presença de metabólitos bioativos.

Apesar de existirem alguns estudos na literatura internacional descrevendo os efeitos de moléculas bioativas presentes em novas matérias-primas vegetais para produção de biodiesel, no Brasil ainda há uma carência desse tipo de estudo e nem mesmo os coprodutos da indústria algodoeira, como caroço e tortas/farelos de algodão que já têm sido utilizados na alimentação de ruminantes, foram caracterizados extensivamente quanto à toxicidade proporcionada pelo teor de gossipol.

Após a normatização do biodiesel, houve também o incentivo da produção de outras fontes de óleo vegetal, como o plantio de mamona e pinhão-manso. Entretanto, ambas apresentam biomoléculas tóxicas restritivas ao uso de seus subprodutos na alimentação animal. A busca por alternativas que permitam à utilização desses subprodutos, tornando-os também "coprodutos" da cadeia agroindustrial, atende não só a interesses econômicos, por agregar valor à cadeia produtiva, mas também a uma demanda da sociedade, pela produção de energia limpa e renovável, que permita uma utilização viável de seus resíduos, numa cadeia de produção sustentável.

Para que a análise da viabilidade desses coprodutos possa ser realizada, são necessários também estudos sobre toxicidade e destoxificação, os quais demandam metodologias analíticas precisas e específicas para detecção e quantificação de cada composto tóxico. Apenas de posse do perfil de substâncias tóxicas presentes em qualquer matriz é que a sua atuação biológica pode ser avaliada em estudos *in vitro* e/ou *in vivo*, bem como metodologias para destoxificação podem ser propostas a fim de realizar a adição das tortas à alimentação animal.

Em função do exposto, este estudo teve por objetivo mensurar o teor das moléculas biotivas gossipol, ricina e ésteres de forbol em tortas de caroço de algodão, mamona e pinhão-manso, respectivamente, a fim de avaliar o potencial de utilização desses subprodutos na alimentação de ruminantes, considerando a ação dessas biomoléculas na fermentação ruminal *in vitro* em diferentes níveis de substituição ao farelo de soja do concentrado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Questão Energética e Poluição

Embora os combustíveis de origem fóssil ainda representem a principal fonte de energia, constituem também uma matriz energética não renovável e, portanto, com sazonalidade de preço e oferta, sendo recorrentes os casos de crise de abastecimento de petróleo no mundo.

No Brasil, a crise de 1973 impulsionou a busca por novas fontes combustíveis, como o etanol, com a criação do Programa Nacional do Álcool - PROÁLCOOL, programa de incentivo à produção e utilização do etanol (ALMEIDA; BOMTEMPO; DE SOUZA E SILVA, 2007). Nesse mesmo sentido, o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), instituído em 2004, objetivou atender a uma demanda por um novo sistema para produção de energia sustentável sob os aspectos ambiental, econômico e social (ANP, 2012).

A produção de biodiesel a partir de fontes vegetais alternativas, como a mamona e o pinhão-manso, apresenta como uma das vantagens o fato de favorecer o uso mais eficiente da terra quando comparado com o plantio de outras oleaginosas, como a canola. Da mesma forma, a possibilidade de utilização de áreas de terra degradadas para o plantio dessas oleaginosas e a inclusão do pequeno produtor rural na cadeia de produção do biodiesel, favorecendo a redução das desigualdades pelo desenvolvimento socioeconômico regional, constituem importantes fatores que aumentam o interesse na produção do biodiesel utilizando uma maior diversidade de fontes vegetais.

A utilização do biodiesel também atende a demandas ambientais por ser menos poluente que o diesel convencional e por ser mais rapidamente degradado no ambiente, apresentando, inclusive, um menor potencial de danos ambientais em caso de derramamento durante o transporte marítimo (STEENBLIK, 2006).

2.2 Biodiesel

O Biodiesel é um óleo combustível composto por um mono-alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa derivado de fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005; REEFAT et al., 2008). No Brasil, a Lei n° 11.097,

aprovada pelo Congresso Nacional em 13 de janeiro de 2005, introduziu o biodiesel na matriz energética definindo-o como um biocombustível renovável derivado de biomassa, cujo uso objetiva a substituição parcial ou total dos combustíveis fósseis (SEBRAE, 2008).

O biodiesel apresenta várias vantagens em relação aos combustíveis de origem fóssil. Do ponto de vista social e econômico, a produção do biodiesel apresenta um enorme potencial para inclusão social e desenvolvimento regional no Brasil, por meio da geração de emprego e renda, além da redução das importações de petróleo e óleo diesel.

Entretanto, o principal atrativo do biodiesel refere-se à questão ambiental, por tratar-se de um combustível totalmente renovável e que diminui significativamente a emissão de poluentes provenientes de sua queima, como monóxido de carbono, hidrocarbonetos totais, material particulado e enxofre, reduzindo a emissão dos gases do efeito estufa (RATHMANN et al., 2008; RODRIGUES et al., 2003; USEPA, 2002).

A lei 11.097/2005 também estabelece níveis mínimos de adição de biodiesel ao diesel convencional e o monitoramento dessa adição a partir de 2008, quando se tornou obrigatória a mistura de 2% de biodiesel (B2) ao diesel. A demanda estimada de óleo vegetal para a produção de B3 (a partir de Julho de 2008) durante o período entre 2008 e 2012 foi estimada em um bilhão de litros ao ano. Com o aumento da adição de biodiesel de 5% (B5) ao diesel, a demanda prevista passaria para 2,4 bilhões de litros ao ano (SEBRAE, 2008). Entretanto, com a antecipação da utilização do B5 a partir de 2010, as reivindicações para novos aumentos percentuais da mistura (7, 10, atingindo até 20% ao longo dos anos), foram intensificadas a fim de utilizar a capacidade ociosa das indústrias produtoras (IPEA, 2012). Nesse contexto e para que o PNPB cumpra seu objetivo de inserção social, espera-se uma maior demanda por matérias-primas vegetais alternativas a soja para produção do biodiesel.

Segundo o boletim mensal do biodiesel de dezembro de 2012, existem 65 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela Agência Nacional do Petróleo (ANP), com uma capacidade de produção total autorizada de 20.567,76 m^3 por dia. Destas 65 plantas, 61 possuem autorização para comercialização do biodiesel, correspondendo a 19.009,04 m^3 por dia, sendo responsáveis pelo suprimento do volume de biodiesel estipulado pela demanda compulsória (ANP, 2012).

Atualmente a soja ainda é principal oleaginosa utilizada para produção de biodiesel por ter uma cadeia produtiva consolidada com sucesso no Brasil, o que poderia explicar o perfil de distribuição da produção de biodiesel entre as regiões, já que apenas as regiões que

são as maiores produtoras de soja, como Centro-Oeste e Sul, apresentam oferta superior à demanda compulsória deste biocombustível (ANP, 2012; IBGE 2012).

Em 2007, os países da União Européia e os Estados Unidos eram os maiores produtores de biodiesel, com 1.688 e 6.109 milhões de litros, sendo que o Brasil já ocupava a quarta posição, com 227 milhões de litros (OECD, 2008), passando para a terceira posição em 2011, atrás apenas dos Estados e Argentina.

Para que a produção de biodiesel no Brasil alcance todo seu potencial e ofereça vantagens competitivas para exportação em relação a outros países, a exemplo do que ocorre com o etanol, é necessário explorar novas fontes de oleaginosas para obtenção dos biocombustíveis.

2.3 Cadeia de produção do biodiesel: as oleaginosas

Estima-se que a produção brasileira de grãos para a safra 2012/2013 atingirá 180,20 milhões de toneladas, com um crescimento de 8,4% em relação à safra anterior, que foi de 166,17 milhões de toneladas (IBGE, 2012).

Deste montante estimado, a produção de soja representa um volume de produção de 82,63 milhões de toneladas, cujo aumento em relação à safra 2011/2012 correspondente a 16,24 milhões de toneladas. Em contrapartida, a produção do caroço de algodão teve uma redução em relação ao período anterior, da ordem de 21,8%, passando de 1.877,30 para 1.468,10 milhões de toneladas, refletindo os efeitos da redução em 28% da área de plantio destinada a essa cultura, ao contrário do ocorrido com soja, cuja área destinada ao plantio aumentou 8,8%. Por outro lado, a safra de mamona prevista terá um aumento de 224,6%, passando dos 24,8 para 80,5 mil toneladas, utilizando a mesma quantidade de hectares da safra anterior, indicando um aumento expressivo de produtividade dessa cultura (IBGE, 2012; CONAB, 2012).

Dentre as oleaginosas com potencial para produção de biodiesel, observam-se diferenças quanto ao rendimento do óleo e a geração de resíduos. Na Tabela 1, são apresentados dados para comparação do rendimento do óleo e da geração de resíduos utilizando a extração por solvente e por prensagem, bem como os teores de óleo de algumas oleaginosas em relação à área destinada para o plantio.

Tabela 1 – Rendimento de óleo e resíduos vegetais por tipo de extração

MATRIZ VEGETAL	EXTRAÇÃO POR SOLVENTE				EXTRAÇÃO POR PRENSAGEM			
	Grãos (toneladas)	Óleo (%)	Farelo (toneladas)	Farelo (%)	Grãos (toneladas)	Óleo (%)	Torta (toneladas)	Torta (%)
SOJA	5,263[1]	19	3,476	75	7,692[1]	13	5,714	81
GIRASSOL	2,381[1]	42	1,238	52	2,857[1]	35	1,686	59
MAMONA	2,273[1]	44	1,136	50	2,703[1]	37	1,541	57
AMENDOIM	2,041[1]	49	0,918	45	2,381[1]	42	1,238	52
NABO FORRAGEIRO	3,450[1]	29	2,172	63	...	...	...	...
ALGODÃO	6,100[2]	24	2,600	43	1,800[5]	15	...	...
PINHÃO-MANSO[3]	...	...	...	...	8,000[5]	40	...	...
DENDÊ (PALMA)[3]	...	...	...	...	3,846[4]	26	...	...
CANOLA[3]	...	...	...	...	1,800[5]	38	...	...
GIRASSOL[3]	...	...	...	...	1,600[5]	42	...	...

Fonte: Adaptado de Petrobio (2005); Petrobio (2006); Abdalla et al, 2008 ; Rodrigues Neto (1996)

1 - Refere-se à quantidade de grãos em toneladas necessária para produzir 1 tonelada de óleo.
2 - Refere-se à quantidade de grãos para produzir a quantidade de torta apresentada, supondo a extração por solvente devido ao fato do autor referir-se ao "farelo" e não a torta.
3 - Tipo de extração não especificada pelo autor.
4 - Refere-se à quantidade de cachos de palma necessária para produzir 1 tonelada de óleo.
5 - Refere-se à quantidade de toneladas de grãos produzidos por hectare por ano.

Embora a extração por solvente apresente um maior rendimento de óleo extraído, o custo do processo é mais elevado. Entretanto, de maneira geral, a extração do óleo vegetal gera um grande volume de resíduos, os quais podem ser utilizados visando amortizar os custos de produção. Segundo Gonçalves, Mendonça e Laviola (2010) atualmente no Brasil há uma predominância da extração por esmagamento mecânico (prensagem), resultando em um produto com maior teor de óleo remanescente e gerando o subproduto denominado "torta".

Considerando apenas o aspecto nutricional das matérias-primas vegetais utilizadas para produção do biodiesel, o uso dessas fibras vegetais na alimentação animal apresenta enorme potencial. Entretanto, para que essa utilização se torne viável, são necessários estudos detalhados que caracterizem as tortas e os farelos residuais com relação ao seu potencial tóxico, fornecendo subsídios para sua utilização e manejo adequado, bem como para o desenvolvimento de processos para a destoxificação em escala.

2.4 Fontes vegetais alternativas para produção do biodiesel

Segundo o boletim mensal do biodiesel, divulgado pela ANP, a principal fonte vegetal utilizada para produção de biodiesel ainda é a soja, totalizando 73,44% da produção, seguida pelo óleo de algodão e canola, com inexpressivos 5,02 e 0,13%, respectivamente. O restante da produção tem sido obtido pela utilização principalmente de gordura bovina (17,46%). Quando essa análise é realizada considerando a divisão por regiões, observa-se que no Nordeste, apesar da predominância da soja (40,72%), a porcentagem de óleo de algodão (17,40%) e de outras matérias graxas não especificadas (16,58%) apresenta uma participação mais expressiva em relação ao restante do país (ANP, 2012).

Esse fato provavelmente reflete a questão da disponibilidade de matéria-prima, considerando que o nordeste é a segunda região com maior produção de caroço de algodão, mas é a região com menor produção de soja. Sendo assim, é possível especular que a mamona pode alcançar maior utilização para produção do biodiesel em refinarias do nordeste, considerando o aumento em sua produção estimado para a safra de 2013 (IBGE, 2012).

Assim como a mamona e o caroço de algodão, existem outras oleaginosas cujo cultivo pode constituir uma alternativa para produção de óleo para o biodiesel, como o pinhão-manso, dendê (palma), girassol, nabo forrageiro, babaçu, entre outros. Alguns estudos avaliando a utilização destas tortas e farelos na alimentação animal têm sido realizados e algumas dessas oleaginosas apresentam potencial para utilização de seus coprodutos na alimentação de ruminantes (ABDALLA et al., 2008).

2.4.1 Algodoeiro e coprodutos do beneficiamento do algodão

Embora não exista consenso, acredita-se que o algodoeiro selvagem tenha como centros de origem a Ásia e a América. É uma planta fibrosa e oleaginosa, pertencente ao gênero Gossipium (*Gossypium sp*) e família Malvaceae (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2008).

Apesar de existirem mais de 39 espécies, apenas cinco tem sido significativamente utilizadas para obtenção de fibras: Egípcio, Sea Island, Pima Americano, Asiático e o American Upland, destando-se o American Upland (*Gossypium hirsutum*) e o Pima Americano (*Gossypium barbadense*) (OLIVEIRA et al., 2007; BUAINAIN; BATALHA, 2007).

No Brasil, predominam duas variedades de American Upland (*Gossypium hirsutum*), o algodão arbóreo (*Gossypium arboreum*), inicialmente utilizado no Maranhão a partir de 1750, e o herbáceo (*Gossypium herbaceum*), introduzido comercialmente em São Paulo a partir de 1860. Desde o início de seu plantio, ocorreram várias transformações na distribuição dessas variedades, sendo que nos últimos trinta anos, houve o declínio do cultivo do algodão arbóreo no nordeste e o deslocamento do centro de produção do algodão herbáceo do sudeste para a região centro-oeste. Da mesma forma, ocorreu a substituição gradual do plantio de algodão arbóreo pelo herbáceo, o qual passou a predominar no Brasil a partir de 1998 (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

O algodão apresenta vários coprodutos, provenientes da separação da fibra e extração do óleo da semente. Entre os coprodutos do algodão, a semente coberta com línter é rica em óleo, contém em média 60% de caroço e 40% de fibra e é a principal matéria-prima para a extração de óleo. A torta e o farelo, coprodutos da extração do óleo, são ricos em proteínas de boa qualidade e são empregados na fabricação de rações (ARAUJO et al., 2003).

O beneficiamento de 100 kg de algodão em pluma resulta em 61 kg de caroço, 26 kg de farelo, 8 kg de línter (RODRIGUES NETO, 1996). O caroço integral contém entre 18 e 23% de proteína bruta e de 20 a 21% de óleo, enquanto o caroço sem o línter, coproduto da agroindústria do descaroçamento da pluma do algodão, contém aproximadamente 25% de proteína bruta e 24 % de óleo (ARAUJO et al., 2003; COSTA et al., 2005; PESCE, 2008).

O caroço de algodão também tem sido utilizado como alimento para ruminantes, pois apresenta alto teor de energia devido ao elevado conteúdo de óleo, proteína e fibra. A fibra proporciona elevada digestibilidade ao caroço, favorecendo sua inclusão na dieta de ruminantes (GARCIA, 2005; TEIXEIRA; BORGES, 2005). Entretanto, o caroço de algodão apresenta limitações com relação ao teor de adição na alimentação devido à presença do gossipol, um alcalóide polifenólico presente em plantas do gênero *Gossipium*, e que pode causar intoxicações (HAVARTINE; FIRKINS; EASTRIDGE, 2002).

2.4.1.1 Gossipol

O gossipol ($C_{30}H_{30}O_8$) é um pigmento polifenólico amarelo tóxico encontrado em sementes e hastes durante o desenvolvimento da planta, podendo variar desde 0,002% a mais de 6% (CUNHA, 2006). Com relação ao potencial tóxico, o gossipol apresenta-se em duas formas, a livre, mais tóxica por ser prontamente absorvida, e a ligada, que ocorre após a complexação do gossipol livre com proteínas solúveis e disponíveis no meio. No caroço do algodão, o gossipol total é de aproximadamente 13,2 $mg.g^{-1}$, enquanto o livre varia entre 7 a 8 $mg.g^{-1}$; no farelo, o gossipol total é de aproximadamente 10,6 $mg.g^{-1}$ e o livre, entre 3 e 5 $mg.g^{-1}$ (RANDEL; CHASE JUNIOR; WYSE, 1992).

No Brasil, não existem estudos abrangentes que reportem uma faixa de teor estimado de gossipol em caroço de algodão ou em seus coprodutos. Nos Estados Unidos, estudos de levantamento do teor de gossipol livre em coprodutos da indústria do algodão estimam que este composto esteja presente entre 0,47-7% do peso seco do caroço e em menor teor na torta, entre 0,04-1,77%, entretanto, observa-se que a abrangência desses dados ainda é limitada (EFSA, 2008; OECD, 2009).

No caroço de algodão íntegro, o gossipol livre é o principal pigmento presente. Entretanto, em menores quantidades, existem outros compostos similares ao gossipol, como o *gossipurpurina* e o *gossifulvina. O* gossipurpurina é um pigmento de coloração púrpura e que se decompõe em solução, tornando-se amarelo claro. Já o gossifulvina, apresenta coloração alaranjada e, embora mais estável que o gossipol, é menos reativo, possivelmente inerte (BOATNER, 1944; BALIGA, 1956).

Após o processamento, ocorre a complexação do gossipol livre devido à ligação do grupo aldeído presente na molécula com aminas dos aminoácidos das proteínas do meio. Assim, a maior parte do gossipol presente na torta ou farelo encontra-se na forma ligada, a qual foi denominada inicialmente por Frank E. Carruth de *D-gossipol*, mas ainda coexistem pequenas frações de gossipol livre, gossipurpurina e gossifulvina (BALIGA, 1956; CARRUTH, 1947; STRØM-HANSEN; CORNETT; JAROSZEWSKI, 1989).

Na forma ligada o gossipol apresenta menor digestibilidade, sendo recuperado intacto nas fezes em aproximadamente 85% do teor administrado. De fato, desde a identificação e denominação do gossipol ligado, vários trabalhos demonstraram que a qualidade nutricional do produto processado aumenta com a diminuição do teor de gossipol

livre recuperado em acetona, indicando a conversão deste produto em outro, menos tóxico (CARRUTH, 1947).

É importante observar que o gossipol livre apresenta estereoisomeria em sua molécula, sendo o composto racêmico *(–)-gossipol* o principal responsável pela toxicidade (DECHARY; PRADEL, 1971; CHEN; CHEN; LEI, 1987; WANG et al., 1987).

Depois de metabolizado, o gossipol pode ser oxidado a um metabólito inativo denominado *gossipolone* (YU, 1987). Da mesma forma, outros estudos relatam a existência de compostos provenientes de oxidação, análogos ao gossipol, como o *apogossipol* e o *apogossipol hexaacetato*, ambos tóxicos, embora o apogossipol apresente apenas um terço da toxicidade do gossipol (CLARK, 1928a; JIA et al, 2008; CLARK, 1928b).

Além de diferenças no teor de gossipol entre as espécies e variedades, também existem diferenças na proporção dos atropoisômeros gossipol (+) e (–). O *Gossipium hirsutum*, nativo da América Central e amplamente disseminado pelo mundo, é a espécie de plantio comercial mais comum e apresenta maior proporção de *(+)-gossipol*, enquanto o *Gossipium barbadense*, nativo da América do Sul, possui maior teor de *(–)-gossipol* (CASS et al., 1991, EFSA, 2008).

A exemplo do que ocorre com outros compostos tóxicos, a toxicidade do gossipol difere conforme a dose e tempo de ingestão, perfil nutricional, idade e espécie do animal, e também difere entre animais monogástricos e ruminantes. A DL_{50} (dose letal para 50% dos indivíduos de uma população) é bastante variável, sendo que para ratos, a DL_{50} é de 2.400 $mg.kg^{-1}$ p.c., entre 350 e 600 $mg.kg^{-1}$ p.c. para coelhos e de 550 $mg.kg^{-1}$ p.c. para suínos (ABOU-DONIA, 1976).

O Painel de Opinião Científica sobre Contaminantes na Cadeia de Alimentos (EFSA-Q-2005-222) cita um *NOAEL* (*No-Observed-Adverse-Effect Level*) de 200 mg de gossipol livre, correspondentes a uma ingestão de 4-5 $mg.kg^{-1}$ p.c. por dia para novilhos. Doses de 40 $mg.kg^{-1}$ p.c. por dia para gado não produziram efeitos clínicos, mas a partir de 13 $mg.kg^{-1}$ de p.c. por dia foram observados efeitos subclínicos; em ovelhas, o LOAEL (*Lowest-Observed-Adverse-Effect Level*) é de 2-3 $mg.kg^{-1}$ p.c. por dia (EFSA, 2008).

A toxidez do gossipol provavelmente é devida à interferência na utilização de elementos minerais, ao formar complexos estáveis com cátions como o Fe^{+2} e Fe^{+3}, podendo causar efeitos como fragilidade de eritrócitos, alterar a concentração de hemoglobina no sangue e a absorção de ferro no intestino, provocar a hemólise pela liberação do oxigênio da

hemoglobina, além de aumento na freqüência respiratória, edema pulmonar, hemorragias, infertilidade, diminuição da ingestão de matéria seca, perda de peso e em casos extremos pode levar a morte do animal (PRZYLBYLSKI, 2001; LINDSEY; HAWKINS; GUTHRIE, 1980; ADAMS; GEISSMAN; EDWARDS, 1960).

2.4.1.2 Utilização dos coprodutos do algodão na alimentação animal

Acredita-se que os animais ruminantes apresentem maior tolerância a ingestão de gossipol devido à capacidade da população microbiana presente no rúmen de degradar o gossipol e/ou pela presença de proteínas solúveis, principalmente lisina, as quais seriam complexadas com o gossipol, formando o gossipol ligado. Entretanto, esse possível mecanismo de destoxificação natural é limitado, dependendo da dose e do período de ingestão (SANTOS et al., 2002; REISER; FU, 1962).

Embora ruminantes apresentem menor susceptibilidade ao gossipol do que os animais monogástricos, a ingestão crônica desse polifenol apresenta efeito acumulativo, provocando sinais de toxicidade similares aos da ingestão de concentrações elevadas de gossipol livre na dieta, como por exemplo, para gado leiteiro, equivalentes a uma ingestão de doses acima de 6,6 $mg.kg^{-1}$ p.c. por dia (LINDSEY; HAWKINS; GUTHRIE, 1980; RANDEL; CHASE JUNIOR; WYSE, 1992; CUNHA, 2006).

Segundo Risco, Holmberg e Kutches (1992), quantidades de até 200 ppm de gossipol livre na alimentação de novilhos entre 1 e 120 dias de idade podem ser consideradas seguras, enquanto 400 ppm de ingestão provocam toxicidade em animais com idade inferior a 90 dias e ingestões superiores a 800 ppm resultam quantidade significativa de mortes.

Apesar da menor toxicidade do gossipol para ruminantes, seja pela formação do gossipol ligado favorecida pelo processamento do caroço de algodão ou devido ao mecanismo de destoxificação no rúmen, alguns autores consideram a possibilidade do gossipol ligado ser “reconvertido” a sua forma livre durante o metabolismo, aumentando seu potencial tóxico (BALIGA; LYMAN, 1957; ABOU-DONIA, 1976), assim como a possibilidade desta forma do gossipol também apresentar uma fração capaz de se ligar com compostos metálicos insolúveis, como o ferro (EFSA, 2008).

O caroço de algodão não tem sido utilizado na alimentação de monogástricos, devido à maior susceptibilidade desses animais aos efeitos tóxicos do gossipol. Para avaliar a

utilização de caroço de algodão na dieta de ruminantes, parâmetros como consumo, digestibilidade e ganho de peso têm sido mensurados, bem como a observação de sinais de toxicidade pela avaliação de alterações fisiológicas e bioquímicas.

Para analisar a efetividade da fibra do caroço de algodão integral, Havartine, Firkins e Eastridge (2002) realizaram adições à ração nas proporções de 0, 10 e 15% e concluíram que a fibra em detergente neutro (FDN) do caroço de algodão apresentou 84% de efetividade em relação à silagem de alfafa e que uma adição de até 15% mantém a atividade ruminal em dietas com baixo conteúdo de FDN proveniente das forragens.

Coppock et al. (1985) avaliaram os efeitos da adição de 0, 15 e 30% de caroço de algodão integral na alimentação de vacas em fase de lactação e de 0, 35 e 55% em vacas não prenhas e não observaram sinais de toxicidade provocada pelo gossipol entre os metabólitos sanguíneos pesquisados, embora tenham observado que no grupo com 55% de caroço de algodão ocorreu uma redução no consumo da matéria seca por unidade de peso corporal e metabólico e no consumo de energia. Os autores consideraram que embora o estudo reflita a ingestão em curta duração (14 dias), existe uma boa margem de segurança no uso de elevadas quantidades de caroço de algodão para alimentação de gado leiteiro.

Nikokyris et al. (1991) estudaram os efeitos da adição de torta de caroço de algodão na alimentação de cordeiros com 42 dias de vida, durante um período de 62 dias. Os animais foram divididos em três grupos e tratados com 0, 15 e 30% de torta de caroço de algodão na ração, contendo 0, 0,065 e 0,0102% de gossipol livre, respectivamente. O nível médio de ingestão diária de gossipol obtido entre os tratamentos foi de 65,8 (15% de adição) e 102,8 mg (30% de adição) e não foram observados sinais de toxicidade ou alterações no crescimento dos animais.

Por outro lado, o estudo realizado por Colin-Negrete et al. (1996) concluiu que longos períodos de suplementação com caroço de algodão integral adicionados entre 15 e 30% causam toxicidade em novilhos. Durante os 431 dias de suplementação, os autores observaram aumento da fragilidade de eritrócitos, aumento linear do colesterol, triglicérides e bilirrubina com o aumento da suplementação; em 396 dias, ocorreu a morte de um animal que apresentou sinais compatíveis com falha cardíaca. Após o final da suplementação, ocorreu o decréscimo da fosfatase alcalina, aumento da alanina aminotransferase e diminuição da proporção de aspartato aminotransferase para alanina aminotransferase, demonstrando sinais moderados de toxicidade causada pelo gossipol.

Da mesma forma, para gado leiteiro, Lindsey, Hawkins e Guthrie (1980) realizaram um estudo de 14 semanas, utilizando rações adicionadas de torta de algodão obtidas por prensagem ou extração por solvente, na proporção de 45% de matéria seca e observaram decréscimo no ganho de peso, além de mudanças fisiológicas e presença de gossipol no plasma e fígado, sugerindo a possibilidade de intoxicação mesmo em animais maduros.

A ausência de toxicidade observada no estudo de Coppock et al. (1985) pode ser explicada pelo mecanismo de destoxificação do gossipol livre no rúmen. Entretanto, observa-se que na mesma faixa de adição, mas em um período mais longo de alimentação, como no estudo de Collin-Negrete et al. (1996), foram observados sinais de toxicidade, possivelmente, além das diferenças entre os teores de gossipol, pelo efeito acumulativo desse composto e devido à capacidade de destoxificação ser limitada a presença de proteínas livres no rúmen, como proposto por Reiser e Fu (1962).

Ainda considerando a possibilidade da reversão do gossipol ingerido na forma ligada para a forma livre durante o processo de digestão, no estudo realizado por Mena et al. (2001), observou-se que ao final do experimento os níveis de gossipol presentes no plasma foram maiores do que o esperado considerando a forma de suplementação realizada, sugerindo ter ocorrido à reversão da forma ligada do gossipol contida na torta de algodão ou ainda que a destoxificação do gossipol livre seja menos extensiva no material cominuído do que no caroço de algodão íntegro.

Por outro lado, no estudo realizado por Collin-Negrete et al. (1996) a forma de gossipol contido na alimentação também pode ter favorecido a manifestação de sinais de toxicidade, considerando que o caroço íntegro apresenta o gossipol na forma livre, biologicamente ativa, enquanto o material processado (torta e farelo) apresenta predominantemente a forma ligada do gossipol (GOETSCH; OWENS, 1985).

Assim, observa-se a dificuldade de comparação entre os estudos, considerando as diferenças na forma de administração do gossipol na dieta, pela utilização torta ou caroço, e/ou pela mensuração do teor adicionado, considerando não apenas o gossipol livre ou ligado, mas a proporção de (-)-gossipol e (+)-gossipol. Da mesma forma, Romero, Louvandini e Abdalla (2012) em estudos realizados no Laboratório de Nutrição Animal – CENA-USP, observaram que o caroço de algodão é uma matriz que apresenta grande variabilidade entre os grãos (27-85%) e, dependendo de como o preparo da amostra analítica seja realizado, essa

característica pode proporcionar erros no doseamento do teor de gossipol (em fase de elaboração)[1].

Diante disso, para que a utilização do caroço de algodão na alimentação animal seja realizada com segurança, deve-se considerar o conjunto de fatores que afetam a toxicidade do caroço de algodão ou seus coprodutos, com relação ao teor do gossipol, além das características do animal, como diferenças de susceptibilidade entre as espécies, maturação e estado nutricional do animal. Assim, após serem considerados os demais parâmetros para adequação nutricional da dieta a ser utilizada, a análise do teor de gossipol presente na torta ou caroço de algodão permite que a adição destes produtos na alimentação animal seja realizada em níveis seguros em relação à ausência de toxicidade e manutenção do desempenho animal.

2.4.2 Mamona (*Ricinus communis* L.)

A mamoneira é uma planta oleaginosa da família das Euphorbiaceas que cresce em regiões de clima tropical e subtropical e que apresenta boa tolerância à seca (CHIARADIA, 2005).

É uma planta com características variáveis, cujas cultivares podem variar entre porte anão ou arbóreo, serem perenes ou anuais, com variações no teor e composição do óleo e diferentes cores de folhas, caules e frutos (MILANI, 2008).

Das sementes de mamona é extraído um óleo de excelentes propriedades, muito utilizado como insumo industrial e, mais recentemente, para produção de biocombustível (CHIARADIA, 2005).

Após a extração do óleo, obtém-se como subproduto a torta da mamona, que pode ser utilizada como fertilizante. A produção de torta corresponde a 55% do peso das sementes, variando de acordo com o teor de óleo (35 a 55%) presente na semente e com o processo de extração utilizado (HEMERLY, 1981; SEVERINO, 2005). Embora apresente um alto valor protéico, com 42,5% de proteína bruta, além de 20,04% de fibras e 4,23% de extrato etéreo, a torta de mamona não tem sido comumente utilizada como ração animal devido à presença de substâncias tóxicas e alergênicas (FREIRE; NÓBREGA, 2006).

---

[1] ROMERO, A.C.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A.L. **Fatores que interferem na exatidão da análise do gossipol livre em caroço de algodão.** Em fase de elaboração.

A toxidez da torta de mamona é causada pela presença de uma proteína denominada ricina, um alcalóide, a ricinina, fitohemaglutininas e um complexo alergênico, o CB-1A, que causa reações alérgicas que em humanos compreendem desde sintomas como irritação, vermelhidão e secreção ocular até desencadeamento de crise de asma brônquica (JENKINS, 1963; SEVERINO, 2005).

Dentre os compostos tóxicos, a ricina é uma das fitotoxinas mais potentes e concentra-se no endosperma da semente. Apesar do teor de ricina ser bastante variável, os níveis podem variar entre 1 e 5% do peso seco das sementes (BRADBERRY et al., 2003). Já a ricinina, apresenta uma concentração entre 870 e 1.500 $mg.kg^{-1}$ de sementes e possui menor toxicidade, manifestada basicamente por sintomas neurológicos, enquanto o complexo alergênico representa 12,5% do peso da torta e está presente na semente, no pólen e em partes vegetativas da planta (BELTRÃO, 2002; BANDEIRA et al., 2004).

2.4.2.1 Ricina

A ricina é uma proteína tóxica inativadora de ribossomos do tipo 2 (RIP-2), encontrada no endosperma das sementes de mamona e não está presente no óleo. Essa holotoxina é sintetizada durante a maturação das sementes e sofre uma clivagem em dois polipetídeos, denominados ricina de cadeia A e de cadeia B, os quais são unidos por uma ligação dissulfeto. A cadeia A exerce seu mecanismo de toxicidade por meio da inativação irreversível dos ribossomos, após a clivagem da ligação N-glicosídica no RNA ribossômico 28S, na posição 4324, removendo o resíduo adenina e impedindo o processo de elongamento da cadeia polipeptídica (OLSNES et al, 1975; ENDO; TSURUNGI, 1987).

Uma única molécula de ricina de cadeia A é capaz de inativar 2.000 ribossomos por minuto, entretanto, sua toxicidade só é efetiva mediante a ligação dissulfeto com a ricina de cadeia B. A cadeia B é uma lectina que tem por função realizar a entrada da holotoxina na célula, por sua ligação nos sítios receptores para a galactose (OLSNES; REFSNES; PIHL, 1974; OLSNES et al., 1975; ENDO; TSURUNGI, 1987; STIRPE, 2004).

A toxicidade da ricina varia conforme a dose, espécie e a rota de exposição, podendo variar entre 100 a 1.000 vezes. A letalidade por ingestão é menor do que nas outras rotas de exposição, possivelmente devido a ricina ser pobremente absorvida no intestino, apesar de resistir a ação dos ácidos e enzimas proteolíticas; a toxicidade por ingestão da ricina

caracteriza-se pela erosão da mucosa intestinal, que pode provocar perda massiva de fluidos e choque hipovolêmico (SCHEP et al., 2009).

Em estudos com camundongos, os sintomas da ingestão da ricina iniciam-se após 2 horas, entretanto, em outras espécies, os sintomas podem aparecer entre 12 e 18 horas, evoluindo num período de 2 a 3 dias (OLSNES, 2004; AUDI et al., 2005). Em ratos, a DL_{50} por via oral é de 3 a 5 $\mu g.kg^{-1}$ p.c., provocando a morte em até 60 horas após a ingestão; para coelhos, a DL_{50} é de 500 $\mu g.kg^{-1}$ p.c., enquanto em humanos, a dose letal estimada é de 1 a 20 $mg.kg^{-1}$ p.c. (AUDI et al., 2005; EFSA, 2008).

De maneira geral, a ricina causa hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e estresse oxidativo. Os sintomas incluem inapetência/anoxeria, apatia, mal-estar geral, diarréia mucossanguinolenta, dor abdominal, distúrbios hidroeletrolíticos, oligúria, nefrite e insuficiência renal, cianose e morte por colapso cardiorrespiratório (FERNANDES et al., 2002; EFSA, 2008).

Apesar de apresentar algumas aplicações na área da medicina, constituindo parte de uma imunotoxina no tratamento de pacientes com câncer, a ricina, também conhecida como “composto W”, é considerada como uma potente arma biológica pelo Center for Disease Control - CDC, devido à dificuldade de inativação e ausência de antídotos. Para avaliar a presença de ricina em amostras de urina, o CDC tem realizado análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando a ricinina como biomarcador de exposição, já que a ricina e a ricinina ocorrem sempre conjuntamente nas sementes de mamona (FRANKEL et al., 1996; CDC, 2009).

A ricinina é um alcalóide tóxico também presente nas sementes de mamona, que é pouco afetado por tratamentos térmicos e apresenta sintomas de intoxicação semelhantes aos da ricina, tais como, vômitos, diarréia sanguinolenta, dor abdominal intensa, taquicardia, convulsões e morte (BRITO, 2005). Apesar da toxicidade semelhante à ricina, a presença de ricinina na torta de mamona apresenta menor importância em comparação com a ricina devido à sua baixa concentração, em torno de 0,3-0,8 % nas sementes (CARLSON; KALIMULLAH, 2007).

Considerando sua toxicidade, a torta de mamona não tem sido utilizada para alimentação animal, exceto em condições especiais, nas quais se realiza a destoxificação da torta ou em experimentos com ensaios biológicos, utilizando doses subletais ou pré-imunização.

2.4.2.2 Utilização da mamona na alimentação animal

Vários trabalhos foram realizados visando obter uma destoxificação eficiente da torta de mamona, entretanto, ainda não foram obtidos resultados satisfatórios para aplicação em escala industrial (SEVERINO, 2005; FREIRE; NÓBREGA, 2006).

Visando a obtenção de metodologias para destoxificação da torta de mamona, diversos estudos foram realizados desde o início do século XX. Em 1929, Carmichael publicou o primeiro relato com resultados substanciais, os quais serviram de ponto de partida para os estudos posteriores; a inovação de Carmichael também consistiu em preconizar que a ricina apresentava dois tipos de efeitos independentes, a toxicidade e a capacidade de aglutinação (BALINT, 1974). A capacidade de aglutinação havia sido relatada por Stillmark em 1888, quando após testar extratos de mamona em células sanguíneas e observar a ocorrência de aglutinação, supôs ser esse o fator de toxicidade da mamona (EFSA, 2008).

Entretanto, observa-se que havia uma série de incertezas com relação ao mecanismo de toxicidade da ricina, que dificultavam a avaliação da eficácia dos resultados obtidos até então. Ainda na década de 1970, trabalhos como o de Fuller et al. (1971) relataram que a ricina poderia ser facilmente destruída por aquecimento, contudo, a forma utilizada comumente para avaliar a eficiência da destoxificação era o teste de hemaglutinação, o qual ainda era considerado como um fator indicativo da toxicidade da ricina. Em 1973, Lugnier e Dirheimer demonstraram que a ricina é uma substância com propriedades diferentes das fitohemaglutininas, portanto a capacidade de hemaglutinação deve-se a outra toxina presente no endosperma da mamona, a RCA120, que não apresenta atividade citotóxica direta, mas possui afinidade pelas células vermelhas do sangue, causando a hemaglutinação e hemólise (PINKERTON et al., 1999).

A partir da década de 1980, estudos como os realizados por Endo e Tsurugi (1987) e Endo et al. (1987) começaram a desvendar os mecanismos de atuação da ricina e favoreceram a melhor compreensão de sua toxidez. Desde então, foram propostos métodos físicos, químicos e combinações entre eles, visando a destoxificação da mamona (AUDI et al., 2005; BARNES; BALDWIN; BRAASCH, 2009).

Embora a ricina purificada possa ser inativada por aquecimento a 80°C por uma hora em solução aquosa, esta fitotoxina requer períodos e/ou temperaturas maiores quando presente na torta de mamona ou nas sementes cruas (AUDI et al., 2005).

Em um estudo sobre destoxificação, Anadam et al. (2005) relataram que a ricina pode ser totalmente destoxificada em escala laboratorial realizando a autoclavagem a 15 psi por 60 minutos ou a adição de uma solução de hidróxido de sódio (40 ppm) durante 8 horas.

Entretanto, um estudo anterior de Jenkins (1963) relatou que a autoclavagem nas mesmas condições ainda mantinha níveis de toxicidade na torta, considerando a letalidade de animais observada.

Uma possibilidade para explicar a divergência entre os resultados obtidos pode estar na diferença no modo de avaliação da presença residual da ricina, já que Anadan et al. (2005) utilizaram um método instrumental, o qual pode não ter atingido uma sensibilidade baixa o suficiente para detecção de quantidades residuais (traços) de ricina, enquanto Jenkins (1963) realizou um ensaio biológico, com administração intraperitoneal do extrato obtido após a destoxificação.

Barnes, Baldwin e Braasch (2009) também observaram diferenças na eficiência da destoxificação dependendo do tipo de amostra utilizada. Eles testaram amostras de sementes íntegras de mamona, prensadas a frio, prensadas a quente e trituradas. Nos tratamentos com uso de temperatura combinado com hidróxido de cálcio, as respostas obtidas após a fervura e autoclavagem em amostras de torta prensada a frio possibilitaram a eliminação da ricina a partir de 10 minutos. Entretanto, as amostras prensadas a quente já não demonstraram presença de ricina logo após a prensagem. Nos grãos íntegros, a fervura só foi eficiente após 20 minutos, enquanto na autoclavagem, foram necessários mais de 30 minutos. Em sementes trituradas, apenas a autoclavagem foi eficiente, a partir de 10 minutos de tratamento. Os tratamentos químicos com uréia e guanidina-HCl, não reduziram a toxicidade da ricina de cadeia-A nas sementes íntegras ou nas tortas extraídas a frio.

No Brasil, Bandeira et al. (2004) numa revisão de literatura sobre a utilização da torta de mamona relatam que sua utilização para alimentação animal foi avaliada por alguns pesquisadores, com resultados positivos em relação à destoxificação, como por exemplo, o *Lex Protéico*, uma torta de mamona destoxificada produzida na década de 1960 pela "Sociedade Algodoeira do Nordeste Brasileiro – SANBRA", cujo processamento estava protegido por patente.

A partir da década de 1980, observa-se uma ausência de estudos sobre o uso da mamona na alimentação animal, que segundo Severino (2005) pode ser explicado

provavelmente por uma questão econômica, considerando a baixa competitividade da mamona em relação ao algodão no período.

Assim, observa-se que o potencial do uso da torta da mamona como fonte de alimentação animal pode ser atingido se houver a obtenção de um processo adequado para destoxificação. Para tanto, são necessários estudos para determinar a melhor forma de utilização e destoxificação da mamona no cenário atual.

Embora existam estudos visando obter uma variedade de mamona livre de toxicidade, ainda não foram obtidos resultados positivos quanto à eliminação da ricina, considerando a complexidade da produção desta toxina, comandada por vários genes (SUJATHA; REDDY; MAHASI, 2008).

Apesar de ainda não existir uma variedade atóxica de mamona, poucos estudos têm sido conduzidos visando estratégias alternativas para utilização da torta de mamona para alimentação animal, como imunização cruzada ou autoimunização utilizando doses subletais de ricina. Por outro lado, a imunização utilizando anticorpos tem sido testada visando principalmente à proteção humana, considerando a possibilidade da ricina ser utilizada como arma biológica (HEWETSON et al., 1993).

No estudo de Tokarnia e Döbereiner (1997), utilizando bovinos alimentados com doses subletais de ricina administradas em intervalos de aproximadamente 30 dias, foi possível demonstrar que embora os animais tivessem apresentado sinais de toxicidade, como adoecimento de leve a acentuado, a sua recuperação ocorria em alguns dias e eles desenvolviam uma espécie de resistência a doses mais elevadas, não apresentando mais sinais de toxicidade. Comparativamente, outros animais que receberam apenas as doses mais elevadas de ricina (6.000 $mg.kg^{-1}$ de sementes esmagadas) morreram após 4 dias da ingestão. Já na avaliação de imunidade cruzada entre a ingestão de sementes de *Ricinus communis* e *Abrus precatorius*, os autores verificaram que apenas os animais que ingeriram *Abrus precatorius* foram imunes contra a ação tóxica de *Ricinus communis*.

Apesar do interesse na utilização da mamona para produção do biodiesel estar em ascensão, a utilização da sua torta e/ou farelo para alimentação animal ainda é um desafio. Os estudos realizados sobre destoxificação ainda são insuficientes e não demonstram viabilidade econômica em larga escala. Da mesma forma, estudos como o de Tokarmia e Döbereiner (1997) ainda são escassos, sendo este o único artigo encontrado que objetivou avaliar a possibilidade de uso da mamona não destoxificada.

2.4.3 Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)

O pinhão-manso pertence à família das Euphorbiaceas e é uma planta adequada para o cultivo em regiões semiáridas devido a sua rusticidade, resistência às condições adversas de clima e solo e forte resistência à seca (SEVERINO; LIMA; BELTRÃO, 2007).

É uma oleaginosa perene e de crescimento rápido, mas apesar de ser considerada uma planta rústica devido a sua capacidade de adaptação a condições edafoclimáticas marginais, para apresentar alta produtividade também necessita de aplicações tecnológicas como controle de pragas, adubação e práticas de manejo (LAVIOLA; DIAS, 2008).

Dependendo do acesso, a semente do pinhão-manso pode apresentar de 34 a 45% de casca e 55 a 66% de amêndoa, 7 % de água, 27 a 40% de óleo, podendo atingir entre 40 e 60% em sementes decorticadas, amido, albuminóides e materiais minerais (GREEN FUEL, 2008; LIBERALINO et al., 1998).

O óleo extraído do pinhão-manso, assim como a torta resultante da extração do óleo, apresenta toxicidade principalmente devido à presença de ésteres de forbol, mas possui também inibidores de tripsina, lectinas, saponinas e fitatos (MAKKAR et al., 1997). Apesar desta toxicidade, a torta do pinhão-manso é bastante rica em nutrientes e pode ser utilizada como fertilizante ou na alimentação animal, após o tratamento adequado (BECKER; MAKKAR, 1998).

O pinhão-manso apresenta um grande potencial para a produção de biodiesel, considerando tanto as características de cultivo desta espécie quanto o seu teor de óleo. Além disso, o óleo do pinhão-manso apresenta excelentes propriedades de queima, alta viscosidade e ausência de dióxido de enxofre após a queima, emissão de particulados e sulfurados 80% inferiores ao diesel convencional (JONGSCHAAP et al., 2007; BECKER; MAKKAR, 2008).

Entretanto, a utilização da torta do pinhão-manso para alimentação animal requer a sua destoxificação, que pode ser realizada com eficiência em escala laboratorial, mas ainda apresenta um custo elevado, inviabilizando o uso em pequena escala.

2.4.3.1 Ésteres de forbol

Os ésteres de forbol são um grupo de substâncias de ocorrência natural e têm sido obtidos de diversas plantas em três formas esterificadas distintas, associadas a estruturas hidrocarbônicas conhecidas como tigliano, dafnano e ingenano. Esses compostos ocorrem naturalmente em complexas misturas em espécies das famílias Euphorbiaceae e Thymelaeaceae. Esses diterpenóides tetracíclicos foram isolados inicialmente de plantas *Crotom tiglium*, da família Euphorbiaceae, apresentando-se como um poliol tetracíclico enovelado, que na forma esterificada se apresenta como uma série de 11 diésters relacionados nos grupos hidróxi C-12, 13, divididos em fator-A e B. Em 1986, Evans descreve os principais grupos de ésteres de forbol e seus análogos em Euforbiáceas, dividindo-os em três grupos principais de substâncias: os “12-Deoxyphorbol Esters”, “4-Deoxyphorbol Esters” e “16-Hydroxyphorbol Esters” (EVANS, 1986; KINGHORN, 1991).

Os ésteres de forbol apresentam caráter anfifílico e ligam-se aos fosfolipídicos receptores das membranas, modificando sua atividade, com relação a entrada de nutrientes e adesão celular, induzem a transformação do ácido araquidônico e a síntese de prostaglandinas, inibindo a ligação do fator epidérmico de crescimento celular e adesão à superfície dos receptores, alterando, assim, o metabolismo lipídico. São substâncias que causam toxicidade aguda, manifesta por uma resposta inflamatória intensa, e/ou toxicidade crônica, por meio da promoção de tumores pelo mecanismo de ligação e ativação da enzima quinase C, a qual regula o crescimento e diferenciação celular (GOEL et al., 2007).

O tetradecanoil-forbol-acetato (TPA) é um éster de forbol que tem sido extensamente estudado por sua forte atividade promotora de tumores em mamíferos. Considerado o éster mais abundante em *Crotom tiglium*, esse éster foi inicialmente identificado como fator A1 e é reconhecido como um potente promotor de tumores (EVANS, 1986; KINGHORN, 1991).

Apesar de o gênero Jatropha ser predominantemente composto por espécies tóxicas, existem acessos de pinhão-manso com baixos teores de ésteres de forbol, considerados naturalmente atóxicos, entretanto, sua a ocorrência é restrita a algumas regiões do México. Da mesma forma, existem espécies que não possuem ésteres de forbol, como a *Jatropha platyphylla*, entretanto, possuem antinutricionais como fitatos, lectinas e inibidores de tripsina (MAKKAR et al., 1997; MAKKAR; BECKER; SCHMOOCK, 1998; MAKKAR et al., 2010).

Em estudo realizado por Makkar, Aderibigbe e Becker (1998) foram analisadas diferentes variedades de pinhão-manso, uma delas considerada atóxica, a qual apresentou um baixo teor de ésteres de forbol (0,11 $mg.g^{-1}$), enquanto entre as variedades tóxicas, foram encontrados valores elevados, com teor máximo de 2,70 $mg.g^{-1}$ de ésteres de forbol.

A toxicidade dos ésteres de forbol se manifesta com valores diferentes de ingestão de pinhão-manso entre as espécies e depende do extrato, da dose, modo de administração, além da sensibilidade do animal testado (GANDHI; CHERIAN; MULKY, 1995).

Animais como carpas são considerados altamente sensíveis por apresentaram valores mínimos para induzir toxicidade de 15 $mg.kg^{-1}$ de matéria de seca (MS) de extrato de pinhão-manso na alimentação; entre ruminantes, novilhos alimentados com 250 a 1.000 $mg.kg^{-1}$ MS de pinhão-manso numa única ingestão morreram nas primeiras 19 horas, enquanto a ingestão prolongada por 14 dias com 25 $mg.kg^{-1}$ MS de pinhão-manso provocou mortalidade apenas após o 10º dia (AHMED; ADAM, 1979a; BECKER; MAKKAR, 1998).

Já entre ovinos e caprinos, a ocorrência de sintomas como diarréia, dispnéia e desidratação foram observados a partir de 50 a 100 $mg.kg^{-1}$ MS de pinhão-manso na alimentação (AHMED; ADAM, 1979b). Mesmo entre animais aparentemente menos susceptíveis como frangos, a taxa de mortalidade é alta quando a adição de semente de pinhão-manso atinge a proporção de 0,5% na alimentação (EL-BADWI et al., 1992).

Considerando a toxicidade crônica, os ésteres de forbol exercem vários outros efeitos tóxicos, além da atividade promotora de tumores, como a redução de apetite e ingestão de água, diarréia, desidratação, inibição da secreção de leite, necrose, e outros efeitos hemorrágicos em diversos órgãos (GOEL et al., 2007).

Em bovinos, a ingestão de folhas ou ração produzida a partir de plantas contendo ésteres de forbol pode provocar sintomas como anorexia, emagrecimento, diarréia hemorrágica, erupções necróticas no trato gastrointestinal, e a morte pode ocorrer entre 1 e 3 semanas. O contato tópico provoca inflamações na pele, perda de pêlos, inchaço de olhos e boca. A DL_{50} para roedores em ingestão por via oral do óleo de *Jatropha curcas* contendo ésteres de forbol é de 6 $ml.kg^{-1}$ p.c., segundo estudo realizado por Gandhi, Cherian e Mulky (1995).

Cai et al. (2010) realizaram um estudo visando obter valores de DL_{50} para ratos, com administração intragástrica de ésteres de forbol e obtiveram uma DL_{50} de 27,34 $mg.kg^{-1}$ p.c.

para ratos machos, os quais não apresentaram sinais de toxicidade no exame histopatológico na menor dose testada, de 21,26 $mg.kg^{-1}$ p.c.

Apesar do potencial do pinhão-manso para a extração do óleo para biodiesel e do subproduto gerado nesse processo ser uma fonte protéica de boa qualidade para a alimentação animal, a presença de substâncias tóxicas resistentes a tratamentos térmicos, principalmente os ésteres de forbol, é um importante fator limitante que ainda torna sua utilização na alimentação animal em substituição a componentes tradicionais da ração uma prática não trivial.

A expectativa de que a torta do pinhão-manso deixe de ser apenas um "subproduto" e adquira o *status* de "coproduto" na cadeia de produção do biodiesel, pela agregação de valor por sua utilização na alimentação animal, têm impulsionado a realização de estudos visando obter uma destoxificação eficiente e economicamente viável, além de alternativas como a inclusão desse coproduto em proporções que forneçam doses de ésteres de forbol abaixo do limite mínimo de toxicidade.

2.4.3.2 Alternativas para utilização do pinhão-manso na alimentação animal

A utilização do pinhão-manso na alimentação animal pode ser pesquisada sob dois enfoques; o primeiro, ainda pouco investigado, visa avaliar o nível máximo de adição de pinhão-manso que não expresse toxicidade ou no qual essa toxicidade não apresente severidade, enquanto o segundo visa obter uma metodologia eficaz para destoxificação dessa oleaginosa.

Como exemplo do primeiro enfoque proposto, o estudo realizado por Adam (1974) avaliou a toxicidade em ratos utilizando adição de 50, 40, 30, 20, 10, 5 e 1% de sementes de *Jatropha curcas* e verificou mortalidade e toxicidade em quase todos os grupos, exceto no grupo com 1% de pinhão-manso. Os sinais de toxicidade incluíram perda de apetite, diarréia, respiração acelerada, dificuldade em manter a postura corporal, além de lesões no intestino delgado, fígado, rins, coração e pulmões, revelados pela análise histopatológica, além da diminuição do consumo alimentar com o aumento nos níveis de adição.

Embora esse estudo sugira que a adição de 1% de pinhão-manso na ração tenha sido inócua para o modelo animal testado, observa-se que os teores de ésteres de forbol contidos nas rações não foram mensurados, impossibilitando o cálculo da quantidade de ésteres de

forbol ingerida por quilo de peso corpóreo ao dia, o que permitiria uma melhor comparação e avaliação da toxicidade entre os grupos.

Makkar et al. (1997) observaram que o valor nutricional e a quantidade de substâncias com potencial tóxico no pinhão-manso variam conforme a região do plantio. Num estudo comparativo com sementes de pinhão-manso provenientes de diferentes regiões do oeste e leste da África, América do Norte, América Central e Ásia, os autores observaram diferenças tanto em relação ao perfil nutricional quanto em relação ao potencial tóxico destes grãos. As sementes de pinhão-manso provenientes de plantas da Província de Papantla, no México, não apresentaram ésteres de forbol em quantidade detectável.

Da mesma forma, Makkar, Becker e Schmook (1998) observaram algumas linhagens de pinhão-manso atóxico com relação à presença de ésteres de forbol no Estado de Quintana Roo, México, mas essas variedades ainda possuem outras substâncias tóxicas, como a curcina e antinutricionais, como inibidores de tripsina, fitatos e saponinas, as quais devem ser eliminadas antes da utilização na alimentação.

Hass e Mittelbach (2000) estudaram a influência de vários passos do refino do óleo, visando obter uma maior remoção dos ésteres de forbol e observaram que o efeito da degomagem e desodorização foram muito pequenos, mas que a neutralização e a clarificação reduziram significativamente os ésteres de forbol. Foi observada uma redução total de 45% no conteúdo dos ésteres de forbol, passando de 0,31 a 0,22% e de 0,22 a 0,17% entre os processos de neutralização e clarificação. Assim, os autores sugerem que uma combinação entre os processos de extração e de refino do óleo pode ser a resposta para uma destoxificação economicamente viável dos ésteres de forbol.

De fato, como os ésteres de forbol estão concentrados no óleo, processos de extração por solvente são capazes de reduzir a quantidade desses ésteres no farelo de pinhão-manso, considerando a maior eficiência deste processo e menor teor de óleo residual no farelo. Considerando que no Brasil a maior parte do processo de extração realizado ainda é por prensagem, é possível que o teor de ésteres de forbol sejam ainda mais elevados do que os observados em estudos internacionais.

Numa tentativa de destoxificação da torta, Aregheore, Becker e Makkar (2003) testaram 14 tratamentos químicos e aquecimento para inativação das lectinas e dos ésteres de forbol e concluíram que o tratamento realizado com autoclavagem a 121ºC, por 30 minutos e lavagens com metanol forneceu os melhores resultados em relação à destoxificação;

entretanto, observa-se que embora esse tratamento tenha permitido uma redução nos ésteres de forbol a níveis de 0,09 $\mu g.kg^{-1}$, a adição de 16% desse pinhão-manso destoxificado na alimentação animal (ratos) resultou em diminuição no consumo e taxa de crescimento em relação ao grupo controle.

Martinez-Herrera et al. (2006) realizaram um estudo sobre os efeitos de diferentes tratamentos para destoxificação de sementes de pinhão-manso. Dentre os procedimentos testados, o aquecimento úmido a 121°C por 25 minutos realizou a inativação dos inibidores de tripsina, enquanto a extração por etanol seguida por irradiação diminuiu os níveis de saponina quando associada a irradiação e diminuiu consideravelmente a atividade das lectinas além de ter reduzido em 97,9% a quantidade de ésteres de forbol, quando associada ao tratamento com 0,07% de $NaHCO_3$. A utilização de irradiação com 10 kGy apresentou apenas uma leve redução no teor de fitatos.

Devappa e Swamylingappa (2008) avaliaram a presença de compostos tóxicos em isolados proteicos de pinhão-manso, num processo de obtenção do isolado que envolve a alcalinização, destilação a 92 ±2°C, precipitação isoelétrica e secagem a 180°C. Todos os compostos tóxicos presentes foram reduzidos entre 85 e 97% e não foram detectados ésteres de forbol, sugerindo que esta metodologia tem grande potencial de aplicação para obtenção de isolado protéico.

Ainda buscando uma metodologia eficiente para destoxificação combinando tratamentos químicos aliados a temperatura, Rakshit et al. (2008) realizaram um estudo para avaliar um processo com passos de alcalinização, redução de partículas, seguido de autoclavagem a 121°C por 30 minutos e secagem a 90°C, seguido de moagem. Embora tenha ocorrido uma redução de cerca de 90% no teor inicial de ésteres de forbol, todos os animais apresentaram os sinais clássicos de intoxicação, como redução do apetite, diarréia, perda de peso, além de mortalidade de alguns animais.

Nesse estudo, chama a atenção o fato, ressaltado pelos autores, de que os animais que receberam as tortas tratadas morreram quase que simultaneamente aos que receberam a torta sem tratamento, mesmo tendo recebido um teor de ésteres de forbol mais de dez vezes menor. Os autores sugerem a possibilidade de a toxicidade ter sido causada por outro fator que não os ésteres de forbol, entretanto, é possível especular a respeito de uma modificação estrutural na molécula, o que poderia impossibilitar a correta quantificação dos ésteres de forbol com a técnica utilizada ou, ainda, que o próprio tratamento térmico tenha favorecido a formação de algum composto com igual ou maior potencial tóxico do que os ésteres de forbol.

Kumar et al. (2010) publicaram um estudo propondo uma metodologia que seria capaz de realizar uma destoxificação total, mas o processo não foi totalmente descrito por estar aguardando a aprovação do registro de patente. Nesse estudo, após o descascamento e desengorduramento, a extração dos ésteres de forbol foi realizada utilizando solventes orgânicos (não descritos), seguidos de autoclavagem a 121ºC por 15 minutos para inativação de tripsinas e lectinas. A torta resultante foi testada em carpas e os resultados de ingestão de alimentos, crescimento e utilização de nutrientes foram semelhantes entre o grupo teste e controle, não sendo observados sinais de toxicidade.

Apesar das metodologias para destoxificação propostas, não há, até o presente momento, nenhum método que torne o pinhão-manso efetivamente atóxico e que seja economicamente viável.

No Brasil, a Embrapa Agroenergia tem buscado alternativas como a realização de pesquisas para identificar materiais genéticos cujos grãos não apresentem toxidez, visando posterior incorporação desta característica em cultivares comerciais. Além disso, processos de destoxificação também estão sendo estudados, utilizando extrusão termoplástica, lavagem com solventes e biotransformação, visando à realização de bioensaios para avaliar se a torta e/ou farelo do pinhão-manso poderão ser utilizados na alimentação animal (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009).

2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): moléculas bioativas

A análise destas biomoléculas tem sido realizada através de técnicas como a eletroforese e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A cromatografia é uma excelente técnica para separação de compostos e tem sido muito utilizada devido à alta sensibilidade e eficiência. Entretanto, a princípio a CLAE não é uma técnica eficiente para identificação de compostos desconhecidos, exceto se for acoplada a detecção por espectrometria de massas.

Com a utilização de técnicas espectrofotométricas, como a utilização de detectores de arranjo de fotodiodos (DAD), a CLAE torna-se uma ferramenta extremamente útil tanto para a quantificação quanto para a identificação de compostos cuja presença tenha sido descrita em determinada matriz, com a confirmação da identidade dos compostos por

comparação com espectros de padrões analíticos adicionados a biblioteca do software responsável pela automação dos resultados obtidos.

Desde a primeira descrição de um procedimento para isolamento do gossipol por Marchlewski, em 1899 (ADAMS; GEISSMAN; EDWARD, 1960), inúmeros estudos têm sido realizados a fim de estabelecer uma metodologia para extração desse composto, mas nem todos os métodos apresentam exatidão satisfatória.

Desde o início dos estudos sobre gossipol, diversos solventes têm sido avaliados para realizar a melhor extração deste composto (HALVERSON; SMITH, 1934; HALVERSON; SMITH, 1937). Baliga (1956) descreve estudos relatando o rompimento dos vacúolos de gossipol na presença de solventes polares de baixo peso molecular, como por exemplo, acetona, etanol, éter, clorofórmio e água. Embora a água possa romper os vacúolos, ela não é capaz de dissolver o gossipol, assim, Pons e Eaves (1967) testaram diferentes proporções de água e acetona, e obtiveram os melhores resultados utilizando entre 25-30% de água.

A American Oil Chemist´s Society – AOCS, publicou o método para extração de gossipol livre (AOCS Official Method Ba 7-58), utilizando acetona e água como solvente, e ele tem sido utilizado como referência para análise de gossipol (AOCS, 1990).

Observa-se que apesar da extração do gossipol ser facilmente realizada, a análise deste composto pode apresentar maior complexidade quando se pretende mensurar qual ou quais os análogos presentes, especialmente considerando suas diferenças em relação ao potencial de toxicidade, talvez por esse motivo a análise apenas do gossipol livre ou total sejam mais comumente realizadas.

Metodologias utilizando espectrofotometria para detecção e quantificação, como o método descrito pela (AOCS, 1990), foram inicialmente os mais utilizados, considerando sua relativa simplicidade (HRON; KUK; WAN, 1996), mas com a disseminação da cromatografia líquida, a espectrofotometria começou a ser substituída, tornando possível separar compostos racêmicos e enantiômeros em sangue, como a metodologia descrita por Wu (1988), que utiliza coluna C18 e detector eletroquímico, obtendo um limite de detecção de 25 $\mu g.l^{-1}$, para o composto racêmico. A partir de então, a utilização de CLAE para análise de gossipol continuou crescendo, tanto para análises em sangue quanto em material vegetal ou rações (LEE; DABROWSKI, 2002; WANG et al., 1992).

Alguns autores descrevem a utilização de cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de gossipol em material vegetal, a maior parte deles utilizando basicamente

coluna de fase reversa C18 e detectores eletroquímicos, ultravioleta (UV) ou com arranjo de fotodiodos (DAD); o sistema de fase móvel é variável, mas de maneira geral são utilizados solventes como metanol, clorofórmio e água (WANG, 1987), solução de ácido ortofosfórico e metanol; (NOMEIR; ABOU-DONIA, 1982; HRON; KUK; ABRAHAM,1990), solução de ácido ortofosfórico e tetrahidrofurano (CHAMKASEM, 1988), metanol e solução de ácido acético (CAI et al., 2004), acetonitrila e água (BENBOUZA et al., 2002), entre outros.

Com relação à ricina, que por apresentar elevada toxicidade não possui níveis toleráveis em material vegetal para ração, poucos são os relatos visando quantificá-la em torta de mamona. Segundo o Painel de Opinião Científica sobre Contaminantes na Cadeia de Alimentos (EFSA, 2008), desde 1980 apenas 25 artigos sobre quantificação química da ricina foram publicados.

De maneira geral, toxinas de origem proteica são usualmente analisadas por técnicas convencionais para proteínas, como a eletroforese.

De fato, a maior parte dos trabalhos de identificação da ricina utiliza técnicas como eletroforese (HINES; BRUEGGEMANN, 1994) e testes de imunoafinidade (POLI et al., 1994, MACKINNON; ALDERTON, 2000). A purificação da ricina é realizada por cromatografia de afinidade, em colunas de sepharose 4B (GRIFFITHS et al., 1995), mas existem relatos de preparo praticamente artesanais, tornando o acesso a essa toxina relativamente fácil, embora na forma não purificada (HUTCHKINSON, 1988).

Na química forense, uma metodologia para identificação e quantificação de ricina e ricinina (normalmente utilizada como biomarcador da presença de ricina) foi descrita por Darby et al. (2001). A identificação das biomoléculas em extrato de semente de mamona foi realizada por CLAE acoplada à espectrometria de massas, enquanto a quantificação da ricina utilizou CLAE com detecção ultravioleta, a 214 nm, com coluna de fase reversa C18 e fase móvel composta por água e acetonitrila, equilibradas com ácido trifluoracético (0,1%). Também utilizando CLAE, mas visando avaliar a mobilidade da ricina e ricinina no solo, Brito e Chierice (2006) realizaram um estudo no qual foi utilizado detector de UV, 315 nm, com coluna C18 e fase móvel composta por metanol:água (30:70, v/v).

Por se tratar de uma família de substâncias, os ésteres de forbol apresentam diversos compostos os quais ainda não foram totalmente descritos em pinhão-manso, principalmente considerando que os acessos brasileiros ainda estão em fase inicial de estudo.

Estudos foram desenvolvidos desde o primeiro isolamento do núcleo forbol, obtido como produto da hidrólise do óleo de *Crotom tiglium*, em 1935 por Bohm, Flaschentrager e Lendle, mas a elucidação da estrutura dos ésteres de forbol permaneceu como um desafio até a década de 1960, quando se estabeleceu que eles seriam compostos por uma complexa mistura de substâncias, as quais passaram a ser melhor conhecidas com a combinação de técnicas espectroscópicas associadas a metodologia química convencional (EVANS, 1986).

A partir de meados da década de 1990, a maioria dos artigos envolvendo quantificação de ésteres de forbol de pesquisa foi realizada pelo grupo de Makkar, realizando a extração por solventes e a quantificação por CLAE, com detecção por arranjo de fotodiodos, coluna de fase reversa C18 e fase móvel composta uma solução de ácido ortofosfórico (85%), acetonitrila e tetrahidrofurano. Na metodologia de Makkar, Siddhuraju e Becker (2007), os picos de ésteres de forbol são somados e relacionados com um padrão analítico (TPA), sendo os resultados expressos como “equivalentes de ésteres de forbol”.

Apesar da existência de estudos visando uma melhor compreensão dessa mistura complexa de substâncias, realizados desde a década de 1960 e com grande avanço a partir dos estudos realizados por Hecker e Evans (HECKER, 1968; EVANS, 1986), ainda existem poucos relatos sobre a quantificação desses compostos e ainda menos estudos de quantificação e identificação (VOGG et al., 1999; HAAS; MITTELBACH, 2002).

A detecção e quantificação de compostos bioativos em produtos que serão utilizados na alimentação animal deve ser realizada com exatidão e precisão, sendo a cromatografia líquida uma técnica eficiente para esse fim, especialmente quando acoplada a técnicas como espectrometria de massas ou com a utilização detectores de arranjo de fotodiodos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e preparo das tortas

Foram analisadas cinco amostras de torta de algodão, quatro de torta mamona (das quais três foram obtidas a partir de sementes íntegras) e cinco de torta de pinhão-manso. As amostras de torta foram obtidas de amostras de sementes de diferentes variedades e/ou de localidades distintas, sendo:

- as tortas de caroço de algodão obtidas a partir de amostras de caroço do ano de 2011, provenientes do estado de Goiás (Goiatuba, Itumbiara, Morrinhos e Turvelândia) e de São Paulo (Leme, 2007-2008);
- as tortas de mamona obtidas em 2012 de sementes da Bahia (EBDA 34 e EBDA 36) e de São Paulo (IAC Guarani e IAC 80);
- as tortas de pinhão-manso obtidas em 2012, a partir de sementes da Embrapa Cerrados, em Brasília-DF (101, 195, 260 e 150) de Campinas-SP (IAC).

As amostras de caroço de algodão foram submetidas ao deslintamento químico das sementes, antes da prensagem para obtenção do óleo (LOPES et al., 2006). Os caroços foram transferidos para um béquer de vidro de 2 litros, imersos na proporção de 1:2 (p/v) em uma solução de ácido sulfúrico 72% e foram agitados com bastão de vidro, permanecendo em contato com o ácido por 20 minutos, até que o línter fosse removido. O excesso de ácido foi retirado do béquer e a massa de caroços foi lavada com 2,5 litros de água destilada (divididos em 5 lavagens de 0,5 litros), até que a água de lavagem não apresentasse coloração. Após uma primeira secagem manual, com papel absorvente, os caroços foram secos em estufa a 55ºC, por 60 minutos e foram armazenados sob congelamento até o momento da prensagem.

Todas as amostras de pinhão-manso foram divididas em duas partes de 150 g cada, sendo uma delas descascada manualmente e pesada (albúmen e cascas) para avaliar o teor de cascas.

Para retirada do óleo, as sementes foram prensadas a frio no Laboratório de Óleos e Gorduras, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ-USP, utilizando

uma prensa hidráulica Carver Laboratory Press. O óleo de pinhão-manso e as tortas obtidas foram congelados até o momento da análise, realizada após 20 dias da extração. As tortas foram moídas em moinho Wiley, com granulometria reduzida a 1 mm.

3.2 Análise de gossipol livre (GL)

3.2.1 Extração do gossipol em torta de algodão

A extração do gossipol livre foi realizada segundo a metodologia de Wang (1987), com modificações na quantidade dos solventes e na cromatografia, descritas a seguir. Para a análise de tortas ou farelos de algodão, foram utilizados 300 miligramas de amostra, aos quais foram adicionados 10 ml de acetona (grau p.a., Synth). A maceração foi realizada *overnight* (16 horas) e a seguir realizou-se a filtração em papel de filtro sob vácuo. O resíduo do funil foi lavado 4-5 vezes, com 2 ml de acetona a cada lavagem. O filtrado foi seco sob fluxo de nitrogênio em banho-maria (40ºC) e redissolvido em 10 ml de clorofórmio (grau HPLC, JTBaker) e ácido acético (grau HPLC, Tedia) (99:1, v/v). Um mililitro do eluato foi coletado e filtrado em membrana filtrante de 0,45 µm (PTFE modificado, Millex®) para posterior análise cromatográfica.

3.2.2 Detecção/Quantificação: cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida foi realizada utilizando um cromatógrafo da marca Agilent modelo 1100, com bomba quaternária, injetor automático de amostras, detector de arranjo de fotodiodos, termostato para coluna e coluna Zorbax C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm. A eluição foi adaptada a partir da metodologia de Wang (1987), sendo realizada em gradiente com fase móvel composta por uma solução de metanol acidificado com ácido ortofosfórico (0,1%) e água (70:30, v/v) na proporção de 80% e clorofórmio (20%), com fluxo de 1,1 $ml.min.^{-1}$. Na Tabela 2 a programação do gradiente de eluição do gossipol é apresentada.

Tabela 2 – Programação do sistema de eluição em gradiente do gossipol

Tempo (minutos)	Metanol 0,1% H_3PO_4 (%)	Clorofórmio (%)	Vazão ($ml.min^{-1}$)
0	80	20	1,1
6	80	20	1,1
7	90	10	1,1
8	80	20	1,1
15	80	20	1,1

O padrão analítico de gossipol (Sigma Aldrich, G8761) foi preparado utilizando clorofórmio:ácido acético (99:1, v/v) como solvente. Foi preparada uma solução estoque contendo 1.000 $\mu g.ml^{-1}$ e a partir desta solução foram realizadas as diluições para construção da curva analítica.

A identificação do pico de gossipol no padrão foi realizada por meio de injeções sucessivas de padrão com concentrações crescentes e da comparação com os cromatogramas obtidos com a injeção da fase móvel e solvente de diluição do padrão/amostras. Foram monitorados os comprimentos de onda 205, 225, 254, 267 e 284 nm, sendo que o comprimento de 254 nm foi utilizado para detecção/quantificação do gossipol. O volume de amostra injetado foi igual a 5 µl e as análises foram realizadas com a coluna em temperatura constante, a 23ºC.

3.2.3 Avaliação da metodologia para análise do gossipol

A especificidade e seletividade das metodologias foram avaliadas por meio da confirmação das identidades dos compostos por cocromatografia, com a adição de concentração conhecida de padrão ao extrato e por meio de testes de pureza dos picos, utilizando um detector de arranjo de fotodiodos.

A precisão foi avaliada pela repetibilidade intra-corridas, com a avaliação do desvio padrão relativo entre 5 repetições de padrões com 2 concentrações, sendo uma concentração alta e outra baixa, tendo como parâmetro a curva analítica. A precisão da metodologia como um todo foi avaliada através da análise do desvio padrão entre 7 extrações adicionadas de padrão numa concentração conhecida.

A faixa de linearidade de resposta do detector foi determinada por uma curva analítica e coeficiente de determinação (R^2). Para construção da curva analítica foram definidos 6 pontos, com concentrações entre 3,25 e 60 $\mu g.ml^{-1}$:

- ponto 1: 3,25 $\mu g.ml^{-1}$ (massa injetada de 0,01625 µg);
- ponto 2: 7,5 $\mu g.ml^{-1}$ (massa de 0,0375 µg);
- ponto 3: 15 $\mu g.ml^{-1}$ (massa de 0,075 µg);
- ponto 4: 30 $\mu g.ml^{-1}$ (massa de 0,150 µg);
- ponto 5: 45 $\mu g.ml^{-1}$ (massa de 0,225 µg);
- ponto 6: 60 $\mu g.ml^{-1}$ (massa de 0,300 µg).

A sensibilidade do método foi determinada considerando o limite de detecção (LD) como sendo 3,3 vezes o valor do desvio padrão (dpr) da menor concentração da curva analítica, dividido pela inclinação da curva. A checagem do valor obtido foi realizada com a fortificação de amostras com concentração de padrão semelhante ao LD calculado (ICH, 2005). O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido como sendo duas vezes o valor do LD.

A exatidão foi avaliada através de testes de recuperação. Foram realizadas 3 repetições com adição 150 µg de padrão analítico. Alíquotas de padrão com concentração que fornecesse a massa de gossipol desejada foram adicionadas sobre 0,3 g de uma amostra de farelo de algodão comercial, com teor de gossipol não detectado. O solvente do padrão foi evaporado em câmara de exaustão e a extração foi realizada na sequência, conforme descrito no item 3.2.1.

3.3 Análise de ricina (RCA)

3.3.1 Extração da ricina em torta de mamona

A extração da ricina foi realizada utilizando 2 g de torta de mamona aos quais foram adicionados 40 ml de solução tampão tris-HCl com pH=8,0 (99%, INLAB). A solução foi agitada em mesa agitadora (shaker) por 3 horas e posteriormente filtrada em papel de filtro. Um mililitro do extrato foi coletado, filtrado em membrana 0,45 µm e transferido para *vial*, para posterior análise cromatográfica (BRITO, 2005).

3.3.2 Detecção/Quantificação: cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida foi realizada utilizando um cromatógrafo da marca Agilent modelo 1100, com bomba quaternária, injetor automático de amostras, detector de arranjo de fotodiodos, termostato para coluna e coluna Zorbax C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 μm. A fase móvel utilizada foi composta por metanol (70%) e água 0,1% de ácido trifluoracético (Vetec) (30%). A eluição foi realizada com um gradiente e a temperatura de coluna foi mantida a 30ºC, com vazão da fase móvel em 0,5 $ml.min^{-1}$. Na Tabela 3 são apresentados os dados da programação do gradiente para eluição da ricina.

Tabela 3 - Programação do sistema de eluição em gradiente da ricina

Tempo (minutos)	Metanol (%)	Água 0,1% TFA (%)	Vazão ($ml.min^{-1}$)
0	70	30	0,5
8	70	30	0,5
10	50	50	0,5
12	70	30	0,5
15	70	30	0,5

O padrão analítico de ricina de cadeia A (Sigma Aldrich, L9514) de 1 mg foi preparado utilizando tris-HCl como solvente. As soluções de padrão para construção da curva analítica foram obtidas a partir do preparo de uma solução mais concentrada (estoque), sendo que as demais concentrações foram obtidas por diluição.

A identificação do pico de ricina no padrão foi realizada por meio de injeções sucessivas de padrão com concentrações crescentes e da comparação com os cromatogramas obtidos com a injeção da fase móvel e solvente de diluição do padrão/amostras. Foram monitorados os comprimentos de onda 205, 214, 230, 254 e 280 nm, sendo que o comprimento 214 nm foi utilizado para detecção/quantificação da ricina. O volume de amostra injetado foi igual a 10 μl.

3.3.3 Avaliação da metodologia para análise da ricina

A especificidade e seletividade da metodologia foram avaliadas por meio da confirmação das identidades dos compostos por cocromatografia, com a adição de concentração conhecida de padrão ao extrato e com a avaliação de testes de pureza dos picos, utilizando um detector de arranjo de fotodiodos.

A precisão da metodologia foi avaliada através da repetibilidade intra-corridas, com a avaliação do desvio padrão relativo entre cinco replicatas de uma amostra de torta de mamona.

A faixa de linearidade de resposta do detector foi determinada por uma curva analítica e coeficiente de determinação (R^2). Para construção da curva analítica, foram definidos 5 pontos, com concentrações 3.050, 7.100, 14.200, 20.000 e 59.810 $ng.ml^{-1}$ de ricina de cadeia A (RCA).

A sensibilidade do método foi avaliada pelo limite de detecção (LD), estabelecido como sendo 3,3 vezes o desvio padrão relativo da menor concentração da curva analítica, dividido pela inclinação da curva (ICH, 2005). O limite de quantificação foi considerado como sendo três vezes o valor do LD.

3.4 Análise dos ésteres de forbol

3.4.1 Extração dos ésteres de forbol em torta de pinhão-manso

Após a prensagem das sementes de pinhão-manso, os ésteres de forbol foram extraídos do óleo conforme descrito por Devappa, Makkar e Becker (2010), com algumas adaptações. Foram utilizados 3 g de óleo em 15 ml de metanol, e após 5 minutos, a mistura foi submetida a agitador magnético sob aquecimento a 55ºC, por 10 minutos. Após a agitação, a mistura permaneceu em repouso por 5 minutos para separação de fases e a fase metanólica foi coletada. O procedimento foi repetido por mais 3 vezes, adicionando mais 10 ml de metanol a cada repetição. A fase metanólica coletada foi reunida para secagem sob fluxo de nitrogênio em banho-maria (<40ºC). O resíduo seco foi redissolvido em 2 ml de metanol e sonicado no ultrassom (QH Kerry Ultrassonics Ltda) por 10 segundos para diluição completa do resíduo aderido ao vidro e filtrado em membrana de PTFE (modificado) de 0,45 µm, sendo armazenado em *vial* no freezer, até o momento da análise.

A extração dos ésteres de forbol em tortas de pinhão-manso foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Makkar, Siddhuraju e Becker (2007). Foram utilizados 2 g de torta de pinhão-manso, aos quais foram adicionados de 15 ml de metanol e submetidos à sonicação por 3 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 8 minutos (5.000 rpm) sob refrigeração e o sobrenadante foi coletado. Esse procedimento foi repetido mais 2 vezes e o volume coletado foi medido e transferido para balão de vidro, visando à secagem no rota-evaporador (temperatura inferior a 40ºC). Ao resíduo seco foram adicionados 2 ml de metanol, seguido por sonicação sob gelo por 4 minutos; o volume total foi coletado e o procedimento repetido 2 vezes. O extrato reunido foi seco sob fluxo de nitrogênio em banho-maria, redissolvido em 2 ml de metanol e centrifugado (11.750 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana filtrante (PTFE modificado) de 0,45 µm, sendo 1 ml transferido para *vial* de 1,5 ml para posterior análise cromatográfica.

Os espectros UV descritos na literatura para os ésteres de forbol foram utilizados como referência para detecção e quantificação desses compostos (HAAS; MITTELBACH, 2000; HAAS; STERK; MITTELBACH, 2002; MAKKAR et al., 2009; DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010). Para confirmação dos picos de ésteres de forbol, foram avaliadas três amostras, sendo uma de torta parcialmente destoxificada, utilizada como controle negativo, uma amostra de óleo (controle positivo) e uma amostra de torta tóxica. Os ésteres de forbol são encontrados em maior concentração no óleo do que na torta, o que proporciona uma diferença de magnitude de seus picos entre essas matrizes; da mesma forma, a redução do tamanho dos picos no mesmo tempo de retenção na amostra destoxificada em relação às amostras tóxicas e a análise espectral, são indicativos de que os picos obtidos correspondem aos ésteres de forbol. Na Figura 1 são apresentados os cromatogramas e espectros da literatura e utilizados como referência para detecção dos ésteres de forbol.

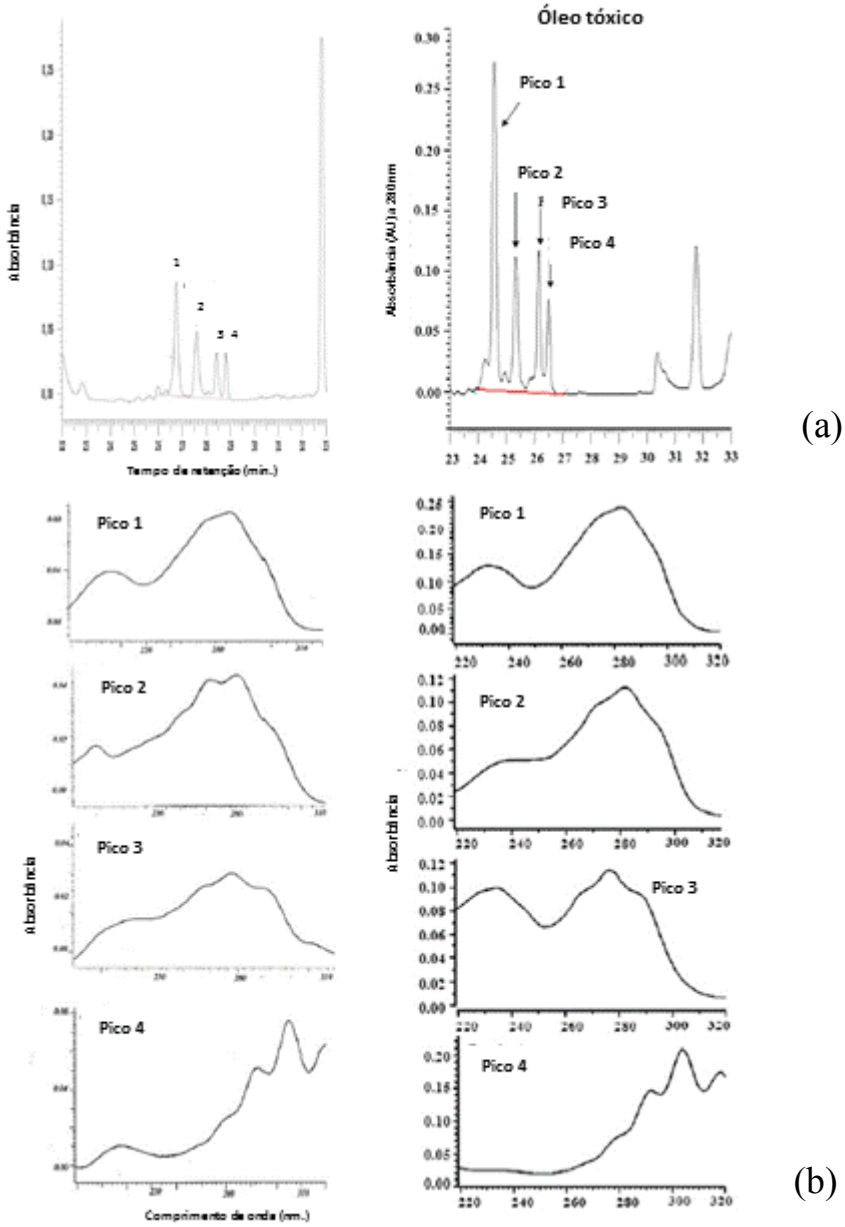


Figura 1 – Cromatogramas de amostras com os picos de ésteres de forbol (a) e espectros dos picos apresentados na literatura (b). (Fonte: adaptado de Makkar et al. (2009), à esquerda; Devappa, Makkar e Becker (2010), à direita)

3.4.2 Detecção/Quantificação: cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida foi realizada utilizando um cromatógrafo da marca Agilent modelo 1100, composto por bomba quaternária, injetor automático de amostras, detector de

arranjo de fotodiodos, termostato para coluna e coluna Zorbax C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm. A eluição foi realizada por gradiente, utilizando como sistema de fase móvel uma solução de ácido ortofosfórico 85% (Merck), acetonitrila (grau HPLC, JTBaker) e tetrahidrofurano (grau HPLC, JTBaker), com vazão de 1,3 $ml.min.^{-1}$ e temperatura constante da coluna a 23ºC. O sistema de eluição foi adaptado da metodologia de Makkar, Siddhuraju e Becker (2007), conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Programação do sistema de eluição em gradiente dos ésteres de forbol

Tempo (minutos)	Ácido Ortofosfórico (%)	Acetonitrila (%)	Tetrahidrofurano (%)	Vazão ($ml.min^{-1}$)
0	60	40	0	1,3
20	75	25	0	1,3
28	100	0	0	1,3
42	100	0	0	1,3
43	0	0	100	1,3
44	0	0	100	1,3
46	60	40	0	1,3
55	60	40	0	1,3

Para a construção da curva analítica, foi utilizado como padrão analítico o 12, 13-diacetato de forbol (Sigma Aldrich, P9143), que foi redissolvido em 1 ml de metanol diretamente no *vial*, fornecendo uma concentração teórica de 1 $mg.ml^{-1}$. Foram preparadas concentrações de 62,5, 125, 250, 500 e 1.000 $\mu g.ml^{-1}$.

Como mencionado anteriormente, devido à ausência de padrões comerciais idênticos aos picos de ésteres de forbol, os espectros e picos de ésteres de forbol descritos na literatura foram utilizados como referência. Da mesma forma, sabendo-se que o óleo de pinhão-manso apresenta maior concentração de ésteres de forbol em comparação com a torta, utilizou-se amostras de óleo como controle positivo para a presença dos ésteres de forbol.

3.4.3 Avaliação da metodologia para análise dos ésteres de forbol

A especificidade e seletividade das metodologias foram avaliadas pelo teste de pureza dos picos. A precisão foi obtida pela análise do desvio padrão relativo, pela repetibilidade intra-corridas de 7 repetições de padrões com 2 concentrações, tendo como parâmetro os pontos extremos da curva analítica.

A faixa de linearidade de resposta do detector foi determinada por uma curva analítica e coeficiente de determinação (R^2). Para construção da curva analítica, foram definidos 5 pontos, com concentrações de 62,5, 125, 250, 500 e 1.000 $mg.ml^{-1}$.

A sensibilidade do método foi determinada pelo limite de detecção, estabelecido como sendo 3,3 vezes o desvio padrão relativo da menor concentração da curva analítica, dividido pela inclinação da curva (ICH, 2005). O limite de quantificação foi considerado como sendo três vezes o valor do LD.

A exatidão foi avaliada por testes de recuperação. Foram realizadas análises em duplicatas, em amostras de óleo e torta, com adição de 200 µg de padrão analítico 12, 13-diacetato de forbol nas amostras de óleo e 100 µg nas amostras de torta, utilizando o padrão analítico 12, 13, 20-triacetato de forbol (Sigma Aldrich, P9768), o qual também foi redissolvido em 1.000 µl de metanol, diretamente na ampola do padrão, fornecendo a concentração teórica de 1 $mg.ml^{-1}$. A adição de padrão (fortificação) foi realizada pelo gotejamento do padrão sobre a amostra e, no caso da torta, secagem natural do solvente de diluição em capela, por 15 minutos.

3.5 Bioensaio: produção de gases *in vitro*

3.5.1 Animais doadores de inóculo

Os inóculos utilizados foram coletados de seis ovinos da raça Santa Inês canulados no rúmen, com peso corporal de 60 ±2,5 kg, mantidos em dieta a base de pastagem braquiária (*Brachiaria decumbes*) e capim elefante (*Pennisetum purpureum*). Os animais tiveram livre acesso a água e mistura mineral e cada animal recebeu 0,7 $kg.100\ kg^{-1}$ de peso vivo de concentrado contendo 20% de proteína bruta.

3.5.2 Preparo das dietas

Considerando a intenção de avaliar apenas o efeito dos três diferentes níveis de adição das três biomoléculas, bem como a substituição parcial (22,2%) do farelo de soja do concentrado pelas tortas contendo as biomoléculas, uma dieta base foi utilizada como substrato em cada tratamento. A dieta padrão para ovinos utilizada no Laboratório de Nutrição Animal – LANA, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, foi adotada como substrato comum a todos os tratamentos, numa proporção aproximada de 70:30 de volumoso/concentrado. A dieta foi composta por: 69,4% de feno de Tifton-85 (*Cynodon sp*), 1,89% de mistura mineral, 17,29% de milho em grão e 11,51% de farelo de soja, com granulometria de 1 mm. Na tabela 5 é apresentada a composição bromatológica da dieta base.

Tabela 5 – Composição bromatológica da dieta base LANA-CENA/USP

Componente	MS 100°C*	MO	PB	FDN	FDA	Lignina
Feno de Tifton	927,94**	908,15	151,38	679,21	450,17	108,01
Concentrado	893,69	961,23	171,83	509,82	59,06	6,26

* MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra digestível neutra; FDA: fibra digestível ácida
** Todos os valores estão expressos em $g.kg^{-1}$ de MS

3.5.3 Obtenção das biomoléculas

Com exceção do gossipol, as biomoléculas foram obtidas realizando extrações destes compostos utilizando as mesmas metodologias citadas para detecção/quantificação. Para o experimento com o gossipol foi utilizado padrão analítico devido à disponibilidade comercial e a fim de evitar a possibilidade de interferência de óleo, considerando que a prensagem foi realizada a frio, proporcionando um maior teor de óleo residual nas tortas.

Dentre as 4 amostras de mamona e 5 amostras de pinhão-manso, foram selecionadas as que apresentaram maior concentração de ricina e ésteres de forbol, respectivamente, para realizar as extrações e obter as biomoléculas. O cálculo das quantidades necessárias de cada biomolécula a ser adicionada nos tratamentos foi realizado considerando a utilização de 3 inóculos com análises em duplicatas, portanto, foram necessárias 6 vezes a quantidade de cada nível de adição das biomoléculas. Sequencialmente, foi estabelecida uma regra de três

para obter a quantidade em gramas de amostra de torta que deveriam ser utilizadas na extração para fornecer a quantidade de biomolécula necessária. Foram realizadas extrações em replicatas, sempre considerando um acréscimo de 30-50% acima do valor mínimo de biomoléculas necessário. Os extratos foram reunidos e concentrados, para serem redissolvidos em etanol, no caso dos ésteres de forbol (e do padrão de gossipol), e em tris-HCl, para a ricina. A escolha dos solventes foi realizada considerando a solubilidade dos compostos e a menor toxicidade do etanol em relação ao metanol.

3.5.4 Preparo do inóculo

Foram coletados aproximadamente 500 ml de cada animal (6 animais), sendo considerado como um inóculo a soma dos inóculos de dois animais. O inóculo foi preparado utilizando as frações líquida e sólida do conteúdo ruminal (1:1), as quais foram coletadas separadamente e misturadas em homogeneizador (mixer) por 10 segundos. A pasta resultante foi filtrada em tecido de algodão a fim de separar a fração sólida. O filtrado (inóculo) foi mantido em banho-maria a 39°C, com dióxido de carbono insuflado continuamente.

3.5.5 Produção de gases

A técnica *in vitro* de produção de gases da fermentação ruminal (THEODOROU et al., 1994) adaptada com sistema semiautomático (BUENO et al., 2005) com transdutor de pressão e armazenador de dados (Pressure Press Data 800, LANA, CENA-USP, Piracicaba/São Paulo) foi utilizada. As leituras manuais dos gases produzidos foram realizadas nos tempos de incubação 4, 8, 12 e 24 horas. Além do grupo controle (70% feno de Tifton-85 e 30% concentrado), foram realizados outros três tratamentos, com ensaios utilizando as biomoléculas extraídas das tortas em três teores adicionados e um teor de substituição percentual do concentrado por torta, totalizando 24 repetições por grupo.

O bioensaio foi realizado a fim de avaliar a atividade *in vitro* das biomoléculas na produção de gases e metano, bem como na degradabilidade da matéria orgânica. A utilização de um tratamento com torta adicionada em substituição a 22,2% do farelo de soja (10 mg de torta) do concentrado objetivou comparar o efeito da biomolécula ligada a seu substrato (torta) em relação ao efeito proporcionado pela biomolécula extraída das tortas.

Foram pesados em saquinhos Ankom (código F57, ANKON Technology Corporation) 0,5 g de dieta base (usada também como controle), utilizados como substrato para os grupos das biomoléculas extraídas das tortas, em seis garrafas de vidro com volume total de 160 ml, para cada um dos três tratamentos dos grupos de biomoléculas testados e para o tratamento com substituição parcial do farelo de soja do concentrado da dieta base pelas tortas de algodão, mamona e pinhão-manso. Além dos tratamentos e do controle, foram preparadas seis garrafas sem substrato (também em duplicata para cada inóculo), utilizadas como branco, e seis garrafas contendo além do branco, os solventes nos quais as biomoléculas adicionadas estavam diluídas (etanol para gossipol e pinhão-manso e tris-HCl para mamona).

Em cada garrafa foram adicionados 50 ml de solução nutritiva e 25 ml de inóculo (BUENO et al., 2005). As garrafas foram vedadas com rolhas de borracha (Bello Glass Inc. Vineland, NJ, EUA), agitadas manualmente para promover uma homogeneização e, em seguida, incubadas em estufa (Marconi MA35, Piracicaba - SP) a 39ºC por 24 horas. Após cada período de leitura da pressão, foram subtraídos os valores médios de gases produzido nas duplicatas sem substrato (brancos), referentes aos grupos para cada um inóculos utilizados, a fim de fornecer o valor líquido da produção de gases. O volume total dos gases produzidos foi calculado multiplicando pelo fator de conversão dos gases (ARAUJO et al., 2011).

3.5.6 Análise de nitrogênio amoniacal e extensão do desaparecimento da matéria orgânica (MOVD)

Após a última leitura, as garrafas foram imersas em água com gelo, a fim de paralisar o processo de fermentação. Foi retirada uma alíquota da solução de cada garrafa para determinar o nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$), analisado pelo método micro-Kjeldahlj (AOAC, 1995). A extensão do desaparecimento da matéria orgânica (MOVD) proporcionada pela fermentação ruminal *in vitro* foi avaliada pela queima do resíduo dos substratos coletados das garrafas, após a lavagem dos saquinhos com solução de detergente neutro para remover resíduos dos micro-organismos aderidos. Os saquinhos contendo o substrato seco foram incinerados em mufla, a 550 ºC por 4 horas, a fim de obter a matéria mineral (MM) e, por diferença, a orgânica verdadeiramente degradada (MOVD).

3.5.7 Produção de metano

Após as leituras do volume total de gases produzidos nos intervalos de tempo de leitura, foram coletados 2,5 ml do volume dos gases em cada garrafa, para análise do gás metano (CH_4). As amostras de gases foram coletadas utilizando seringas plásticas para injeção (5 ml) e esse volume foi armazenado em tubos de ensaio de 12 ml. Após as coletas, as garrafas tiveram os gases remanescentes liberado no ambiente, pela perfuração da tampa plástica com uma agulha de seringa; após a retirada da agulha, as garrafas foram agitadas manualmente antes de retornarem a estufa até o próximo período de leitura. Nos intervalos entre as leituras de gás total e coleta de metano, as garrafas foram recolocadas em estufa, até o procedimento seguinte.

O gás metano (CH_4) foi quantificado por cromatografia gasosa, utilizando cromatográfo Shimadzu GC2014 (Tokyo, Japan), equipado com coluna microempacotada Shincarbon ST 100/120 (1,5875 milímetros OD, 1,0 mm ID, 1 m de comprimento (Ref. 19.809, Restek, Bellefonte, PA, EUA), detector de ionização de chama (FID) e injetor manual. A coluna foi mantida a 60 ºC, enquanto as temperaturas do injetor e detector foram de 200 e 240ºC, respectivamente. Como fase móvel, foi utilizado o gás Hélio, com vazão de 10 $ml.min^{-1}$. A quantificação foi realizada por padronização externa e a curva analítica foi construída nas proporções de 0, 3, 6, 9 e 12%, utilizando como padrão o gás metano com 99,5% de pureza (White Martins Praxair Gases Industrial Inc.).

O cálculo do volume total de metano produzido foi realizado considerando a soma do volume do *headspace* das garrafas com o gás total produzido, multiplicado pela porcentagem de metano obtida para cada amostra (LONGO et al., 2006):

$$CH4\ (mL) = (GP + 85)\ x\ CH4\ \%$$

3.5.8 Parâmetros para avaliação da fermentação ruminal *in vitro*

Os valores líquidos dos parâmetros da produção de gases da fermentação ruminal *in vitro* referentes ao volume total de gases produzidos (GP) e metano (CH_4) foram calculados em relação à matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD).

A porcentagem de metano (% CH_4) em relação ao volume total de gases (GP) foi obtida por uma regra de três, considerando o GP como sendo 100%. A taxa de eficiência da conversão de metano (Eficiência CH_4) foi obtida da mesma forma que a porcentagem de metano, considerando os valores de metano e total de gases produzidos em relação à matéria seca. O fator de partição (FP) foi calculado considerando a relação entre a matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD) e o volume líquido do total de gases produzidos em 24 horas (MAKKAR, 2010).

3.5.9 Delineamento e análise estatística

O delineamento experimental foi totalmente casualizado, utilizando cinco tratamentos, sendo três níveis de adição de cada uma das biomoléculas extraídas das tortas, um nível de torta contendo a biomolécula *in natura* e um grupo controle contendo apenas a dieta base. Foram realizadas três repetições em duplicata para cada tratamento. Os teores adicionados foram calculados a fim de simular a substituição do farelo de soja no concentrado em 1/3, 2/3 e 1 (33,3, 66,6 e 100%) de seu valor, utilizando como referência os teores das biomoléculas contidas em uma das 4-5 tortas das oleaginosas analisadas. Os teores adicionados por experimento foram:

● Experimento I – Gossipol

1) Tratamento 1: dieta base + 0,0207 mg de gossipol.
2) Tratamento 2: dieta base + 0,0414 mg de gossipol.
3) Tratamento 3: dieta base + 0,0621 mg de gossipol.
4) Tratamento 4: dieta base + substituição de de 2/9 (22,2%) do farelo de soja do concentrado por torta de caroço de algodão (contendo 0,0138 mg de gossipol).
5) Controle: dieta base

● Experimento II – Ricina

1) Tratamento 1: dieta base + 0,0045 mg de ricina.
2) Tratamento 2: dieta base + 0,0090 mg de ricina.
3) Tratamento 3: dieta base + 0,0135 mg de ricina.
4) Tratamento 4: dieta base + substituição de 2/9 (22,2%) do farelo de soja do concentrado por torta de mamona (contendo 0,0030 mg de ricina).
5) Controle: dieta base

● Experimento III – Ésteres de forbol

1) Tratamento 1: dieta base + 0,0207 mg de ésteres de forbol.
2) Tratamento 2: dieta base + 0,0414 mg de ésteres de forbol.
3) Tratamento 3: dieta base + 0,0621 mg de ésteres de forbol
4) Tratamento 4: dieta base + substituição de 2/9 (22,2%) do farelo de soja do concentrado por torta de mamona (contendo 0,0138 mg de ésteres de forbol).
5) Controle: dieta base

O resumo do planejamento do bioensaio é apresentado na Tabela 6:

Tabela 6 – Planejamento experimental da produção de gases pela fermentação ruminal *in vitro*

EXPERIMENTOS					
I: Gossipol (mg)		II: Ricina (mg)		III: Ésteres de Forbol (mg)	
T1	DB + 0,0207	T1	DB + 0,0045	T1	DB + 0,0207
T2	DB + 0,0414	T2	DB + 0,0090	T2	DB + 0,0414
T3	DB + 0,0621	T3	DB + 0,0135	T3	DB + 0,0621
T4	DB + torta (0,0138)	T4	DB + torta (0,0030)	T4	DB + torta (0,0138)
C	DB	C	DB	C	DB

T1, T2, T3 e T4 referem-se aos tratamentos testados e C ao grupo controle
DB = Dieta base (70% volumoso, 30% concentrado)

Os parâmetros analisados estatisticamente para avaliação da fermentação ruminal *in vitro* foram: produção líquida (ou seja, valores corrigidos pelo branco do experimento) do volume total de gases em relação à matéria orgânica verdadeiramente degradada (GP ml.gMOVD^{-1}), da produção de metano em relação a matéria orgânica verdadeiramente degradada (GH_4 ml.gMOVD^{-1}), taxa de eficiência de conversão do metano (Eficiência CH_4%), fator de partição (FP), nitrogênio amoniacal (N-NH_3) e matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico SAS (2009), versão 9.1. Os parâmetros foram relacionados com os tratamentos dos grupos de biomoléculas em análise de regressão linear simples e quadrática utilizando o procedimento REG (proc reg). A análise de variância foi realizada pelo teste ANOVA e o teste de Dunnett foi utilizado para comparação das médias dos tratamentos de cada grupo em relação ao controle.

O nível de probabilidade de 5% foi adotado como critério para aceitação ou rejeição no teste de hipótese. Os tratamentos foram analisados pelo procedimento GLM, a fim de avaliar possíveis diferenças entre os tratamentos e o controle de cada experimento.

O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

Sendo:

Y_{ij} = valor observado para a variável dependente (GP ml.MOVD^{-1}, Eficiência CH_4, FP, N-NH_3, MOVD) no *i*-ésimo tratamento (*i* = 1, ..., 5) em sua *j*-ésima repetição (*j* = 1, 2, 3);

μ = média de todos os valores possíveis da variável dependente;

t_i = efeito do tratamento i em Y_{ij} ($t_i = m_i - m$);

e_{ij} = erro experimental associado a Y_{ij} ($e_{ij} = Y_{ij} - m_i$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos coprodutos obtidos após a prensagem dos caroços

4.1.1 Coprodutos do caroço de algodão

O deslintamento proporcionou a retirada parcial da casca do caroço, deixando apenas a película que recobre o albúmen, conforme pode ser observado na Figura 2.

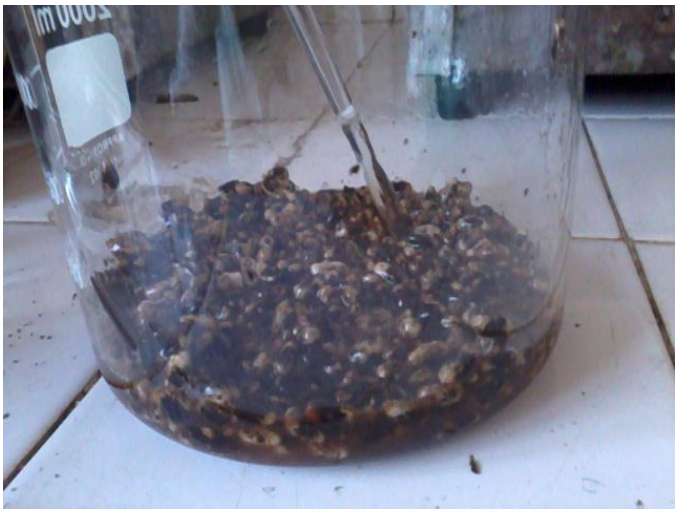


Figura 2 – Deslintamento do caroço de algodão em ácido sulfúrico

Apesar da padronização do tempo de contato entre o ácido e os caroços de algodão, o deslintamento não foi homogêneo entre os caroços de uma mesma amostra ou entre as cinco diferentes amostras, o que pode ser verificado observando as diferenças na remoção da película que recobre os grãos (Figura 2). Após a prensagem dos caroços, a torta obtida foi congelada até o momento do preparo para extração do gossipol.

Considerando a impossibilidade de reprodução das condições industriais para obtenção do óleo de caroço de algodão, optou-se por padronizar a obtenção das tortas dos três tipos de oleaginosas com a realização de prensagem mecânica, citada por Gonçalves, Mendonça e Laviola (2010) como sendo a forma predominante de extração de óleo no Brasil.

Entretanto, observa-se que para o caroço de algodão, a prensagem mecânica a frio não constitui um procedimento eficiente para obtenção do óleo. A extração industrial do óleo

de algodão é um processo que utiliza aquecimento úmido dos grãos e favorece a solubilidade das miscelas no albúmen, permitindo um maior rendimento de óleo na prensagem, e também uma maior degradação e/ou complexação do gossipol pela aplicação de calor. Da mesma forma, tanto na prensagem mecânica quanto no processo industrial, o esmagamento dos caroços por si só já permite o extravasamento do gossipol contido nos vacúolos, favorecendo a ocorrência de complexação desse gossipol livre com as proteínas presentes no grão.

4.1.2 Coprodutos da mamona

As tortas de mamona foram obtidas por prensagem das sementes a frio (sem a retirada do tegumento), com exceção da amostra IAC 80, que foi obtida previamente prensada.

Na Figura 3 são apresentadas as sementes de mamona utilizadas e os óleos de caroço de algodão e de mamona, permitindo visualizar diferenças quanto à coloração, turbidez e rendimento desses óleos.

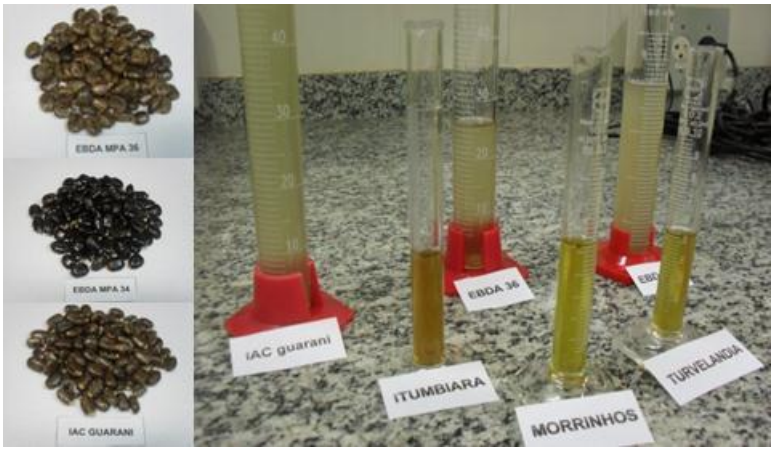


Figura 3 – Sementes de mamona (à esquerda) e óleos obtidos na prensagem dos caroços de algodão (à direita, à frente) e de mamona (à direita, ao fundo)

4.1.3 Coprodutos do pinhão-manso

As amostras de torta de pinhão-manso para análise dos ésteres de forbol foram obtidas de sementes com casca, das quais foram calculados os teores de óleo. A proporção de cascas também foi avaliada e os resultados do teor de óleo e de cascas são apresentados na Tabela 7.

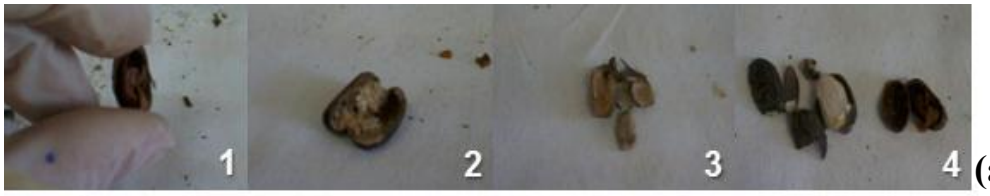
Tabela 7 – Caracterização das sementes de pinhão-manso quanto ao peso médio por semente e porcentagem de cascas

Amostras	Peso das sementes (g)	Número de sementes	Peso médio das sementes (g)	Cascas (%)
Embrapa 101	150,02	236	0,64	35,88
Embrapa 195	150,25	282	0,53	44,95
Embrapa 260	150,34	231	0,65	33,51
Embrapa 150	150,06	261	0,57	35,47
IAC	150,25	237	0,63	38,77

Durante o descascamento das sementes, foram observadas diferenças quanto à dureza das cascas e o aspecto dos albumens entre as amostras.

A amostra Embrapa 150 apresentou maior homogeneidade no tamanho do albúmen na observação visual e ausência de amostras mofadas ou grãos ocos (contendo apenas a casca). O Com relação à dureza das cascas, a amostra IAC apresentou menor resistência à quebra em comparação com as demais amostras.

As amostras 101 e 195 apresentaram visualmente maior heterogeneidade no tamanho dos grãos sem casca, além de presença de grãos ocos ou com albúmen fibroso e forte odor de mofo e com aspecto escurecido (Figura 4a). A amostra 260 apresentou cascas menos resistentes do que as demais, com albumens de tamanhos homogêneos e com ausência aparente de fungos (Figura 4b).



(a)

(b)

Figura 4 – (a) Sementes de pinhão-manso com albúmen escurecido (1), albúmen granuloso (2), albúmen acinzentado e comparação entre semente com albúmen e sem (4); (b) Sementes de pinhão-manso com aspecto normal (1 e 2) e albumens considerados com aspecto homogêneo.

A Figura 5 apresenta uma amostra de semente com casca, utilizada para obtenção da torta para análise dos ésteres de forbol, as tortas obtidas após a prensagem de sementes descascadas (esquerda) e com casca (direita) e o aspecto dos óleo obtidos nas extrações das sementes com casca.

Figura 5 – Amostras de sementes Embrapa (esquerda), tortas sem e com casca (centro) e aspecto do óleo obtido (direita)

4.2. Análise de gossipol livre (GL)

4.2.1 Detecção/Quantificação: cromatografia líquida de alta eficiência

A injeção do padrão de gossipol forneceu o cromatograma com tempo de retenção entre 6,6 e 7 minutos, com espectro obtido a 254 nm, como apresentado na Figura 6.

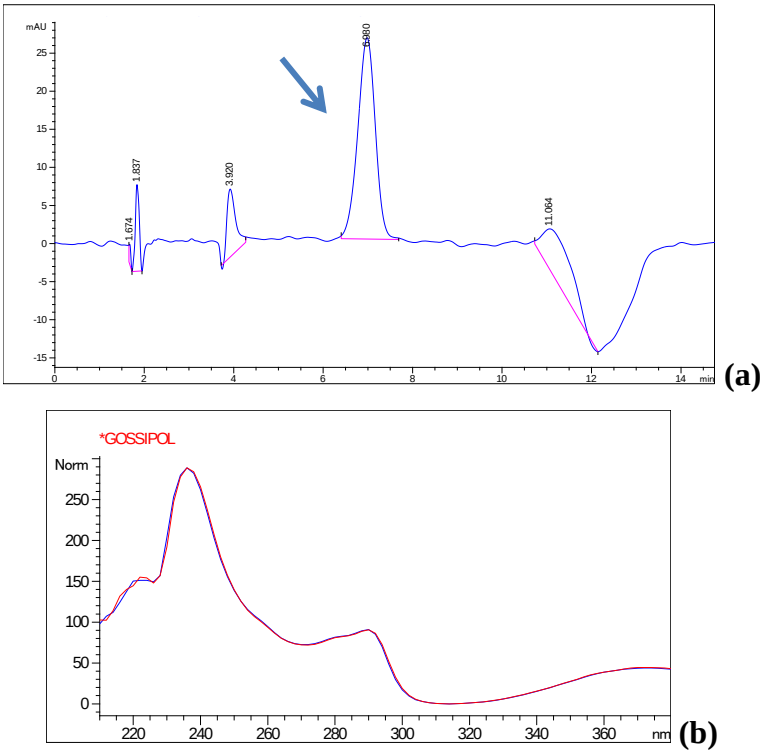


Figura 6 – (a) Cromatograma de amostra de torta de algodão (pico do gossipol em destaque). (b) Espectro UV do gossipol obtido a 254 nm

A detecção e quantificação do gossipol livre nas amostras de torta de caroço de algodão foram realizadas utilizando como referência o espectro UV obtido a 254 nm (Figura 6b), juntamente com o tempo de retenção característico do composto.

4.2.2 Avaliação de metodologia para análise do gossipol livre

A cocromatografia e o teste de pureza do pico de gossipol demonstraram que a metodologia foi específica para a identificação do composto. A adição de uma alíquota de

padrão com concentração conhecida produziu um aumento proporcional na área do pico de gossipol, no mesmo tempo de retenção, pela sobreposição dos picos de gossipol do padrão e do extrato da amostra. O teste de pureza identificou a ausência de compostos coeluídos no mesmo tempo de retenção do pico de gossipol, expresso pelo fator de pureza do pico superior ao limite do teste. A Figura 7 apresenta os cromatogramas da amostra utilizada para o teste de cocromatografia (Figura 7a) e o teste de pureza (em destaque, Figura 7b) aplicado ao pico com adição de padrão (cocromatografia).

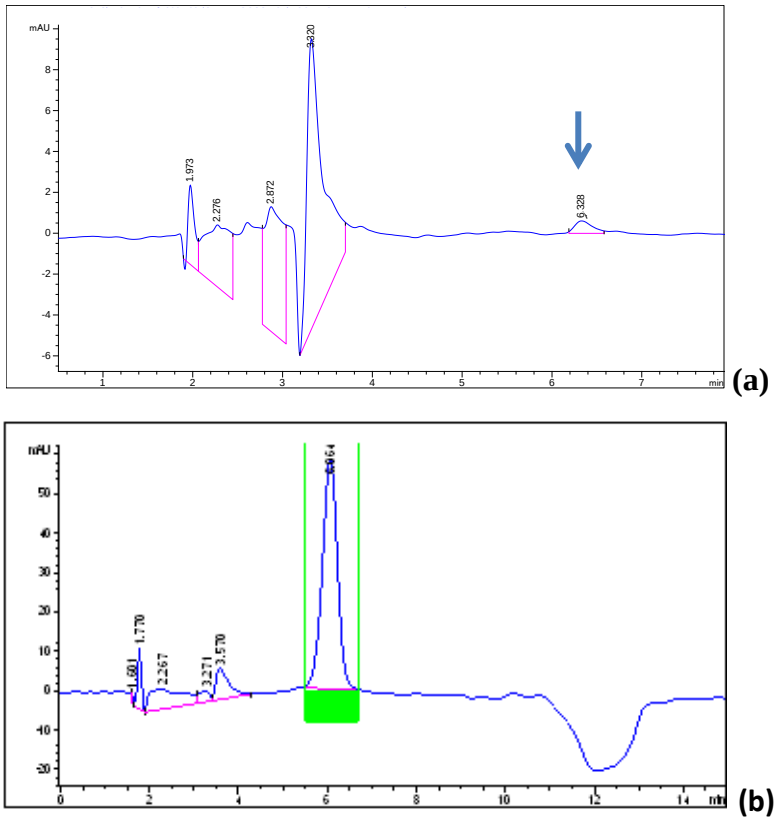


Figura 7 - (a) Cromatograma de amostra de torta de caroço de algodão, com pico de gossipol presente naturalmente na amostra em destaque; (b) Cromatograma de amostra de torta de caroço de algodão com adição de padrão de gossipol (cocromatografia). O destaque em verde indica a pureza do pico de gossipol.

A precisão cromatográfica avaliada pela repetibilidade intra-corridas, forneceu um desvio padrão relativo de 2,91 e 2,63, para concentrações de 3,25 $\mu g.ml^{-1}$ e de 80 $\mu g.ml^{-1}$, respectivamente. A precisão abrangendo a metodologia de extração e cromatografia forneceu

um desvio padrão relativo (dpr) de 7,52, inferior a 16 e, portanto, demonstrando adequação segundo o valor estimado pelo cálculo de Horwitz para a faixa de concentração analisada, da magnitude de partes por milhão (10^{-6}) (INMETRO, 2011).

A curva analítica forneceu um R^2=0,9938, adequado para utilização na quantificação das amostras. O gráfico da curva analítica do gossipol está apresentado na Figura 8.

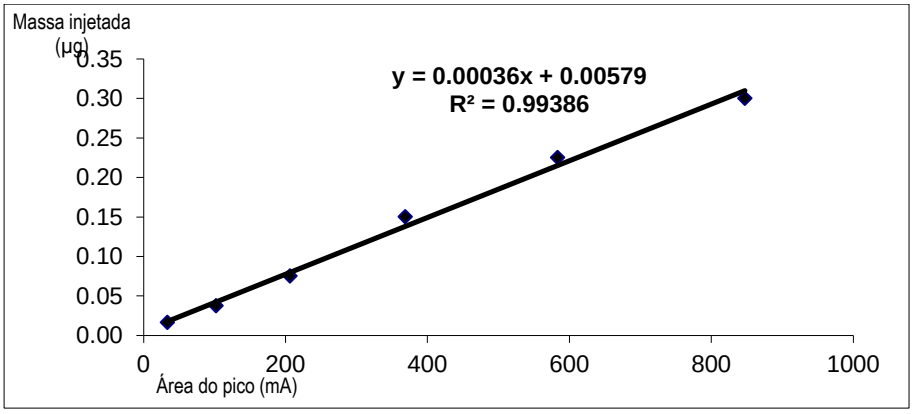


Figura 8 – Curva analítica do gossipol

O limite de detecção (LD) do método estimado foi de 0,69 µg.ml^{-1}. Entretanto, considerando que o menor ponto da curva analítica (3,25 ug.ml^{-1}) apresentou uma altura pequena, optou-se por testar o mesmo limite relatado por Cai et al. (2004), de 3 µg.ml^{-1}, o qual foi atingido. Assim, o limite de quantificação foi estabelecido em 6 µg.ml^{-1}, correspondente a duas vezes o LD. A exatidão foi avaliada por testes de recuperação, os quais forneceram um valor médio de 91,2% ±5,2.

4.2.3 Teor de gossipol livre em tortas de caroço de algodão

Na Figura 9 são apresentados os extratos das tortas de caroço de algodão contendo gossipol (0,3 g de amostra em aproximadamente 20 ml de acetona), nos quais a coloração amarela é característica do composto extraído.

Figura 9 – Extrato contendo gossipol obtido após maceração em acetona (após 16 horas)

A análise das tortas de caroço de algodão apresentaram teores de gossipol entre 0,61 e 1,38 $mg.g^{-1}$, como listado na Tabela 8.

Tabela 8 - Teor de gossipol livre nas amostras de torta de algodão

AMOSTRAS	**Teor de gossipol ($mg.g^{-1}$)**
Leme	1,32
Goiatuba	1,13
Morrinhos	1,38
Itumbiara	0,68
Turvelândia	0,61

As tortas apresentaram diferenças no teor de gossipol de até 66%, considerando os teores extremos. Os valores estão dentro da faixa citada pela OECD (2009) para a torta de caroço de algodão, de 0,04 a 1,77%.

A ingestão do gossipol proporcionada pelas tortas analisadas pode ser estimada utilizando o estudo de Lindsey, Hawkins e Guthrie (1980) como referência. Neste estudo, os autores relataram o consumo diário de 22,4 kg de matéria seca por gado leiteiro, com peso corpóreo de 553 kg; a substituição do concentrado por caroço de algodão proporcionou uma ingestão de 3,6 g de gossipol livre, numa dieta com elevado teor de concentrado. Com base nesses dados e considerando os níveis de adição propostos, com substituições de 22,2, 33,3,

66,6 e 100% do farelo de soja (o qual corresponde a 30% do total do concentrado da dieta), e supondo uma relação volumoso/concentrado na proporção de 1:1, seriam obtidos os valores de ingestão de gossipol apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Estimativa de ingestão diária (total e por quilo de peso corpóreo) de gossipol livre considerando os níveis de consumo propostos no bioensaio em cada torta de caroço de algodão analisada

CONSUMO ALIMENTAR DIÁRIO ESTIMADO (kg)		
Matéria Seca ingerida (MS)	Concentrado (50% da MS)	Soja do concentrado (30%)
22,40	11,20	3,36

INGESTÃO DE TORTA DE CAROÇO DE ALGODÃO CONSIDERANDO AS PORCENTAGENS DE SUBSTITUIÇÃO DA SOJA DO CONCENTRADO (kg)				
	22,2%	33,3%	66,6%	100%
Diária (total)	0,746	1,119	2,239	3,360
Diária (kg p.c. dia^{-1})	0,001	0,002	0,004	0,006

INGESTÃO DE GOSSIPOL (mg):				
Ingestão diária total proporcionada pelo consumo das tortas de caroço de algodão				
	22,2%	33,3%	66,6%	100%
Leme	984,72	1.477,08	2.955,48	4.435,08
Goiatuba	842,98	1.264,47	2.530,07	3.796,80
Morrinhos	1.029,48	1.544,22	3.089,07	4.636,80
Itumbiara	507,28	760,92	1.522,52	2.234,80
Turvelândia	455,06	682,59	1.365,79	2.049,60
Ingestão em $mg.kg^{-1}$ p.c. dia* proporcionada pelo consumo das tortas de caroço de algodão				
	22,2%	33,3%	66,6%	100%
Leme	1,781	2,671	5,344	8,020
Goiatuba	1,524	2,287	4,575	6,866
Morrinhos	1,862	2,792	5,587	8,385
Itumbiara	0,917	1,376	2,753	4,132
Turvelândia	0,823	1,234	2,470	3,706

* $mg.kg^{-1}$ p.c. dia: quantidade em miligramas ingerida por quilo de peso corpóreo do animal, considerando um animal de 553 kg

Considerando o NOAEL de 40 mg.kg^{-1} p.c. de gossipol livre para bovinos, os níveis de ingestão de gossipol proporcionados pelas substituições do farelo de soja propostas, não causariam efeitos tóxicos sobre os animais, por estarem abaixo desse valor. Entretanto, é necessário ressaltar que a toxicidade depende não só da dose, mas também do estádio de vida e do período de ingestão e que as exigências nutricionais são bastante variáveis, devendo-se considerar uma soma de fatores para adequação da dieta. Assim, observa-se que as estimativas realizadas nesse estudo são apenas indicativos pontuais do potencial de toxicidade da ingestão dessas biomoléculas, não constituindo, em hipótese alguma, modelos para extrapolação.

4.3. Análise de Ricina (RCA)

4.3.1 Detecção/Quantificação: cromatografia líquida de alta eficiência

A injeção do padrão de ricina de cadeia A (RCA) forneceu o cromatograma com tempo de retenção entre 24 e 25 minutos, como apresentado na Figura 10. O espectro obtido no pico de ricina, obtido a 214 nm, é apresentado na Figura 11.

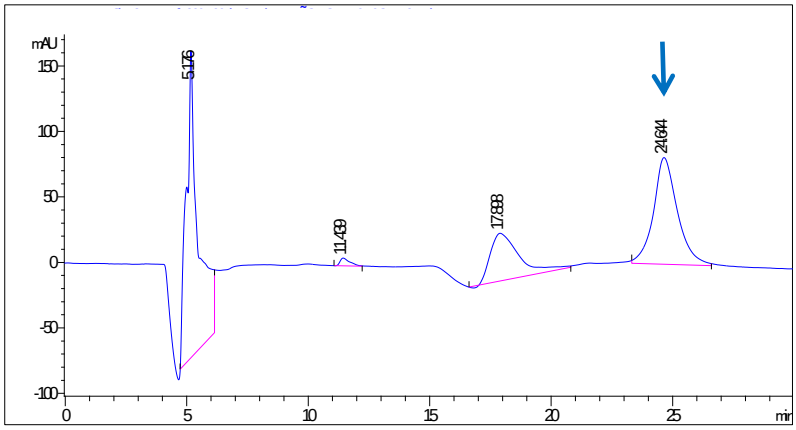


Figura 10 – Cromatograma de padrão de ricina A (24,64 minutos, em destaque)

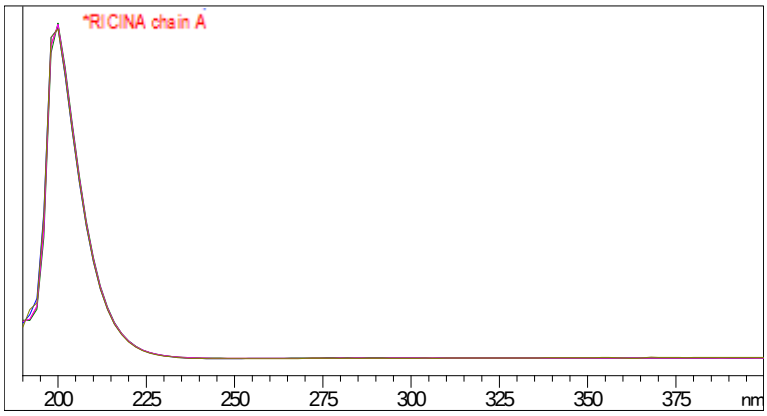


Figura 11 – Espectro UV do pico de ricina (214 nm)

A detecção e quantificação da ricina nas amostras de torta de mamona foram realizadas utilizando como referência o espectro obtido (Figura 11), juntamente com o tempo de retenção característico do composto.

4.3.2 Avaliação da metodologia para análise da ricina

A cocromatografia da ricina demonstrou a especificidade na identificação do pico deste composto. A adição de uma alíquota de padrão com concentração conhecida produziu o aumento do pico proporcional ao esperado, de aproximadamente 40% (Figura 12 B) pela sobreposição das concentrações de ricina do extrato e do padrão adicionado, no mesmo tempo de retenção (Figura 12).

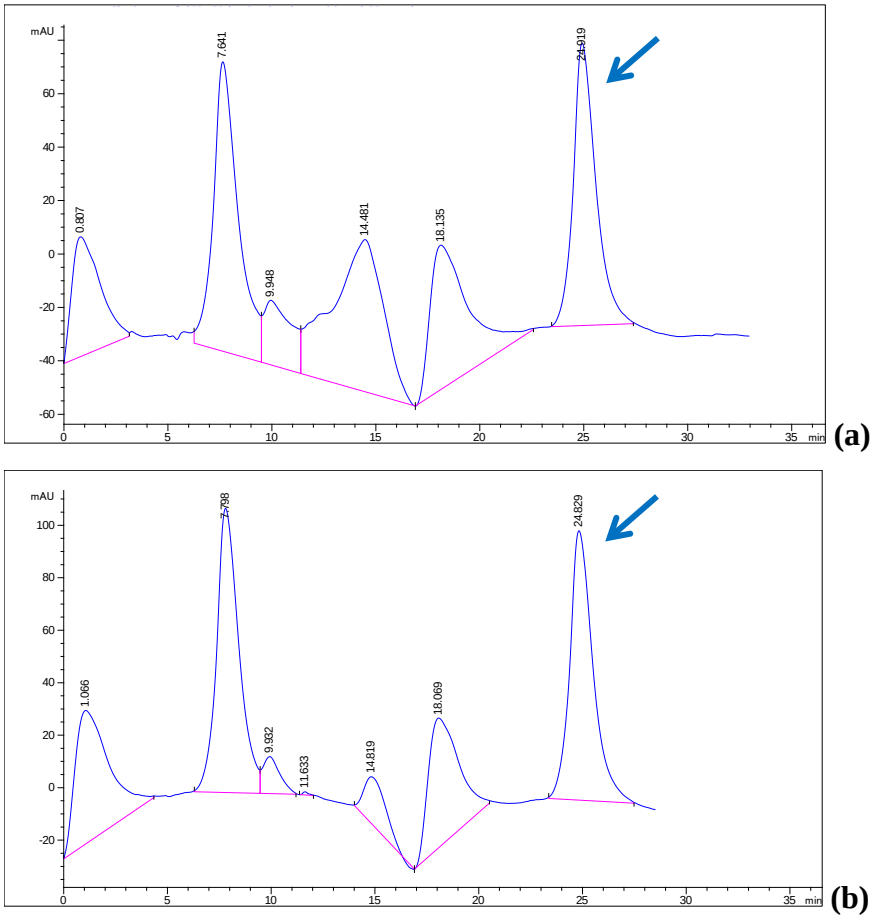


Figura 12 – (a) Cromatograma de amostra de torta de mamona; (b) Cromatograma de torta de mamona com adição de padrão de ricina

Da mesma forma, o teste de pureza confirmou a inexistência de compostos coeluídos no pico de ricina, considerando que o teor de pureza do pico foi superior ao mínimo do teste.

A precisão foi avaliada pela repetibilidade entre replicatas extraídas (5) de uma amostra de torta de mamona, e forneceu um desvio padrão relativo de 1,78, indicando que a metodologia apresenta adequação quanto à precisão (INMETRO, 2011).

A curva analitíca apresentou linearidade na faixa testada, fornecendo um R^2 de 0,9907. A curva analítica obtida para a ricina é apresentada na Figura 13.

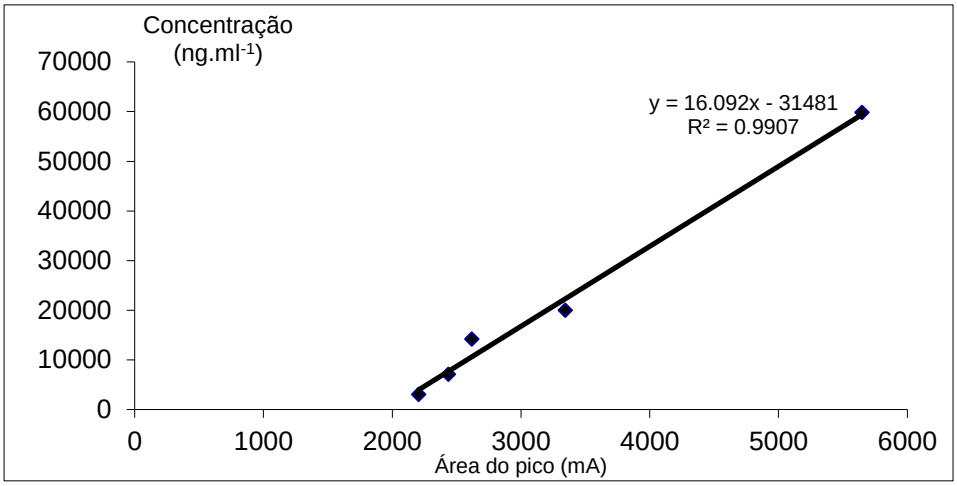


Figura 13 – Curva analítica da ricina de cadeia A

A sensibilidade do método foi determinada pelo limite de detecção (LD), estabelecido como 95,35 $ng.ml^{-1}$ e o limite de quantificação teórico, considerado como 3 vezes o valor do LD, foi de 286 $ng.ml^{-1}$. Entretanto, considerando a faixa de concentração da curva analítica obtida, o valor do menor ponto foi utilizado como limite mínimo de quantificação, ou seja, de 3,05 $\mu g.ml^{-1}$.

4.3.3 Teor de ricina em tortas de mamona

A análise das tortas de mamona apresentaram os teores de ricina A entre 0,10 e 0,30 $mg.g^{-1}$, como listado na Tabela 10.

Tabela 10 - Teor de ricina nas amostras de torta de mamona

AMOSTRAS	Teor de ricina ($mg.g^{-1}$)
EBDA MPA 34	0,30
EBDA MPA 36	0,26
IAC Guarani	0,15
IAC 80[1]	0,10

1 – Amostra obtida como torta (prensagem a frio)

Os teores citados na literatura para a ricina são bastante variáveis, sendo descritos valores abrangendo concentrações desde partes por milhão até valores percentuais. Os dados obtidos para ricina são semelhantes aos relatados por Auld et al. (2003), entre 0,10 $mg.g^{-1}$ e 5,6 $mg.g^{-1}$, mas são bastante diferentes dos valores obtidos no estudo realizado por Baldoni et al. (2011), com 20 acessos brasileiros, que apresentaram teores de ricina de 10,23 ±1,23 e 8,80 ± 1,91 $ng.\mu g^{-1}$ da proteína total para amostras de IAC 80 e IAC Guarani. A amplitude de concentração obtida também é inferior a faixa descrita no estudo de Pinkerton et al. (1999), entre 1,9 e 16 $mg.g^{-1}$.

Observa-se que a diferença nos valores obtidos pode ter sido proveniente não apenas pelas diferenças na forma de extração/quantificação da ricina, que podem diferir quanto à sensibilidade e exatidão, mas também por características de variabilidade intrínsecas as plantas, como a elevada taxa de fecundação cruzada, dificultando a manutenção da variedade inicialmente estabelecida, além disso, a produção de ricina é controlada por múltiplos pares de genes, os quais podem ser expressos de maneiras diferentes, favorecendo maior ou menor produção de ricina entre as plantas (OLIVEIRA, 2004; HALLING et al., 1985; SUJATHA; REDDY; MAHASI, 2008).

Assim como ocorre com o gossipol em caroço de algodão, existem ainda menos estudos caracterizando amostras de mamona quanto ao teor de ricina. Para viabilizar a intenção de utilizar a torta de mamona na alimentação de ruminantes é necessário avaliar os efeitos deste composto no rúmen e possíveis processos para destoxificação ou, ainda, avaliar o efeito da adaptação à ingestão de baixas doses de ricina.

O principal país produtor de mamona e que vem realizando estudos sobre a utilização de torta de mamona é a Índia, onde têm sido avaliados processos visando a destoxificação da torta de mamona utilizando calcário e extrusão e os efeitos deste processo no rúmen. Entretanto, mesmo com todos os esforços realizados na Índia, tanto para melhoramento genético quanto para o estudo da utilização dos coprodutos da mamoneira, ainda persiste o problema da quantificação da ricina, que vem sendo testada apenas por teste de hemaglutinação de hemácias de aves, o qual é semi-quantitativo e ineficiente para detecção da ricina em baixas quantidades (SEVERINO et al., 2006).

Seguindo o mesmo raciocínio utilizado para estimativa de ingestão do gossipol, tendo como parâmetros os dados de peso e consumo relatados no estudo de Lindsey, Hawkins e Guthrie (1980) e as substituições ao farelo de soja propostas no bioensaio deste estudo, obtêm-se os níveis de ingestão listados na Tabela 11.

Tabela 11 – Estimativa de ingestão diária (total e por quilo de peso corpóreo) de ricina considerando os níveis de consumo propostos no bioensaio em cada torta de mamona analisada

CONSUMO ALIMENTAR DIÁRIO ESTIMADO (kg)		
Matéria Seca ingerida (MS)	Concentrado (50% da MS)	Soja do concentrado (30%)
22,40	11,20	3,36

INGESTÃO DE TORTA DE MAMONA CONSIDERANDO AS PORCENTAGENS DE SUBSTITUIÇÃO DA SOJA DO CONCENTRADO (kg)				
	22,2%	33,3%	66,6%	100%
Diária (total)	0,746	1,119	2,239	3,360
Diária (kg p.c. dia^{-1})	0,001	0,002	0,004	0,006

INGESTÃO DE RICINA (mg):				
Ingestão diária total proporcionada pelo consumo das tortas de mamona				
	22,2%	33,3%	66,6%	100%
EBDA MPA 34	223,80	335,70	671,70	1.008,00
EBDA MPA 36	193,96	290,94	582,14	873,60
IAC Guarani	111,90	167,85	335,85	504,00
IAC 80	74,60	111,90	223,90	336,00
Ingestão em mg.kg^{-1} p.c. dia* proporcionada pelo consumo das tortas de mamona				
	22,2%	33,3%	66,6%	100%
EBDA MPA 34	0,405	0,607	1,215	1,823
EBDA MPA 36	0,351	0,526	1,053	1,580
IAC Guarani	0,202	0,303	0,607	0,911
IAC 80	0,135	0,202	0,405	0,608

* mg.kg^{-1} p.c. dia: quantidade em miligramas ingerida por quilo de peso corpóreo do animal, considerando um animal de 553 kg

No estudo realizado por Tokarnia e Dobëreiner (1997), a dose de sementes de mamona de 2,91 g.kg^{-1} de matéria seca (MS) proporcionou letalidade, o que não ocorreu em doses menores, de até 2 g.kg^{-1} MS. Os três níveis de substituição do farelo de soja do concentrado pela torta de mamona propostos neste estudo forneceriam ingestões de 49,95 (33,3%), 99,95 (66,6%) e 150 (100%) g.kg^{-1} MS, superiores aos valores relatados como não sendo tóxicos por Tokarnia e Dobëreiner. Por outro lado, existem relatos citando a faixa de tolerância para ingestão de torta de mamona por ruminantes entre 100 e 150 g.kg^{-1} MS

(ALBIN et al., 1969; SANTANA et al., 1971; OLIVEIRA, 2010). Considerando essa faixa de suposta tolerância, a quantidade de $g.kg^{-1}$ MS das tortas em relação à matéria seca total ingerida nas substituições parciais poderia ser considerada atóxica. No caso de substituição integral, a quantidade de mamona ingerida por dia seria igual ao valor máximo citado ainda como não sendo tóxico. Entretanto, não é possível concluir sobre a presença ou ausência de toxicidade apenas pela comparação dos resultados de matéria seca ingerida, considerando que o principal fator tóxico da torta, a ricina, não foi quantificado. Apesar da maior dose de ingestão de torta, observa-se que os níveis de ricina podem diferir significativamente entre acessos e variedades.

Visando utilizar a mamona como alimento, Marion (1967) realizou a adaptação de animais a doses de ricina, com teor inicial de 2,3 $mg.kg^{-1}$ p.c. dia por duas semanas, atingindo valores de 15-20 $mg.kg^{-1}$ p.c. dia ao longo de 9 semanas. Ao final dos 196 dias deste estudo, não foram observados sinais clínicos ou patológicos de intoxicação, sugerindo ser esta uma boa alternativa para utilização da mamona. No presente estudo, a substituição integral do farelo de soja pela torta com maior concentração de ricina (EBDA 34) proporcionaria uma ingestão máxima deste composto de 1,82 $mg.kg^{-1}$ p.c. dia, portanto, inferior a dose utilizada para adaptação citada por Marion (1967).

Essa tolerância observada a determinadas doses de ricina pode ser explicada pela capacidade de destoxificação desta lectina no rúmen por ação enzimática, realizando a quebra da ligação dissulfeto entre as cadeias A e B da ricina (OLIVEIRA et al., 2010). Apesar disso, observa-se que o Painel de Opinião Científica sobre Contaminantes na Cadeia de Alimentos (EFSA, 2008) não recomenda e desencoraja qualquer utilização de mamona *in natura* na alimentação animal.

Portanto, uma alternativa para utilização da mamona na alimentação de ruminantes é a realização de adaptação do organismo animal a pequenas doses de ricina em curto período, o que pode proporcionar resistência a doses maiores (TOKARNIA; DOBËREINER, 1997). Sob esse enfoque, a mamona apresenta potencial para ser utilizada como alimento animal, desde que as doses de ingestão de ricina sejam previamente analisadas. A destoxificação é a alternativa mais considerada como viável, mas mesmo após a destoxificação da torta ainda podem restar compostos tóxicos em quantidades residuais, os quais podem ser apresentar dificuldades em sua identificação ou quantificação, devido a alterações na matriz após o processamento químico e/ou térmico, podendo fornecer falsos resultados quanto a ausência destes compostos na torta considerada atóxica.

4.4. Análise de Ésteres de Forbol

4.4.1 Detecção/Quantificação: cromatografia líquida de alta eficiência

A injeção dos padrões 12, 13-diacetato de forbol e 12, 13, 20-triacetato de forbol forneceram cromatogramas com tempo de retenção entre 2 e 3 minutos, com espectros obtidos a 280 e 254 nm, respectivamente. Considerando a possibilidade de obter os picos de ésteres de forbol na amostra e no padrão 12, 13-diacetato de forbol no mesmo comprimento de onda, optou-se por sua utilização para construção da curva de calibração. Assim, os ésteres de forbol foram detectados e quantificados a 280 nm e os resultados foram expressos como equivalentes ao padrão 12, 13-diacetato de forbol.

Os cromatogramas das injeções do controle positivo, com a amostra de óleo e os os espectros dos picos de ésteres de forbol (Figura 14), da amostra parcialmente destoxificada (Figura 15) e da torta tóxica (Figura 16), permitiram a identificação dos picos correspondentes aos ésteres de forbol nas amostras, pela coincidência entre os espectros obtidos e as diferenças entre os tamanhos dos picos.

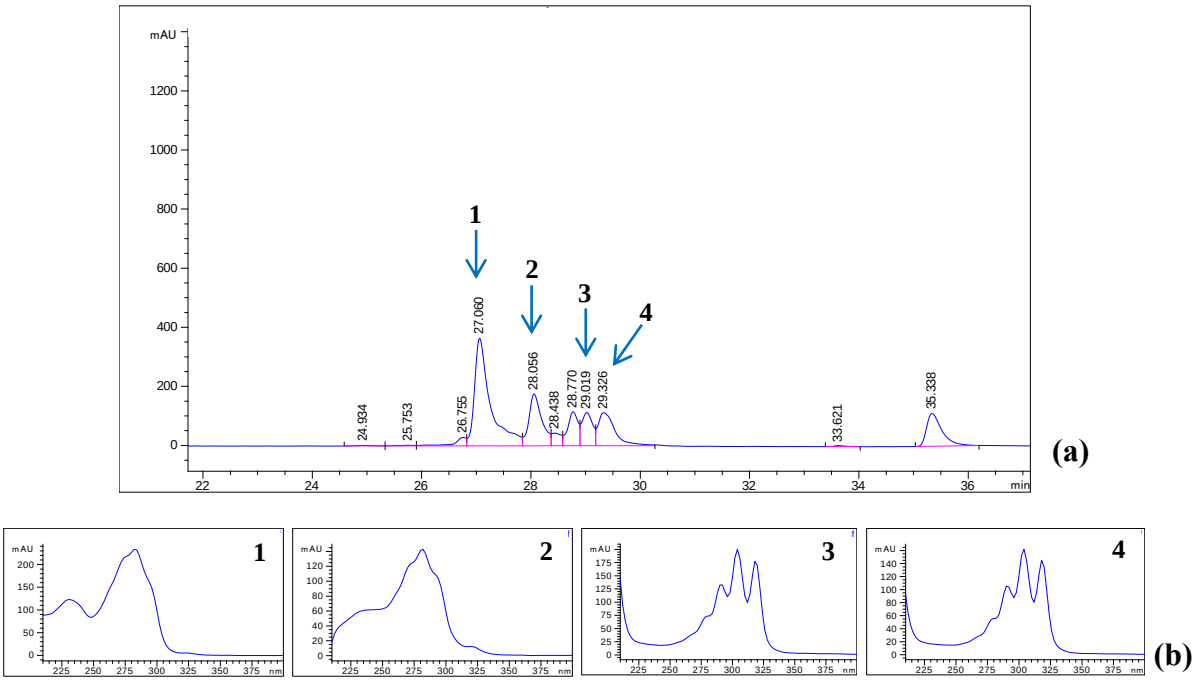


Figura 14 – (a) Cromatograma de amostra de óleo de pinhão-manso. (b) Espectros dos picos nos tempos de retenção entre 27 e 30 minutos (de 1 a 4, no destaque)

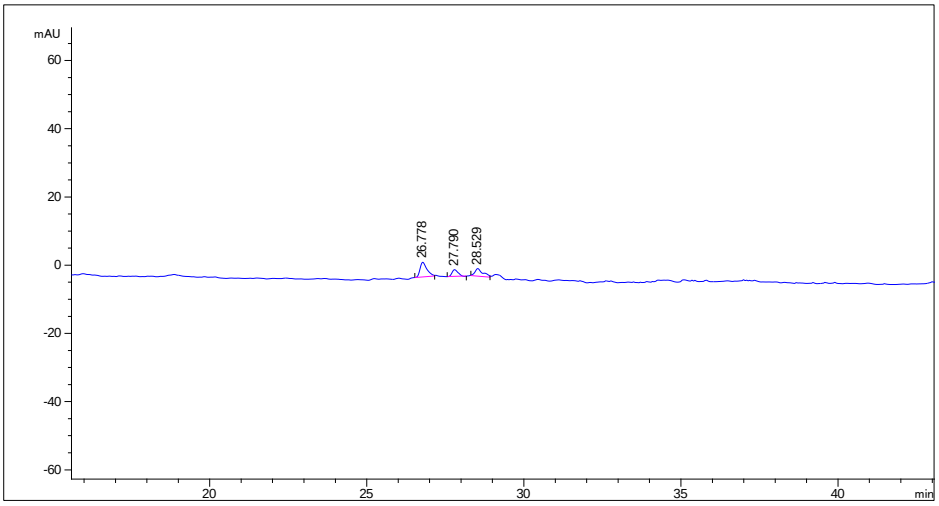


Figura 15 – Cromatograma com picos residuais de ésteres de forbol na amostra de torta de pinhão-manso parcialmente destoxificada

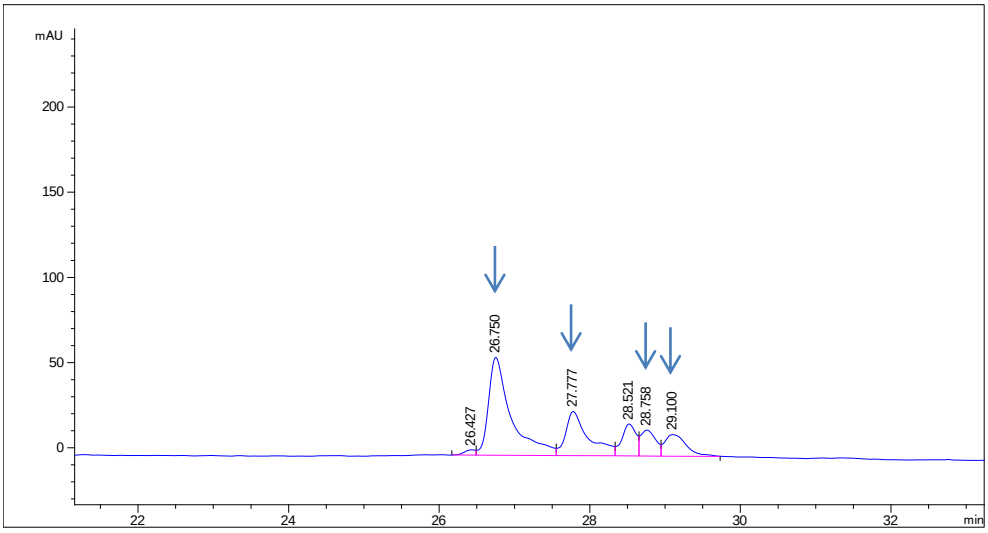


Figura 16 – Cromatograma com os picos de ésteres de forbol na amostra de torta tóxica

4.4.2 Avaliação da metodologia para análise de ésteres de forbol

O teste de pureza indicou que os picos de ésteres de forbol obtidos nas amostras apresentaram impurezas abaixo do limite mínimo do teste, demonstrando adequação quanto à especificidade e seletividade da separação cromatográfica.

A precisão obtida com a avaliação da repetibilidade intra-corridas, forneceu um desvio padrão relativo de 1,32 e 1,02, para as concentrações de 62,5 e 1.000 µg.ml^{-1}, respectivamente.

O limite de detecção obtido foi de 2,72 µg.ml^{-1} e o limite de quantificação teórico foi estabelecido como sendo 3 vezes o LD, ou seja, de 8,15 µg.ml^{-1}. Assim como para a ricina, a quantificação foi realizada considerando a menor concentração da curva analítica como referência (LQ = 62,5 µg.ml^{-1}), cujo valor é superior ao LQ teórico.

A curva analítica foi construída utilizando o padrão 12, 13-diacetato de forbol forneceu um R^2 de 0,9995, demonstrando adequação para a quantificação dos ésteres de forbol, nessa faixa de concentração (Figura 17).

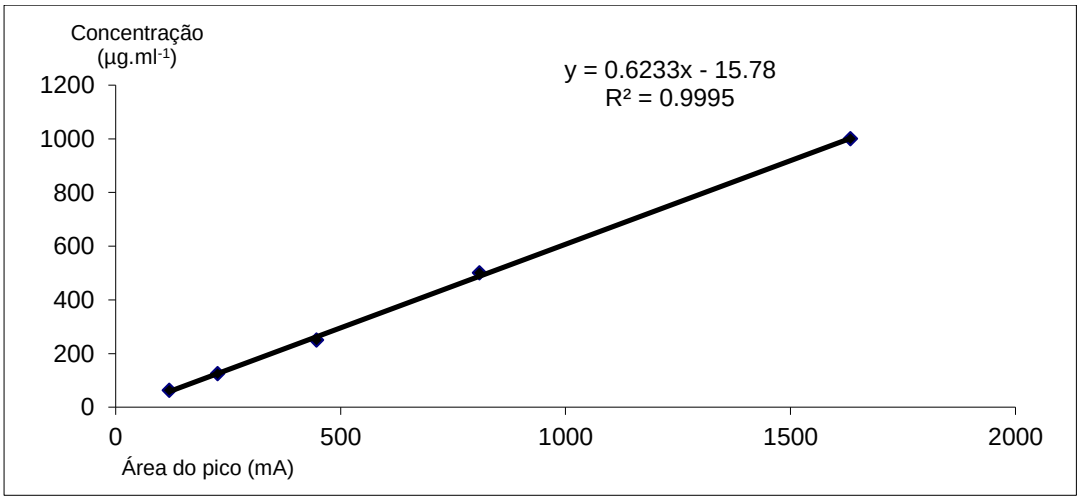


Figura 17 – Curva analítica dos ésteres de forbol (padrão 12, 13-diacetato de forbol)

A média dos testes de recuperação realizada em amostras de torta foi de 92% ±1,13, demonstrando adequação da metodologia quanto à exatidão. Os testes de recuperação para a análise do óleo resultaram em apenas 55% ±1,5 de recuperação do teor de fortificação do padrão, possivelmente devido ao processamento térmico durante a extração que pode ter proporcionado uma maior degradação do padrão adicionado.

4.4.3 Teor de ésteres de forbol em tortas de pinhão-manso

As amostras de torta de pinhão-manso e seus respectivos óleos apresentaram os teores de equivalentes de ésteres de forbol apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Teor de ésteres de forbol nas tortas e seus respectivos óleos

AMOSTRAS	Tortas ($mg.g^{-1}$)	Óleo ($mg.ml^{-1}$)[1]
Embrapa 101	1,38	5,12
Embrapa 150	0,93	4,53
Embrapa 195	0,73	3,22
Embrapa 260	1,01	4,71
IAC	1,08	3,92

1 – Os teores de óleo apresentados foram corrigidos pelo valor do teste de recuperação

Os estudos sobre quantificação de ésteres de forbol apresentam variações significativas no teor de ésteres de forbol no óleo e em sementes de pinhão-manso, dependendo não só da região de plantio do acesso, mas também da forma de extração do óleo e da torta (AHMED; SALIMON, 2009; PRADHAN et al., 2011). De maneira geral, os dados obtidos neste estudo estão dentro da faixa citada pela literatura, entre 0,11 a 8,97 $mg.g^{-1}$.

Na literatura internacional, estudos avaliando o teor de ésteres de forbol em sementes, óleo e torta de pinhão-manso têm sido realizados há mais tempo e ainda com maior frequência do que no Brasil. Em sementes provenientes de regiões da África, América do Norte e Central e Ásia, foram relatados teores entre 0,11 e 3,32 $mg.g^{-1}$ e de 0,27 a 2,49 $mg.ml^{-1}$ em amostras de óleo (MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998). Haas e Mittelbach (2000) relataram a presença de 0,31% de ésteres de forbol em amostras de pinhão-manso provenientes da Nicaragua, enquanto Makkar et al. (2009) obtiveram o mesmo teor em amostras da Índia, mas ressaltaram que a extração a frio pode proporcionar uma concentração ainda maior do que a extração por solventes, da ordem de 0,38%.

Considerando diferentes tipos de extração do óleo, Pradhan et al. (2011) obtiveram diferenças de 25% de ésteres de forbol entre a extração por solvente (2,8 $mg.ml^{-1}$) e por expeller (2,1 $mg.ml^{-1}$) e de 28% entre as tortas obtidas pelos mesmos procedimentos (0,8 e 1,1 $mg.g^{-1}$). Quanto ao processamento das tortas, Makkar, Becker e Schmook (1998)

encontraram diferenças de 50% entre os teores de ésteres de forbol entre sementes tostadas e trituradas (0,01 e 0,02 $mg.g^{-1}$, respectivamente).

Dentre os estudos realizados no país, Ferrari et al (2009) analisaram 26 acessos brasileiros de pinhão-manso quanto a presença dos ésteres de forbol e obtiveram valores entre 1,41 a 8,97 $mg.g^{-1}$, indicando a ocorrência de sementes com baixa e alta toxicidade no Brasil. Pires et al (2011) relataram teores de ésteres de forbol em maior concentração nas sementes, devido a presença do óleo (2,04 a 3,53 $mg.g^{-1}$) do que nas tortas dessas mesmas sementes de (0,90 a 1,30 $mg.g^{-1}$). Da mesma forma, Laviola, Mendonça e Ribeiro (2010) avaliaram 11 acessos de pinhão-manso e obtiveram teores desde 0 até 5,41 $mg.g^{-1}$ de ésteres de forbol.

A toxicidade dos ésteres de forbol tem sido avaliada em estudos *in vivo* e *in vitro*, utilizando sementes com baixa toxicidade natural ou destoxificadas. A toxicidade dos ésteres de forbol em monogástricos tem sido descrita principalmente em ratos e em carpas, por serem as últimas consideradas como uma espécie altamente sensível a estes compostos. Embora os ruminantes sejam considerados animais mais resistentes à toxicidade do gossipol e da ricina, eles podem ser suscetíveis à toxicidade aguda e crônica induzida pelos ésteres de forbol.

Katole et al. (2011) realizaram uma associação de tratamentos térmico e químico na torta de pinhão-manso antes de realizar a adição de 5, 10, 20, 25 $g.kg^{-1}$ de matéria seca na alimentação de ovinos e, embora tenham atingido uma redução de até 90% no teor de ésteres de forbol entre os tratamentos, os autores não relatam qualquer nível de inclusão testado como sendo seguro, considerando os sinais de toxicidade observados.

Da mesma forma, Ferreira et al. (2012) testaram a inclusão de pericarpo do pinhão-manso na alimentação de ovinos, em níveis de 15, 20 e 45% no total da dieta por 23 dias, com teores de ésteres de forbol entre 0,57 e 1,36 $mg.kg^{-1}$ de pericarpo consumido. Todos os grupos apresentaram ganho de peso e consumo inferiores ao grupo controle, sendo que os grupos com maiores inclusões de pericarpo apresentaram os menores valores para esses parâmetros, provavelmente devido a maior presença de ésteres de forbol, além de sinais de toxicidade subcrônica, indicando que o pericarpo, assim como a torta, apresenta toxicidade e não é adequado para a alimentação de ovinos.

Utilizando os valores extremos dos teores de ésteres de forbol obtidos neste estudo (Tabela 13) e considerando os mesmos dados de consumo e peso dos animais utilizados para estimativa da ingestão do gossipol e da ricina, com uma dieta contendo 1:1

volumoso/concentrado, seriam obtidos os teores de ingestão de torta e ésteres de forbol apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Estimativa de ingestão diária (total e por quilo de peso corpóreo) de ésteres de forbol considerando os níveis de consumo propostos no bioensaio em cada torta de pinhão-manso analisada

CONSUMO ALIMENTAR DIÁRIO ESTIMADO (kg)		
Matéria Seca ingerida (MS)	Concentrado (50% da MS)	Soja do concentrado (30%)
22,40	11,20	3,36

INGESTÃO DE TORTA DE PINHÃO-MANSO CONSIDERANDO AS PORCENTAGENS DE SUBSTITUIÇÃO DA SOJA DO CONCENTRADO (kg)				
	22,2%	33,3%	66,6%	100%
Diária (total)	0,746	1,119	2,239	3,360
Diária (kg p.c. dia^{-1})	0,001	0,002	0,004	0,006

INGESTÃO DE ÉSTERES DE FORBOL (mg):				
Ingestão diária total proporcionada pelo consumo das tortas de pinhão-manso				
	22,2%	33,3%	66,6%	100%
Embrapa 101	1.029,48	1.544,22	3.089,82	4.636,80
Embrapa 150	693,78	1.040,67	2.082,27	3.124,80
Embrapa 195	544,58	816,87	1.634,47	2.452,80
Embrapa 260	753,46	1.130,19	2.261,39	3.393,60
IAC	805,68	1.208,52	2.418,12	3.628,80
Ingestão em $mg.kg^{-1}$ p.c. dia* proporcionada pelo consumo das tortas de pinhão-manso				
	22,2%	33,3%	66,6%	100%
Embrapa 101	1,862	2,792	5,587	8,385
Embrapa 150	1,255	1,882	3,765	5,651
Embrapa 195	0,985	1,477	2,956	4,435
Embrapa 260	1,362	2,044	4,089	6,137
IAC	1,457	2,185	4,373	6,562

* $mg.kg^{-1}$ p.c. dia: quantidade em miligramas ingerida por quilo de peso corpóreo do animal, considerando um animal de 553 kg

Observa-se que os valores totais de ingestão diária de ésteres de forbol de 2,45 a 4,64 g na dieta ingerida, supondo 100% de adição das tortas com menor e maior teor de ésteres de forbol, forneceriam uma ingestão de E.F. de 109 e 207 $mg.kg^{-1}$ MS ao dia. Ahmed e Adam (1979a) citaram como tóxicos para bezerros na primeira ingestão, de 250 a 1.000 $mg.kg^{-1}$ de pinhão-manso na dieta e 25 $mg.kg^{-1}$ para ingestão prolongada. A ingestão de pinhão-manso no maior e menor teor de adição corresponderia a, respectivamente, 150 e 33 g de pinhão-manso por quilo da dieta. Entretanto, como discutido anteriormente para a ricina, apenas os dados sobre consumo do pinhão-manso não são suficientes para avaliar a possibilidade de toxicidade, pela ausência de quantificação do teor de ésteres de forbol no estudo citado. Da mesma forma, além das diferenças de toxicidade proporcionadas pela dose e período de ingestão, também devem ser consideradas as diferenças entre os animais estudados.

O estudo realizado por Ferreira et al. (2012) reporta toxicidade subcrônica entre 0,57 e 1,357 $mg.kg^{-1}$ de ésteres de forbol para ovinos, e é possível concluir que existe possibilidade de ocorrer toxicidade mesmo se a torta com menor concentração de E.F. e o menor nível de adição testado no bioensaio (22,2%) fosse utilizada como suplementação, pois proporcionaria uma ingestão ésteres de forbol de 24,11 $mg.kg^{-1}$.

A utilização de pinhão-manso para produção de óleo para o biodiesel ainda é objeto de muitos estudos e algumas controvérsias. Apesar da suposta rusticidade, devido à resistência a condições extremas de cultivo, muito divulgada no início dos estudos com o pinhão-manso, o uso de tecnologias comuns a outras culturas, como adubação, controle de pragas e manejo adequado, também são necessárias para o pinhão-manso se o objetivo for alcançar maior produtividade (LAVIOLA; DIAS, 2008).

Mesmo que a utilização do pinhão-manso *in natura* na alimentação animal pudesse ser realizada com segurança quanto à toxicidade, os níveis de inclusão dessa torta provavelmente seriam pequenos, considerando a toxicidade dos ésteres de forbol e, portanto, pouco representativos em relação ao volume total dos resíduos vegetais gerados pela indústria de extração do óleo. Para que a utilização do pinhão-manso na produção do biodiesel se torne uma alternativa economicamente viável com a agregação de valor e utilização do subprodutos gerados, é imprescindível o desenvolvimento de técnicas que proporcionem uma destoxificação efetiva dos ésteres de forbol, bem como de técnicas para mensuração deste composto tóxico residual na matriz modificada após o tratamento químico e/ou térmico.

Considerando os desafios a serem superados para que se estabeleça uma cadeia de produção do pinhão-manso no Brasil, é possível afirmar que o uso desta oleaginosa para produção de biodiesel em escala ainda é uma realidade distante, apesar do potencial apresentado.

4.5. Bioensaio: produção de gases na fermentação ruminal *in vitro*

4.5.1 Parâmetros para avaliação da fermentação ruminal *in vitro*

O bioensaio foi realizado a fim de avaliar a atividade das biomoléculas na produção de gases e metano, bem como na degradabilidade da matéria orgânica.

A análise de regressão não demonstrou efeito proporcionado pelos diferentes níveis de biomoléculas (extraídas ou na torta *in natura*), para nenhum dos fatores avaliados nos grupos do gossipol, ricina e ésteres de forbol.

Não houve diferença entre os valores de matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD) entre os tratamentos dos grupos, exceto para o gossipol, no qual foi observada uma menor degradação da matéria orgânica no tratamento T2, com adição de gossipol proporcional a 66,6% de substituição do farelo de soja (0,0414 mg de gossipol) em relação ao grupo controle ($P<0,05$), como pode ser visto na Tabela 15.

O fator de partição é o parâmetro que relaciona a proporção da matéria orgânica verdadeiramente degradada *in vitro* com o volume de gases produzidos por essa degradação, refletindo a eficiência da síntese proteica de massa microbiana (MAKKAR, 2010). Não foram observadas diferenças entre os tratamentos dos grupos e desses tratamentos em relação ao controle, em nenhum dos testes realizados para o parâmetro fator de partição (FP). Os valores das médias da MSVD, MOVD e FP são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD $g.kg^{-1}$) (valor médio ± desvio padrão) e fator de partição (valor médio ± desvio padrão) da fermentação ruminal *in vitro*

Grupo	Tratamentos[1]	PARÂMETROS			
		MOVD ($g.kg^{-1}$)		Fator de Partição	
Gossipol	T1	465	± 40,5	2,55	± 0,52
	T2	442	± 50,4	2,31	± 0,39
	T3	490	± 30,2	2,54	± 0,41
	T4	521	± 94,4	2,55	± 0,56
Controle	C	546	± 43,3	2,79	± 0,26
Ricina	T1	514	± 154,6	2,76	± 0,79
	T2	514	± 150,0	2,73	± 0,54
	T3	509	± 101,8	2,65	± 0,57
	T4	599	± 73,8	3,16	± 0,80
Controle	C	546	± 43,3	2,79	± 0,26
Ésteres de Forbol	T1	573	± 44,1	3,22	± 0,27
	T2	487	± 63,9	2,68	± 0,55
	T3	499	± 81,5	2,77	± 0,63
	T4	515	± 60,1	2,76	± 0,29
Controle	C	546	± 43,3	2,79	± 0,26

1 - Tratamentos – Gossipol e Ésteres de Forbol: T1 = 0,0207 mg; T2 = 0,0414 mg, T3 = 0,0621 mg e T4 = torta com 0,0138 mg; Ricina: T1 = 0,0045 mg, T2 = 0,0090 mg, T3 = 0,0135 mg e T4 = torta com 0,003 mg.

Os valores obtidos para o fator de partição, entre 2,31 e 2,55 para o grupo do gossipol estão ligeiramente abaixo dos valores de referência citados por Makkar (2010), de 2,74 a 4,41, enquanto os demais grupos apresentaram fator de partição de acordo com os valores teóricos citados. Considerando o fator de partição como um indicativo da eficiência da produção microbiana, não houve efeito das biomoléculas adicionadas ou presentes nas tortas sobre esse parâmetro, considerando a ausência de diferença em relação ao grupo controle.

A população microbiana presente no rúmen é responsável pela degradação de grande parte da proteína e de outros compostos nitrogenados presentes no alimento, sintetizando proteína microbiana e amônia no interior do rúmen. O nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) é um parâmetro indicativo da produção de proteína microbiana por unidade de substrato fermentado.

Mehres, Ørskov e McDonald (1977) investigaram a relação entre a concentração de NH_3 no rúmen e a taxa de fermentação ruminal e observaram que valores iguais ou acima de 23,5 mg de N-NH_3 por 100 ml de líquido ruminal proporcionam máxima atividade fermentativa, demonstrada pelo desaparecimento máximo da matéria seca incubada.

Os valores de N-NH_3 obtidos neste estudo para todos os grupos das biomoléculas testadas estão acima da faixa considerada ideal, mas ainda dentro da concentração para o efeito fermentativo máximo (Mehres, Ørskov; McDonald, 1977), sugerindo, portanto, que as biomoléculas não alteraram negativamente o metabolismo microbiano com relação à síntese protéica.

Não foram observadas diferenças entre os valores de N-NH_3 entre os tratamentos de nenhum dos grupos com relação ao controle (Tabela 15).

Tabela 15 – Nitrogênio amoniacal (N-NH_3 g.MS^{-1}) (valor médio ± desvio padrão) da fermentação ruminal *in vitro* por 24 horas de incubação

Tratamentos[1]	**N-NH_3 g.MS^{-1}**					
	Gossipol		**Ricina**		**Ésteres de Forbol**	
T1	39,9	± 1,40	37,8	± 1,85	38,2	± 0,81
T2	39,4	± 1,07	37,1	± 2,80	37,8	± 2,42
T3	39,6	± 2,25	39,9	± 2,10	38,2	± 1,07
T4	38,9	± 1,62	39,4	± 1,76	37,1	± 1,40
Controle	38,2	± 1,62	38,2	± 1,62	38,2	± 1,62

1 - Tratamentos – Gossipol e Ésteres de Forbol: 33,3% = 0,0207 mg; 66,6% = 0,0414 mg, 100% = 0,0621 mg e 22,2% = torta com 0,0138 mg; Ricina: 33,3% = 0,0045 mg, 66,6% = 0,0090 mg, 100% = 0,0135 mg e 22,2% = torta com 0,003 mg.

A produção de gases do efeito estufa (GEE) provenientes da cadeia de produção de leite e carne contribui com 4% do total da emissão global antropogênica (FAO, 2010). Dentre os GEE, o metano é considerando como um dos gases mais potentes relacionados ao aquecimento global (ABDALLA et al., 2012).

Do volume total de gases produzidos pelos micro-organismos ruminais, cerca de um terço corresponde ao CH_4, sendo o restante correspondente principalmente a CO_2 e uma pequena fração de outros gases, como H_2, H_2S, N_2 e O_2. O metano total produzido no rúmen é parcialmente eliminado com o ar expirado, mas a maior parte desse gás é liberado pelo animal, juntamente com os outros gases, durante a eructação (KOZLOSKI, 2011).

A taxa de produção de gases pela fermentação ruminal pode ser alterada pela utilização de alimentos que exerçam atividade mitigadora na produção desses gases, por sua atuação na microbiota ruminal ao exercerem efeitos sobre as bactérias metanogênicas e protozoários, justificando o interesse em pesquisar alternativas alimentares que proporcionem esse efeito (PEDREIRA; PRIMAVESI, 2006; ABDALLA et al., 2008).

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ou entre o controle dos grupos do gossipol e da ricina, para nenhum dos parâmetros analisados na Tabela 16, demonstrando que essas biomoléculas não alteraram a fermentação ruminal *in vitro*.

No grupo dos ésteres de forbol, com relação aos mesmos parâmetros GP e CH_4 produzidos em relação à MOVD não foram observadas diferenças entre os tratamentos realizados em cada grupo, por nenhum dos testes realizados.

Entretanto, observa-se que a diferença na taxa de eficiência de conversão do metano entre o controle e o tratamento 4 (22,2% de torta de pinhão-manso) foi significativa no teste de Dunnett ($P<0,05$). A adição de torta de pinhão-manso proporcionou um menor valor de conversão do metano em relação ao controle, sugerindo que apesar do menor teor de ésteres de forbol (0,0138 mg) contido neste tratamento em relação aos demais, a adição de torta contendo a biomolécula *in natura* pode ter exercido influência negativa sobre a microbiota metanogênica.

Os volumes totais de gases produzidos (GP ml.g $MOVD^{-1}$) e de metano (CH_4 ml.g $MOVD^{-1}$) e a taxa de eficiência de conversão do metano (Eficiência CH_4%) entre os tratamentos dos grupos testados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Produção total de gases e de metano em relação à matéria orgânica verdadeiramente degradada (GP ml.g $MOVD^{-1}$ ± desvio padrão e CH_4 ml.g $MOVD^{-1}$ ± desvio padrão) e eficiência da conversão do metano (Eficiência CH_4% ± desvio padrão) na fermentação ruminal *in vitro*

Grupos	T[1]	PARÂMETROS					
		GP ml.g $MOVD^{-1}$		CH_4 ml.g $MOVD^{-1}$		Eficiência CH_4%	
Gossipol	T1	413	± 105,7	26,6	± 11,7	6,3	± 1,5
	T2	445	± 79,5	31,4	± 7,6	6,7	± 0,8
	T3	403	± 59,3	29,9	± 10,5	7,3	± 1,6
	T4	407	± 91,1	26,2	± 8,2	6,3	± 0,6
	C	362	± 34,5	26,8	± 4,4	7,4	± 1,1
Ricina	T1	385	± 117,5	26,4	± 9,9	6,7	± 0,5
	T2	375	± 68,0	25,4	± 4,9	6,7	± 0,3
	T3	396	± 96,6	29,9	± 14,4	7,3	± 1,8
	T4	337	± 98,9	25,1	± 13,8	7,1	± 1,7
	C	362	± 34,5	26,8	± 4,4	7,4	± 1,1
Ésteres de Forbol	T1	321	± 17,5	23,4	± 3,2	9,3	± 2,9
	T2	386	± 74,3	27,5	± 7,1	7,3	± 1,1
	T3	376	± 87,9	27,3	± 8,9	7,0	± 0,6
	T4	362	± 37,0	20,4	± 4,0	5,6[b2]	± 0,6
	C	362	± 34,5	26,8	± 4,4	7,4[a]	± 1,1

1 - T = Tratamentos – Gossipol e Ésteres de Forbol: T1 = 0,0207 mg; T2 = 0,0414 mg, T3 = 0,0621 mg e T4 = torta com 0,0138 mg; Ricina: T1 = 0,0045 mg, T2 = 0,0090 mg, T3 = 0,0135 mg e T4 = torta com 0,003 mg, C = controle.
2 - Letras diferentes entre os grupos significam que houve diferença estatística a 5%.

A ausência de diferenças observadas na fermentação ruminal *in vitro* com adição dos níveis de ricina testados nos tratamentos pode ser justificada pela atividade enzimática ruminal que, nos níveis adicionados, poderia ter inativado essa fitotoxina, nos níveis adicionados. Oliveira et al. (2010) verificaram que a capacidade de destoxificação da ricina pela microbiota ruminal diminuiu com o aumento da concentração de ricina adicionada (0,42 $mg.ml^{-1}$ a 1,68 $mg.ml^{-1}$) devido ao mecanismo de saturação enzimática. Observa-se que, no estudo citado, a menor concentração utilizada pelos autores foi aproximadamente 15 vezes superior à concentração utilizada neste estudo no maior nível de adição. Portanto, supõe-se que neste bioensaio possa ter ocorrido a destoxificação da ricina pelos mesmos mecanismos observados por Oliveira et al. (2010).

Corroborando com a hipótese de que os níveis de adição propostos nesse estudo são inferiores aos valores mínimos para toxicidade, os resultados deste estudo para os parâmetros produção total de gases e metano, além do nitrogênio amoniacal não indicaram a ocorrência de efeitos prejudiciais à microbiota.

A torta de caroço de algodão já tem sido utilizada na alimentação de ruminantes em níveis mais expressivos do que os propostos nesse estudo (COPPOCK et al., 1985). A ausência de efeitos na fermentação ruminal *in vitro* observada provavelmente deve-se a capacidade de destoxificação do gossipol pelo mecanismo de complexação com proteínas livres no rúmen, tornando o gossipol inativo (REISER; FU, 1962). Apesar dessa resistência a doses mais elevadas, a utilização de tortas contendo gossipol requer cuidados não apenas quanto à dose, mas também com relação à extensão do período de alimentação, já que este composto apresenta efeito acumulativo no organismo, podendo resultar em toxicidade.

Os resultados obtidos para os ésteres de forbol demonstraram que a adição dessas biomoléculas extraídas da torta de pinhão-manso também não afetou a fermentação ruminal *in vitro*, considerando a igualdade na produção total de gases e de metano observadas nos parâmetros analisados.

Entretanto, a adição de torta à dieta padrão proporcionou uma menor taxa de eficiência de conversão de metano, sugerindo a possibilidade de a torta ter reduzido a população de bactérias metanogênicas ou ter provocado alterações em seu metabolismo, interferindo na fermentação ruminal. Apesar de a torta conter um menor teor de ésteres de forbol do que os demais tratamentos, possivelmente esse efeito ocorreu porque os ésteres de forbol quando aderidos a matriz (torta de pinhão-manso) podem estar mais protegidos de fatores extrínsecos que favorecem degradação ou modificações em sua estrutura que possam diminuir sua toxicidade, ao contrário dessa biomolécula extraída e adicionada nos demais tratamentos deste bioensaio. Outra possibilidade para explicar essa diferença entre a adição de torta de pinhão-manso e as biomoléculas extraídas é a possibilidade de atuação de outro fator de toxicidade presente na torta, além dos ésteres de forbol, ou ainda, a ocorrência de sinergia entre um ou mais fator tóxico, independente de sua concentração.

De fato, a torta de pinhão-manso tem sido avaliada quanto ao perfil de compostos tóxicos e de antinutricionais, sendo descrita também a presença de inibidores de tripsina, lectinas, saponinas e fitatos. Embora a curcina seja uma proteína inativadora de ribossomos com potencial atuação tóxica similar à da ricina, a curcina é uma proteína inativadora de ribossomos do tipo 1, portanto, ao contrário da ricina, apresenta dificuldades para adentrar às

células, mecanismo inicial necessário para manifestação de toxicidade (MAKKAR et al., 1997; GONÇALVES; MENDONÇA; LAVIOLA, 2009).

Da mesma forma, observa-se que produtos vegetais são suscetíveis a contaminação fúngica e produção de micotoxinas, as quais podem afetar a fermentação ruminal *in vitro*, por possuírem efeitos antibióticos, provocando alterações no metabolismo já demonstradas *in vitro* e *in vivo* (DVORAK et al., 1977; MERTENS, 1979; BURMEISTER; HESSELTINE, 1966). Embora a toxicidade da torta de pinhão-manso seja creditada principalmente aos ésteres de forbol, não existem estudos que avaliem a presença de aflatoxinas ou outras micotoxinas nessa oleaginosa.

Makkar e Becker (2009) propuseram que os ruminantes podem ser tão suscetíveis aos efeitos tóxicos da ingestão de ésteres de forbol quanto os monogástricos, considerando a conclusão deste estudo de que essas biomoléculas não são degradadas pelo rúmen e também não afetam a fermentação ruminal. Entretanto, observa-se que nesse estudo os ésteres de forbol foram isolados e ligados à sílica gel, após um processo de secagem a 55ºC, que poderia ter alterado disponibilidade biológica dos ésteres de forbol, assim como a possibilidade da sílica-gel utilizada como suporte para as biomoléculas ter retido esses compostos mesmo durante a fermentação ruminal *in vitro*, indisponibilizando-os para a microbiota.

Abdalla et al. (2008) avaliaram a substituição do farelo de soja do concentrado por tortas de pinhão-manso e observaram uma redução na produção total de gases e de metano em relação ao grupo controle a partir de 50% de inclusão, teor de torta superior em pouco mais de duas vezes ao testado neste estudo. Já em estudos realizados *in vivo*, foram observados efeitos tóxicos nos animais mesmo com a utilização de tortas parcialmente destoxificadas em teores similares aos máximos valores utilizados neste bioensaio, ou com teores de ingestão de ésteres de forbol inferiores a maioria dos valores de adição realizados neste bioensaio (KATOLE et al., 2011; FERREIRA et al., 2012).

Diante do exposto, qualquer suposição sobre a toxicidade dos ésteres de forbol nos teores testados deve ser realizada com cautela. A inclusão dos teores crescentes de ésteres de forbol extraídos aparentemente não alterou a fermentação ruminal *in vitro*, portanto, a possibilidade destas biomoléculas saírem intactas do rúmen e provocarem toxicidade clínica nos animais não pode ser descartada, conforme proposto por Makkar e Becker (2009). Por outro lado, a torta influenciou a taxa de eficiência de conversão do metano, sugerindo um possível efeito sobre as bactérias metanogênicas, provavelmente devido à presença dos ésteres de forbol ou ainda a outro fator presente na torta, ainda não identificado.

5 CONCLUSÕES

Não foram observados efeitos pela inclusão dos teores de torta de mamona e de caroço de algodão, ou de suas respectivas biomoléculas extraídas das tortas, sobre a fermentação ruminal *in vitro*.

Apesar da redução na eficiência da conversão de metano observada apenas no tratamento com a adição de torta de pinhão-manso *in natura* sugerir que o efeito sobre a microbiota ruminal tenha sido proporcionado pelos ésteres de forbol contidos na torta, que poderiam estar mais protegidos da degradação ou alterações por fatores externos quando ligados a essa matriz, existe também a possibilidade de que o efeito observado tenha sido produzido pela atuação de outro fator tóxico presente na torta ou por um efeito sinérgico entre fatores tóxicos.

O potencial de utilização das tortas de caroço de algodão e de mamona *in natura* não foi negado por esse estudo, entretanto, é necessário ressaltar que a adição das tortas na alimentação de ruminantes requer cuidados específicos e deve necessariamente considerar a concentração de suas biomoléculas nas tortas e os níveis de ingestão proporcionados, o manejo animal correto, observando o tempo de vida do animal e período de ingestão dessas tortas, e ainda a possibilidade de adaptação à ingestão, pela administração de pequenas doses em curto espaço de tempo, no caso da mamona.

Para que a utilização da torta de pinhão-manso *in natura* em qualquer teor de adição seja efetivamente avaliada, são necessários outros estudos que considerem a ação dos ésteres de forbol nas tortas *in natura* e sua possível interação com outros fatores tóxicos. As metodologias para avaliação quantitativa de moléculas bioativas e os processos necessários para destoxificação das tortas vegetais residuais da indústria do biodiesel constituem os principais entraves para que o potencial de transformação desses subprodutos em coprodutos utilizados na alimentação animal se concretize em curto ou médio prazo, especialmente em relação ao pinhão-manso.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da ausência de efeitos sobre a fermentação ruminal *in vitro* pela adição da ricina e gossipol estar de acordo com os relatos da literatura internacional, a utilização destas tortas na alimentação animal requer cuidados específicos para cada composto. O gossipol apresenta efeito acumulativo no organismo e pode provocar efeitos negativos sobre o sistema reprodutivo, devendo, portanto, ser utilizado com cautela.

Embora a ricina apresente alta toxicidade, os ruminantes possuem a capacidade de "adaptação" ao consumo com a introdução de pequenas doses na dieta, de modo progressivo, o que aparentemente pode ser realizado com segurança nos teores propostos neste estudo, considerando não só os resultados do bioensaio, mas também a comparação de toxicidade por dose ingerida citada na literatura. Entretanto, observa-se que esse tipo de abordagem para destinação desse subproduto vegetal não tem sido comumente utilizada ou estudada.

Ainda existem muitas incertezas sobre a ação dos ésteres de forbol na torta de pinhão-manso e sua atividade necessita ser mais estudada e de maneira mais abrangente. A possibilidade de sinergismo da ação tóxica dos ésteres de forbol com outros possíveis contaminantes presentes, como as micotoxinas, que são metabólitos fúngicos secundários passíveis de serem encontrados em resíduos vegetais, não pode ser descartada, já que alguns desses compostos são substâncias carcinogênicas e que, na presença concomitante de substâncias promotoras de tumores, como os ésteres de forbol, poderiam proporcionar efeitos sinérgicos nos animais. Da mesma forma, de que maneira as interações dos ésteres de forbol com a torta ou óleo podem afetar sua biodisponibilidade na torta *in natura* ou destoxificada necessitam ser investigadas.

A utilização destes subprodutos da produção de biodiesel na alimentação animal não é única forma possível de aproveitamento, nem tão pouco supriria em 100% as necessidades de destinação do resíduo gerado, portanto, alternativas para utilização destes resíduos além da alimentação animal que agreguem valor a cadeia produtiva são indispensáveis para tornar a produção destas oleaginosas economicamente mais atraentes, principalmente no caso do pinhão-manso e da mamona.

Uma vez que estes resíduos se tornem coprodutos na alimentação animal, novos desafios surgirão, especialmente com relação à avaliação da possibilidade de transferência destas biomoléculas para a carne e leite produzidos pelos animais alimentados com essas tortas, bem como a possibilidade da formação de outros metabólitos com potencial tóxico nestes tecidos. Apesar de alguns estudos sobre distribuição dessas biomoléculas, são escassos os estudos sobre a transferência do gossipol e seus metabólitos em carne ou leite e inexistentes para os ésteres de forbol e a ricina.

São necessários novos estudos *in vitro* e *in vivo* sobre a utilização destes subprodutos na alimentação de ruminantes, a fim de estabelecer uma conduta adequada quanto à segurança toxicológica de seu uso. Da mesma forma, estudos sobre a presença de metabólitos dessas biomoléculas na carne e no leite poderão antecipar possíveis obstáculos à utilização dessas tortas vegetais como coprodutos da alimentação animal.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, A.L.; LOUVANDINI, H.; SALLAM, S.M.A.; BUENO, I.C.S.; TSAI, S.M.; FIGUEIRA, A.V.O. *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health And Production,** Edinburgh, v. 44, p. 953-964, 2012.

ABDALLA, A.L.; SILVA FILHO, J.C.; GODOI, A.R.; CARMO, C.A; EDUARDO, J.L.P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 260-268, 2008.

ABOU-DONIA, M.D. Physiological effects and metabolism of gossypol. **Residue Reviews**, New York, v. 61, p. 125-160, 1976.

ADAM, S.E.I. Toxic effects of *Jatropha curcas* in mice. **Toxicology,** Amsterdam, v. 2, p. 67-76, 1974.

ADAMS, R.; GEISSMAN, T.A.; EDWARDS, J.D. Gossypol: a pigment of cottonseed. **Chemical Reviews**, Baltimore, v. 60, n. 6, p. 555-574, 1960. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr60208a002>. Acesso em: 18 jul. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. **Boletim mensal do biodiesel:** outubro de 2012. Brasília, DF: Superintendência de Refino e Processamento de Gás Natural – SRP, 2012. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=63306&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1357843875290.

AHMED, O.M.M.; ADAM, S.E.I. Effects of *Jatropha curcas* in sheep and goat. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 27, p. 89-96, 1979b.

AHMED, O.M.M.; ADAM, S.E. Effects of *Jatropha curcas* on the calves. **Veterinary Pathology,** Lawrence, v. 16, p. 472-482, 1979a.

AHMED, W.A.; SALIMON, J. Phorbol ester as a toxic constituents of tropical Jatropha curcas oil seed. **European Journal of Scientific Research,** Victoria, Mahé, Seychelles, v. 31, n. 3, p. 429-436, 2009.

ALBIN, R.C.; DAVIS, W.H.; ZINN, D.W. Castor meal for growing-finishing steers. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 28, n. 1, p. 133 (Abstract), 1969.

ALMEIDA, E.F.; BOMTEMPO, J.V.; DE SOUZA E SILVA, C.M. **The performance of Brazilian's biofuels**: an economic, environmental and social analysis. In: INTERNAITONAL TRANSPORT FORUM, 2007, Rio de Janeiro. Paris: OECD Joint Transporte Research Centre, 2007. 91 p. (Discussion Paper, 2007-5). Disponível em: http://www.internationaltransportforum.org/jtrc/discussionpapers/DiscussionPaper5.pdf.

ANADAM, S.; ANIL KUMAR, G.K.; GOSH, J.; RAMACHANDRA, K.S. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal Feed Science and Technology,** Amsterdam, v. 120, p. 159-168, 2005.

ARAUJO, R.C.; PIRES, A.V.; MOURÃO, G.B.; ABDALLA, A.L.; SALLAM, S.M.A. Use of blanks to determine *in vitro* net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166-167, p. 155-162, 2011.

ARAUJO, A.E.; SILVA, C.A.D.; FREIRE, E.C.; COSTA, J.N.; AMARAL, J.A.B.; MEDEIROS, J.C.; SILVA, K.L.; BARROS, M.L.; BELTRÃO, N.E.M.; SUASSUNA, N.D.; FIRMINO, P.T.; ALMEIDA, R.P.; SANTOS, R.F.; FREIRE, R.M.M.; PEREIRA, S.R.P. **A cultura do algodão herbáceo na agricultura familiar.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003 (Sistemas de Produção, 1). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar/index.htm>. Acesso em 06 jul. 2008.

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

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist´s Society.** 2. ed. Washington, DC: AOCS, 1990. v. 2, Ba 7-58, p. 1-4.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. v. 1, p. 1-30.

AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, M.; SCHIER, J.; OSTERLOH, J. Ricin poisoning: a comprehensive review. **Journal of the American Medical Association,** Chicago, v. 294, n. 18, p. 2342-2353, 2005.

AULD, D.L.; PINKERTON, S.D.; BORODA, E.; LOMBARD, K.A.; MURPHY, C.K.; LOWERY, C.C.; KENWORTHY, K.E.; BECKER, W.D.; ROLFE, R.D.; GHETIE, V. Registration of TTU‐LRC castor germplasm with reduced levels of ricin and RCA120. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 746‐747, 2003.

BANDEIRA, D.A.; CARTAXO, W.V.; SEVERINO, L.S.; BELTRÃO, E.M. **Resíduo industrial da mamona como fonte alternativa na alimentação animal.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. Disponível em: <http://www.ruralsementes.com.br/produtos/215.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2008.

BALDONI, A.B.; CARVALHO, M.H.; SOUSA, N.L.; NÓBREGA, M.B.M.; MILANI, M.; ARAGÃO, F.J.L. Variability of ricin content in mature seeds of castor been. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 46, n. 7, p. 776-779, 2011.

BALIGA, B.P. **The chemical properties and biological significance of gossypol protein complexes.** 1956. 81 f. Thesis (Ph. D. in Biochemistry and Nutrition) –Texas A & M University, College Station, 1956.

BALIGA, B.P.; LYMAN, C.M. Preliminary report on the nutritional significance of bound gossypol in cottonseed meal. **The Journal of the American Oil Chemist´s Society**, Chicago, v. 34, p. 21-34, 1957.

BALINT, G.A. Ricin: The toxic protein of castor oil seeds. **Toxicology,** Amsterdam, v. 2, p. 77-102, 1974.

BARNES, D.J.; BALDWIN, B.S.; BRAASCH, D.A. Degradation of ricin in castor seed meal by temperature and chemical treatments. **Industrial Crops and Products,** Amsterdam, v. 29, p. 209-515, 2009.

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

BECKER, K.; MAKKAR, H.P.S. *Jatropha curcas*: a potential source for tomorrow´s oil and biodiesel. **Lipid Techonology,** Weinheim¸ v. 20, n. 5, p. 104-107, 2008.

BELTRÃO, N.E.M. **Torta de mamona (*Ricinus communis* L.):** fertilizante e alimento. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2002. 6 p. (Comunicado Técnico, 171). Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/publicacoes/2002/COMTEC171.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2008.

BELTRÃO, N.E.M.; OLIVEIRA, M.I.P. **Oleaginosas e seus óleos: vantagens e desvantagens para produção de biodiesel.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. (Documentos, 201). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA-2009-09/22146/1/DOC201.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2008.

BENBOUZA, H.; LOGNAY, G.; PALM, R.; BANDOIN, J.P.; MERGEAI, G. Crop ecology, management & quality. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 1937-1942, 2002.

BOATNER, C. The pigments of cottonseed. **Oil & Soap**, Chicago, v. 21, n. 1, p. 10-15, 1944. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02593148?LI=true#page-1>. Acesso em: 10 de jan. 2013.

BRADBERRY, S.M.; DICKERS, K.J.; RICE, P.; GRIFFITHS, G.D.; VALE, J.A. Ricin poisoning. **Toxicological Reviews**, Heidelberg, v. 22, p. 65-70, 2003.

BRITO, N.M. **Estudo da desintoxicação da torta da mamona para utilização em alimentação animal.** 2005. 108 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

BRITO, N.M.; CHIERICE, G.O. Estudo da mobilidade de ricina e ricinina provenientes da torta de mamona (*Ricinus communis*) empregada como fertilizante de solo. In: AMARANTE JUNIOR, O.P.; VIEIRA, E.M.; COELHO, R.S. (Org.). **Poluentes orgânicos**: dinâmica destino e determinação no ambiente. São Carlos: RiMa, 2006. v. 1, p. 21-26.

BUENO, I.Q.S.; FILHO, S.L.S.; GOBBO, S.P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D.M.S.S.; ABDALL, A.L. Influence of inoculum source in gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, p. 95-105, 2005.

BUAINAIN, A.M.; BATALHA, M.O (Coord.). **Cadeia produtiva do algodão**. v. 4. Brasília, DF: IICA; MAPA/SPA, 2007. 108 p. (Série Agronegócios). Disponível em: <http://www.iica.org.br/Docs/CadeiasProdutivas/Cadeia%20Produtiva%20do%20Algod%C3%A3o.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2012.

BURMEISTER, H.R.; HESSELTINE, C.W. Survey of sensitivity of microorganisms to aflatoxin. **Applied Microbiology,** Baltimore, v. 14, n. 3, p. 403-404, 1966.

CASS, Q.B., TIRITAN, E.; MATLIN, S.A.; FREIRE, E.C. Gossypol enantiomer ratios in cotton seeds. **Phytochemistry,** Oxford, v. 30, p. 2655–2657, 1991.

CAI, Y.F.; ZHANG, H.; ZENG, Y.; MO, J.C.; BAO, J.K.; MIAO, C.; BAI, J.; YAN, F.; CHEN, F. An optimized gossypol high-performance liquid chromatography assay and its application in evaluation of different gland genotypes of cotton. **Journal of Biosciences,** New Delhi, v. 29, n. 1, p. 67-71, 2004.

CARLSON, A.; KALIMULLAH, E.J. CDC categoric agents B. In: McFEE, R.B.; LEIKIN, J. **Toxic-terrorism:** Emergy response and clinical approach to chemical, biological, and radiological agents. New York: McGraw Hill, 2007. cap. 45, p. 329-332.

CARRUTH, F.E. Stability of bound gossypol to digestion. **The Journal of the American Oil Chemist´s Society,** Chicago, v. 24, n. 2, p. 58-59, 1947.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTING - CDC. Emergengy preparedness and response. Disponível em: <http://www.bt.cdc.gov/agent/ricin/labtesting.asp>. Acesso em: 20 mar. 2008.

CHEN, Q.-Q.; CHEN, H.; LEI, H.-P. Comparative study on the metabolism of optical gossypol in rats. **Journal of Ethnopharmacology,** Lausanne, v. 20, p. 31-37, 1987.

CHIARADIA, J.J. **Avaliação agronômica e fluxo de gases do efeito estufa a partir do solo tratado com resíduos e cultivado com mamona (*Ricinus communis* L.) em área de reforma de canavial**. 2005. 108 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CLARK, E.P. Studies on gossypol: IV. Apogossypol. **The Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v. 78, p. 159-166, 1928a. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/78/1/159.full.pdf+html>. Acesso em: 10 de jan. 2013.

CLARK, E.P. The determination of gossypol structure. **The Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v. 5, n. 9, p. 273-277, 1928b. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007% 2FBF02644822?LI=true#page-1>. Acesso em: 10 de jan. 2013.

COLLIN-NEGRETE, J.; KIESILING, H.E.; ROSS, T.T.; SMITH, J.F. Effect of whole cottonseed on serum constituints, fragility of eritrhocyte cells, and reproduction of growing Holstein Heifers. **Journal of Dairy Science,** Lancaster, v. 79, p. 2016-2020, 1996.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira:** grãos. Safra 2012/2013. Terceiro Levantamento. Brasília, DF: Conab, 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/da1999de 7b61ab5fd1be1226edfc45b.pdf >. Acesso em: 28 out. 2010.

COPPOCK, C.E.; WEST, J.W.; MOYA, J.R.; NAVE, D.H.; LABORE, J.M. Effects of amount of whole cottonseed on intake, digestibility, and physiological responses of dairy cows. **Journal of Dairy Science,** Lancaster, v. 68, p. 2248-2258, 1985.

COSTA, M.A.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; PAULINO, M.F.; CECON, P.R.; PAULNO, P.V.R.; PAIXÃO, M.L. Validação das equações do NRC (2001) para predição do valor energético de alimentos nas condições brasileiras. **Revista Brasileira de Zootecnia,** Viçosa, v. 34, n. 1, p. 280-287, 2005.

CUNHA, M.G.G. **Aspectos nutricionais, produtivos e reprodutivos em ovinos alimentados com rações contendo níveis crescentes de caroço de algodão.** 2006. 96 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

DARBY, S.M.; MARK, L.M.; ALLEN, R.O. Forensic determination of ricin and the alkaloid marker ricinine from Castor Bean extracts. **Journal of Forensic Sciences,** Mundelein, v. 46, n.5, p. 1033-1042, 2001.

DECHARY, J.M.; PRADEL, P. The occurrence of (+) in *Gossypium* species. **The Journal of American Oil Chemist´s Society,** Chicago, v. 48, p. 563-564, 1971.

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

DEVAPPA, R.K.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from Jatropha oil. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 34, p. 1125-1133, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953410 000954#>. Acesso em: 10 jan. 2013.

DVORAK, R.; JAGOS, J.; BOUDA, J.; PISKAC, A.; ZAPLETAL, O. Changes in the clinico-biochemical índices in the rúmen liquor and urine in cases of experimental aflatoxicosis in dairy cows. **Vet Med,** Prague, v. 22, p. 161-169, 1977.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on ricin (from *Ricinus communis*) as undesirable substances in animal feed. **The EFSA Journal**, Parma, v. 726, p. 1-38, 2008. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/contam_op_ej726_ricin_en.pdf?ssbinary=true >. Acesso em: 01 nov. 2010.

EL-BADWI, S. M. A; MOUSA, H. M.; ADAM, S. E. I.; HAPKE, H. J. Response to Brown Hissek chicks to low levels of *Jatropha curcas*, *Ricinus communis* or their mixture. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 34, p. 304-306, 1992.

ENDO, Y.; MITSUI, K.; MOTISUKI, M.; TSURUGI, K. The mecanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification on 28S ribosomal RNA caused by the toxins. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, p. 5908-5912, 1987.

ENDO, Y.; TSURUGI, K.The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 263, p. 8735–8739, 1987.

EVANS, F.J. Phorbol: Its esters and derivatives. In: _____. **Naturally occurring phorbol esters**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1986. cap. 7, p. 171-215.

FERNANDES, W.R.; BACCARIN, R.Y.A.; MICHIMA, L.E.S. Intoxicação em eqüino por *Ricinus communis*: relato de caso. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal,** Salvador, v. 3, n. 1, p. 26-31, 2002. Disponível em: <http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/618/365>. Acesso em 15 jul. 2008.

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

FERREIRA, O.R.; BRITO, S.S.; LIMA, F.G.; MARIANO SOUZA, D.P.; MENDONÇA, S.; RIBEIRO, J.A.A.; MAIORKA, P.C.; ARAUJO, V.L.; NEIVA, J.N.M.; FIORAVANTE, M.C.S.; RAMOS, A.T.; MARUO, V.M. Toxicidade do pericarpo de *Jatropha curcas* em ovinos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v. 64, n. 3, p. 559-567, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352012000300006&script=sci_arttext>. Acesso em: 10 jan. 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Greenhouse gas emissions from the dairy sector. A life cycle assessment.** Rome: FAO, 2010, 94 p.

FRANKEL, A.E.; FITZGERALD, D.; SIEGALL, C.; PRESS, O.W. Advances in immunotoxin biology and therapy: A summary of the fourth international symposium on immunotoxins. **Cancer Research,** Baltimore, v. 56, p. 926-932, 1996.

FREIRE, R.M.M.; NÓBREGA, M.B.M. **Cultivo da mamona.** 2. d. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. (Sistemas de Produção, 4). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/CultivodaMamona_2ed/importancia.html>. Acesso em: 11 jul. 2008.

FULLER, G.; WALKER JR., H.G.; MOTTOLA, A.C.; KUZMICKY, D.D.; KOHLER, G.O.; VOHRA, P. Potential of detoxified castor meal. **The Journal of the American Oil Chemists´ Society**, Chicago, v. 48, p. 616-618, 1971.

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

GARCIA, W.R. **Processamento da soja grão e do caroço de algodão em dietas de vacas leiteiras.** 2005. 91 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

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

GOETSCH, A.L.; OWENS, F.N. The effects of commercial processing methods of cottonseed meal on site and extend of digestion in cattle. **Journal of Animal Science,** Albany, v. 60, p. 803-813, 1985.

GONÇALVES, S.B.; MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B.G. **Substâncias tóxicas, alergênicas e antinutricionais presentes no pinhão-manso e seus derivados e procedimentos adequados ao manuseio.** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. (Circular Técnica, 1). Disponível em: <http://www.cnpae.embrapa.br/publicacoes-para-download/ct_01.pdf/view>. Acesso em: 10 out. 2010.

GREEN FUEL ENERGY S.A. Londrina, 2008. **Pinhão-manso**. Disponível em: <http://www.greenfuel.ind.br/Pinhao%20Manso.pdf>. Acesso em: 15 Jul. 2008.

GRIFFITHS, G.D.; RICE, P.; ALLENBY, A.C.; BAILEY, S.C.; UPSHALL, D.G. Inhalation toxicology and histopathalogy of ricin and abrin toxins. **Inhalation Toxicology,** London, v. 7, p. 269-88, 1995.

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

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

HALLING, K.C.; HALLING, A.C.; MURRAY, E.E.; LADIN, B.F.; HOUSTON, L.L.; WEAVER, R.F. Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis.* **Nucleic Acids Research**, London, v. 13, p. 8019‑8033, 1985.

HALVERSON, J.O.; SMITH, F.H. Extraction of gossypol with different ethers causes of varying results. **Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition,** Washington, DC, v. 9, n. 11, p. 516-517, 1937. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac50115a005>. Acesso em: 10 jan. 2013.

HALVERSON, J.O.; SMITH, F.H. Extraction of gossypol from cottonseed meal. **Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition,** Washington, Dc, v. 6, n. 5, p. 356-357, 1934. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac50091a025>. Acesso em: 10 jan. 2013.

HAVARTINE, D.I.; FIRKINS, J.L.; EASTRIDGE, M.L. Whole linted cottonseed as a forage substitute fed with ground or steam-flaked corn: digestibility and performance**. Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 85, p. 1976-1987, 2002.

HECKER, E. Co-carcinogenic principles from the seed oil of *Crotom tiglium* and othe from Euphorbiaceae. **Cancer Research**, Baltimore, v. 28, p. 2338-2349, 1968.

HEMERLY, F.X. **Mamona:** comportamento e tendências no Brasil. Brasília, DF: EMBRAPA CNPA, 1989. 69 p. (Documentos, 2).

HEWETSON, J.F.; RIVERA, V.R.; DONALD, A.C.; LEMLEY, P.V.; RIPPY, M.K.; POLI, M.A. Protection of mice from inhaled ricin by vaccination with ricin or by passive treatment with heterologous antibody. **Vaccine,** London, v. 11, n. 7, p. 743-747, 1993.

HINES, H.B.; BRUEGGEMANN, E.E. Factors affecting the capillary electrophoresis of ricin, a toxic glycoprotein. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 650, p. 199-208, 1994.

HRON, R.J.; KUK, M.S.; ABRAHAM, G. Determination of free and total gossypol by high performance liquid chromatography. **The Journal of the American Oils Chemists´ Society,** Chicago, v. 67, n. 3, p. 182-187, 1990.

HRON, R.J.; KUK, M.S.; WAN, P.J. Quick method for estimating free gossypol in cottonseed, meats, collets, and extracted meals. **The Journal of the American Oils Chemists´ Society,** Chicago, v. 73, n. 2, p. 199-202, 1996.

HUTCHKINSON, M. Castor beans. In: HUTCHKINSON, M. **The poisoner´s handbook.** Port Townsend: Loompanics Unlimeted, 1988. p. 7-9. Disponível em: <www.scribd.com/doc/7505320/The-Poisoners-Handbook. Acesso em: 10 jul. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola.** Rio de Janeiro: IBGE, 2012. 94 p.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA – IPEA. **Biodiesel no Brasil: desafios das políticas públicas para a dinamização da produção** (Comunicado do IPEA nº 137). Brasília: IPEA, 2012. 22 p. Disponível em: < http://www.ipea.gov.br/ portal/images/stories/PDFs/comunicado/120301_comunicadoipea137.pdf>. Acesso em: 16 de mar. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA - INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008, Revisão 04. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2013.

INTERNATIONAL CONFERENCE HARMONISATION - ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005, Geneva. Geneva: ICH/IFPMA, 2005. p. 11.

JENKINS, F.P. Allergenic and toxic components of castor bean meal: review of the literature and studies of the inactivation of these components. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** London, v. 14, p. 773-778, 1963.

JIA, L.; COWARD, L.C.; KERSTNER-WOOD, C.D.; CORK, R.L.; GORMAN, G.S.; NOKER, P.E.; KITADA, S.; PELLECCHIA, M.; REED, J.C. Comparison of pharmakocinetic and metabolic profiling among gossypol, apogossypol and apogossypol hexaacetate. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology,** New York, v. 1, p. 63-73, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17356822>. Acesso em: 05 de jan. 2013.

JONGSCHAAP, R.E.E.; CORRÉ, W.J.; BINDRABAN, P.S.; BRANDENBURG, W.A. **Claims and facts on *Jatropha curcas* L**. Wageningen: Plant Research International, 2007. (Report, 158). Disponível em: http://www.jatrophapatform.org/Liens/Download/Doc/Claims_and_facts_on_Jatropha_curcas_L%20_Wageningen_UR-Plant_Research_International-Jongschaap_et_al_2007.pdf. Acesso em: 10 Jul. 2008.

KATOLE, S.; SAHA, S.K.; SASTRY, V.R.B.; LADE, M.H.; PRAKASH, B. Intake, blood metabolites and hormonal profile in sheep fed processed Jatropha (*Jatropha curcas*) meal. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 170, p. 21-26, 2011.

KINGHORN, A.D. New techniques for the isolation and identification of phorbol esters and structurally related diterpenes. In: KEELER, R.F.; TU, A.T. **Toxicology of plant and fungal compounds.** New York: Marcel Dekker, 1991. chap. 11, p. 217-242. (Handbook of Natural Toxins, 6).

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes.** 3. ed. Santa Maria: UFSM, 2011. 212 p.

KUMAR, V.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary inclusion of detoxified *Jatropha curcas* kernel meal: effects on growth performance and metabolic efficiency in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Fish Physiology and Biochemistry,** Amsterdam, v. 36, n. 10, p. 1159-1170, 2010. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/d3g8710233x51811/fulltext.pdf>. Acesso em: 06 out. 2010.

LAVIOLA, B.G.; DIAS, L.A.S. Teor e acúmulo de nutrientes em folhas e frutos de pinhão-manso. **Revista Brasileira Ciência Solo**, Viçosa, v. 32, n. 5, p. 1969-1975, 2008.

LEE, K.-J.; DABROWSKI, K. High-performance liquid chromatographic determination of gossypol and gossypolone enantiomers in fish tissues using simultaneous electrochemical and ultraviolet detectors. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 779, p. 313-319, 2002.

LIBERALINO, A.A.; BAMBIRRA, E.A.; MORAES-SANTOS, T.; VIEIRA, E.C. *Jatropha curcas* L. seeds: chemical analysis and toxicity. **Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 31, p. 539–550, 1988.

LINDSEY, T.O.; HAWKINS, G.E.; GUTHRIE, L.D. Physiological responses to lactating cows to gossypol from cottonseed meal rations. **Journal of Dairy Science,** Lancaster, v. 63, n. 4, p. 562-573, 1980.

LONGO, C.; BUENO, I.C.S.; NOZELLA, E.F.; GODOY, P.B.; CABRAL FILHO, S.L.S.; ABDALLA, A.L. The influence of head space and inoculums dilition on vitro ruminal methane measurements. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1223, p. 62-65, 2006.

LOPES, K.P.; BRUNO, R.L.A.; COSTA, R.F.; BRUNO, G.B.; ROCHA, M.S. Efeito do beneficiamento na qualidade fisiológica e sanitária de sementes do algodoeiro herbáceo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 2, p. 426-435, 2006.

MACKINNON, P.J.; ALDERTON, M.R. An investigation of degradation of the plant toxin, ricin, by sodium hipoclorito. **Toxicon**, Oxford, v. 38, 287-291, 2000.

MAKKAR, H.P.S. *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. In: VERCOE, P.E.; MAKKAR, H.P.S.; SCHLINK, A.C. (Ed.). ***In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants**: nuclear and related methodologies. Dordrecht: Springer, 2010. cap. 7, p. 107-144.

MAKKAR, H.P.S.; ADERIBIGBE, A.O.; BECKER, K. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. **Food Chemistry,** Barking, v. 62, n. 2, p. 208-215, 1998.

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

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

MAKKAR, H.P.S.; MAES, J.; DE GREYT, W.; BECKER, K. Removal and degradation of phorbol esters during pre-treatment and transesterification of *Jatropha curcas* oil. **Journal of American Oil Chemist´s Society**, Chicago, v. 86, p. 173-181, 2009. Disponível em: <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Documento/JatrophaContrataciones/OPTIMIZACION EXTRACCIONESTEERES1.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2013.

MAKKAR, H.P.S.; KUMAR, V.; OYELEYE, O.O.; AKINLEYE, A.; ANGULO-ESCALANTE, M.A.; BECKER, K. Traditional wisdom confirmed by scientific research: Jatropha species from Mexico is non-toxic. **Nature Preceedings,** London, hdl:10101/npre.2010.4155.1. January 13, 2010. Disponível em: <http://www.jatropha.pro/PDF%20bestanden/Non%20Toxic%20Jatropha.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2013.

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

MARION, P.T. Castor meal - a new protein supplement. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 18, p. 153-157, 1967.

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

MATHUR, C.F.; SMITH, R.C.; HAWKINS, G.F. Growth and morphology of *Streptococcus bovis* and of mixed rumen bacteria in the presence of aflatoxin B_1, *in vitro*. **Journal of Dairy Science,** Lancaster, v. 59, n. 3, p. 455-458, 1976.

MAURICIO, R.M.; PEREIRA, L.G.R.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUEZ, N.M.; MARTINS, R.G.R.; RODRIGUES, J.A.S. Potencial da técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases para avaliação de silagens de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 1013-1020, 2003.

MEHRES, A.Z.; ORSKOV, E.R.; MACDONALD, I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **British Journal of Nutrition,** London, v. 38, p. 437-443, 1977.

MELO, C.M. **Estudo da atividade antiinflamatória antinociceptiva da lactona do ácido hawtriwaico, diterpeno de *Egletes viscosa* Less em camundongos: possíveis mecanismos.** 2006. 103 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará. 2006. Disponível em: <http://www.teses.ufc.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=221>. Acesso em: 06 ago. 2008.

MENA, H.; SANTOS, J.E.P.; HUBER, T.J.; SIMAS, J.M.; TARAZON, M.; CALHOUN, M.C. The effects of feeding varying amounts of gossypol from whole cottonseed and cottonseed meal in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 84, p. 2231-2239, 2001.

MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B.G. **Uso potencial e toxidez da torta de pinhão-manso**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009 (Comunicado Técnico, 1). Disponível em: <http://www.cnpae.embrapa.br/publicacoes-para-download/comunicado-tecnico/ano-2009>. Acesso em: 10 out. 2010.

MERTENS, D.R. Biological effects of mycotoxins upon rumen function and lactating dairy cows. In: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Interactions of mycotoxins in animal production:** proceeds of a symposium**.** Washington, DC: National Academy of Science, 1979. p. 118-138.

MILANI, M. **Descritores de mamona utilizados pela Embrapa algodão.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. 39 p. (Documentos, 192). Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Descritores+de+mamona+utilizados+pela+embrapa+algodao_000h4tvry6m02wx7ha0awymty2vut27z.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2013.

NIKOKYRIS, P.; KANDILYS, K.; DELIGIANNIS, K.; LIAMADIS, D. Effects of gossypol content of cottonseed cake on blood constituents in growing-fattening lambs. **Journal of Dairy Science,** Lancaster, v. 74, p. 4305-4313, 1991.

NOMEIR, A.A.; ABOU-DONIA, M.B. Gossypol: high performance liquid chromatography analysis and stability in various solvents. **The Journal of the American Oils Chemists´ Society**, Chicago, v. 59, n. 12, p. 546-549, 1982.

OECD. **Report on economic assessment of biofuel support policies:** 2007 MCM Mandate. Paris, 2008. 119 p. (TAD/CA(2008)6/Final).

OECD. **Consensus document on compositional considerations for new varieties of cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*)**: key food and feed nutrients and anti-nutrients. Paris, 2009. (Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, 11). Disponível em: <http://www.olis.oecd.org/olis/2004doc.nsf/LinkTo/NT0000480E/$FILE/JT00168142.PDF>. Acesso em: 01 nov. 2012.

OLIVEIRA, N.S. **Variabilidade genética em populações de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) pela metodologia da DAF (DNA Amplification Fingerprinting).** 2004, 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004. Disponível em: <http://www.bdtd.ufpe.br/tedeSimplificado//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=1146>. Acesso em: 12 jul. 2008.

OLIVEIRA, A.S.; OLIVEIRA, M.R.C.; CAMPOS, J.M.S; LANA, R.P.; MACHADO, O.L.T.; RETAMAL, C.A.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. In vitro ruminal degradation of ricin and its effect on microbial growth. **Animal Feed Science and Technology,** Amsterdam, v. 157, p. 41-54, 2010.

OLSNES, S. The history of ricin, abrin and related toxins. **Toxicon,** Oxford, v. 44, p. 361-370, 2004.

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

OLSNES, S.; FERNANDEZ-PUENTES, C.; CARRASCO, L.; VAZQUEZ, D. Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymatic activity of the toxin A-chains. **European Journal of Biochemistry,** Cambridge, v. 60, p. 281–288, 1975.

PESCE, D.M.C. **Efeito da dieta contendo caroço de algodão no desempenho, características quantitativas da carcaça e qualitativas da carne de novilhos Nelore confinados**. 2008. 155 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

PETROBIO. **Biodiesel:** viabilidade econômica. 2005. Disponível em: <www.petrobio.com.br>. Acesso em: 19 jul. 2008.

PETROBIO. **Biodiesel:** aspectos atuais e viabilidade de aplicação. 2006. Disponível em: <www.petrobio.com.br>. Acesso em: 07 jul. 2008.

PINKERTON, S.D.; ROLFE, R.; AULD, D.L.; GHETIE, V.; LAUTERBACH, B.F. Selection of castor for divergent concentrations of ricin and *Ricinus communis* Agglutinin. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 2, p. 353-357, 1999.

PIRES, J.M.F.; FRAUCHES, C.; SOUZA, R.S.C.; FARIA-MACHADO, A.F.; MENDONÇA, S.; ANTONIASSI, A. Éster de forbol em tortas de pinhão manso. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUIMICA SBQ, 34., 2011, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: SBQ, 2011. Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/cdrom/34ra/trabalhos.htm>. Acesso em: 21 dez. 2012.

POLI, M.A.; RIVERA, V.R.; HEWETSON, J.F.; MERRILL, G.A. Detection of ricin by colorimetric and chemiluminiscence elisa. **Toxicon,** Oxford, v. 32, n. 11, p. 1371-1377, 1994.

PRADHAN, S.; NAIK, S.N.; KHAN, M.A.I.; SAHOO, P.K. Experimental assessment of toxic phytochemicals in *Jatropha curcas*: oil,cake, bio-diesel and glycerol. **Journal of Science Food and Agriculture**, London, v. 92, p. 511-519, 2011.

PRZYLBYLSKI, P. Spectroscopic and semiempirical study of Gossypol complexes with Fe^{+2} e Fe^{+3} cátions. **Journal of Molecular Structure,** Amsterdam, v. 569, 147-155, 2001. Disponível em: <http://144.206.159.178/FT/620/36613/631356.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2013.

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

RANDEL, R.D.; CHASE JUNIOR, C.C.; WYSE, S.J. Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of animals. **Journal of Animal Science,** Albany, v. 70, n. 5, p. 1628-1638, 1992.

RATHMANN, R.; BENEDETTI, O.; PLÁ, J.A.; PADULA, A.D. **Biodiesel:** uma alternativa estratégica na matriz energética brasileira? Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/ArtigoBiodieselGINCOB-UFRGS.pdf>. Acesso em: 8 jul. 2008.

PEDREIRA, M.S.; PRIMAVESI, O. Impacto da produção animal sobre o ambiente. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. cap. 16, p. 497-511.

REEFAT, A.A.; ATTIA, N.K.; SIBAK, H.A.; EL SHELTAWY, S.T.; ELDIWANI, G.I. Production optimization and quality assessment of biodiesel from waste vegetable oil. **International Journal Environmental Science and Technology,** Heidelberg, v. 5, n. 1, p. 75-82, 2008.

REISER, R.; FU, H.C. The mechanism of gossypol detoxification by ruminant animals. **Journal of Nutrition,** Bethesda, v. 76, p. 215-218, 1962.

RISCO, C.A.; HOLMBERG, C.A.; KUTCHES, A. Effect of graded concentrations of gossypol on calf performance: toxicological and pathological considerations. **Journal of Dairy Science,** Lancaster, v. 75, p. 2787-2798, 1992.

RODRIGUES NETO, A.J. Caroço de algodão na alimentação bovina. **CATI Responde**, Campinas, n. 2, 1996. Disponível em: <http://www.cati.sp.gov.br/novacati/tecnologias/catirespondev/cr2caroco_algodao.html>. Acesso em: 11 jul. 2008.

RODRIGUES, R.A.; PANARIELLO, M.R.; FONSECA, C.R.; GRANDO, F.L.M.; GONÇALVES, E.D.; BARROS, R.G.L.; BRESSAN FILHO, A.; CAMPOS, A.A.; CRISTO, C.M.P.N.; NASCIMENTO, P.B.; FOSTER, M.G.S.; FERREIRA NETO, A.M. **Relatório final do grupo de trabalho interministerial encarregado de apresentar estudos sobre a viabilidade de utilização de óleo vegetal** – biodiesel como fonte alternativa de energia. Brasília, DF, 2003. Disponível em: <www.biodiesel.gov.br/docs/relatoriofinal/pdf.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2008.

SANTOS, J.E.P.; VILLASEÑOR, M.; DEPETTERS, E.J.; ROBINSON, P.H.; BALDWIN JUNIOR, B.C. Type of cottonseed and level of gossypol in diets of lactating dairy cows: effects on lactation performance and plasma gossypol. **Journal of Dairy Science,** Lancaster, v. 85, p. 1491-1501, 2002.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**. Versão 9.1. Cary, NC, 2009.

SCHEP, L.J.; TEMPLE, W.A.; BUTT, G.A.; BEASLEY, M.D. Ricin as weapon of mass terror: separating fact from fiction. **Environment International,** New York, v. 35, p. 1267-1271, 2009.

SEBRAE. SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Biodiesel**. Brasília, DF: SEBRAE, 2008. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/ Cartilha_Sebrae.pdf> Acesso em: 16 jul. 2009.

SEVERINO, L.S. **O quê sabemos sobre a torta de mamona.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. (Documentos, 134). Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/ publicacoes/DOC134.PDF>. Acesso em: 10 jul. 2008.

SEVERINO, L.S.; NÓBREGA, M.B.M.; GONÇALVES, N.P.; EGUIA, M.T.J. **Viagem à Índia para prospecção de tecnologias sobre mamona e pinhão-manso.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 56 p. (Documentos, 153).

SEVERINO, L.S.; LIMA, R.L.S.; BELTRÃO, N.E.M. **Avaliação de mudas de pinhão-manso em recipientes de diferentes volumes**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 81). Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/publicacoes/2007/BOLETIM81.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2008.

STEENBLIK, R. **Liberalisation of trade in renewable energy and associated technologies: biodiesel, solar thermal and geothermal energy.** Joint working party on trade and environment. Paris: OECD, 2006. 26 p. (OECD Trade and Environment Working Paper, 2006-01). Disponível em: <http://www.oecd.org/trade>. Acesso em: 16 set. 2010.

STIRPE, F. Ribossome-inativating proteins. **Toxicon,** Oxford, v. 44, p. 371-383, 2004.

STRØM-HANSEN, T.; CORNETT, C.; JAROSZEWSKI, J.W. Interaction of gossypol with aminoacids and peptides as a model of enzyme inhibition. **International Journal of Peptide and Protein Research,** Copenhagen, v. 34, p. 306-310, 1989.

SUJATHA, M.; REDDY, T.P.; MAHASI, M.J. Role of biotechnological interventions in the improvement of the castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L **Environment International,** New York, v. 26, p. 424-435, 2008.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; McALLAN, A.B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 48, p. 185-197, 1994.

TEIXEIRA, D.A.B.; BORGES, I. Efeito do nível de caroço integral de algodão sobre o consumo e digestibilidade aparente da fração fibrosa do feno de braquiária (*Brachiaria decumbens*) em ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina, Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 2, p. 229-233, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v57n2/a15v57n2.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2008.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. Imunidade cruzada pelas sementes de *Abrus precatorius* e *Ricinus communis* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** Brasília, DF, v. 17, n. 1, p. 25-35, 1997.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **A comprehensive analysis of biodiesel impacts on exhaust emissions**. Draft technical report. Washington, DC, 2002. Disponível em: <http://www.epa.gov/omswww/models/analysis/biodsl/p02001.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2008.

VOGG, A.; ACHATZ, S.; KETTRUP, A.; SANDERMANN Jr.; H. Fast, sensitive and selective liquid chromatographic–tandem mass spectrometric determination of tumor-promoting diterpene esters. **Journal of Chromatography A,** Amsterdam, v. 855, p. 563-573, 1999.

YU, Y.-W. Probing into the mechanism of action, metabolism and toxicity of gossypol by studying its (+)- and (-)- stereoisomers. **Journal of Ethnopharmacology,** Lausanne, v. 20, p. 65-78, 1987.

WANG, M.Z. Analysis of gossypol by high performance liquid chromatography. **Journal of Ethnopharmacology,** Lausanne, v. 20, p. 1-11, 1987.

WANG, J.M.; TAO, X.L.; XU, L.X., LIN; WU, J.; WANG, M.; ZHANG, G.Y. Differential binding of (+) and (-) gossypol to plasma protein and their entry into rat testis. **Journal of Reproduction and Fertility,** Cambridge, v. 97, p. 277-282, 1992.

WU, D.-F. Determination of gossypol enantiomers in plasma after administration of racemate using high performance liquid chromatography with precolumn chemical derivatisation. **Journal of Chromatography,** Amsterdam, v. 433, p. 141-148, 1988.