

LUCAS SOUZA DE CARVALHO

REDUÇÃO DA TOXICIDADE DE RESÍDUO DE PINHÃO-
MANSO (*Jatropha curcas*) POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
FEVEREIRO/ 2022

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Mateus Gomes de Godoy e coorientação de Maysa Silva Barreto.

SC331r Souza de Carvalho, Lucas
Redução da toxicidade de resíduo de pinhão-manso
(*Jatropha curcas*) por fermentação em estado sólido / Lucas Souza de
Carvalho. -- Rio de Janeiro, 2022.
49 f.

Orientador: Mateus Gomes de Godoy.

Coorientadora: Maysa Silva Barreto.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) Universidade
Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel
em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Pinhão-manso. 2. *Jatropha curcas*. 3. Ésteres de Forbol. 4.
Fermentação em estado. 5. FES. I. Gomes de Godoy, Mateus,
orient. II. Silva Barreto, Maysa, coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES /
UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Lucas Souza de Carvalho**

DRE: 118039145

BANCA EXAMINADORA: Prof^ª. Ana Maria Mazotto de Almeida (Presidente)
Prof^ª. Elisa D'Avila Costa Cavalcanti
MSc. Taissa Ferreira de Oliveira Souza
Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)

Título da Monografia: **“Redução da toxicidade de resíduo de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) por fermentação em estado sólido”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/buc-uyvp-vvt>

Data e hora de início: **21 de fevereiro de 2022 às 14:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 21 de fevereiro de 2022.

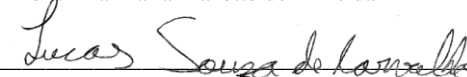
NOTA	Banca Examinadora:
<u> 9,0 </u>	Prof ^ª . Ana Maria Mazotto de Almeida
<u> 9,0 </u>	Prof ^ª . Elisa D'Avila Costa Cavalcanti
<u> 9,0 </u>	MSc. Taissa Ferreira de Oliveira Souza
_____	Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius

Presidente da banca



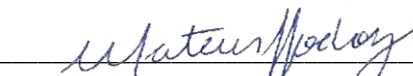
Prof^ª. Ana Maria Mazotto de Almeida

Aluno:



Lucas Souza de Carvalho

Orientador:



Prof. Mateus Gomes de Godoy / Coorientador: M.Sc. Maysa Silva Barreto

Coordenador
de TCC



Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais e ao meu irmão pelo apoio e incentivo que tornaram possível chegar até aqui.

A Maysa, minha coorientadora, por ter me ensinado e ajudado tanto nesses anos. Ao Mateus Godoy, que sem a sua orientação esse trabalho nunca teria saído da teoria. Aos amigos do LaBEM e LaBIM pela prontidão em ajudar. À professora Denise por ceder o laboratório e possibilitar a execução desse trabalho.

Ao LaMMP por disponibilizar o uso de equipamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento ao longo do projeto e ao Comitê PIBIC-UFRJ pela bolsa de Iniciação Científica.

RESUMO

LUCAS SOUZA DE CARVALHO

REDUÇÃO DA TOXICIDADE DE RESÍDUO DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas*) POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Orientador: Mateus Gomes de Godoy

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O pinhão-manso é uma planta oleaginosa cujo óleo extraído da semente pode ser utilizado para diversas aplicações, como, por exemplo, para a produção de biodiesel. Do processo de extração do óleo, há a geração de um resíduo sólido denominado torta de pinhão-manso. Esse resíduo é altamente nutritivo e de baixo custo, sendo um forte candidato para ração animal. Entretanto, apresenta níveis consideráveis de ésteres de forbol que, por serem altamente tóxicos, inviabilizam o uso da torta para alimentação animal, sendo, portanto, necessário destoxificar a torta para que adquira valor comercial (Godoy, 2013). Ao longo do tempo foram desenvolvidos diferentes métodos químicos, físicos e biológicos, como a fermentação em estado sólido (FES), para a remoção dos ésteres de forbol (Gomes *et al.*, 2018). Neste trabalho foi utilizada FES, sendo a torta de pinhão-manso a matriz sólida e a fonte de nutrientes. Os fungos utilizados foram: *Penicillium simplicissimum*, *P. brevicompactum*, *Trichoderma sp.* e *Rhizopus sp.* A fermentação ocorreu com umidade inicial em 50%, em câmara climática a 30°C e umidade a 90% por até 14 dias. Posteriormente, foi realizada a extração metanólica do éster de forbol da torta de pinhão-manso fermentada e quantificação do seu teor por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Makkar, 2016), usando como controle positivo o *P. simplicissimum* (já descrito como degradador (Godoy, 2013) e a torta de pinhão manso *in natura* como controle negativo. De todas fermentações, foram analisados o pH, a umidade e a atividade de água a cada 24h, para acompanhar o processo de fermentação em estado sólido e avaliar se a atividade de água e umidade reduzem ou não para níveis não sustentáveis para o crescimento fúngico. As respectivas porcentagens de degradação de éster de forbol foram: *P. brevicompactum* (4,66%), *P. simplicissimum* (5,81%), *Rhizopus sp.* (35,74%) e *Trichoderma sp.* (56,36%). Para melhor compreensão da degradação promovida pelo fungo *Rhizopus sp.* foi feita a uma cinética enzimática de lipase e peptidase, onde foi possível encontrar a atividade de lipase máxima de 0,31 U/g no 6º dia e a atividade máxima de peptidase de 0,82 U/g no 4º dia da fermentação. Para maior compreensão do crescimento do fungo foi feita uma curva de crescimento por N-acetilglicosamina onde a curva estabilizou a partir do 5º dia. Nenhum dos fungos foi capaz de degradar completamente os ésteres de forbol, ainda assim a degradação promovida pelo *Rhizopus sp.* e pelo *Trichoderma sp.* são um indicativo do potencial de ambos os gêneros.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido; Destoxificação; *Jatropha curcas*; Ésteres de forbol.

ABSTRACT

LUCAS SOUZA DE CARVALHO

REDUCTION OF *Jatropha curcas* RESIDUE TOXICITY BY SOLID STATE FERMENTATION

Orientador: Mateus Gomes de Godoy

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Jatropha curcas is an oilseed plant and its oil has several applications, such for biodiesel production. The seed cake, produced on the oil extraction step, is low-cost and highly nutritious, being a good source for animal feed. However, the high levels of phorbol esters (PEs), which are very toxic, make impossible the use of the *Jatropha* cake (JC) as animal feed. Most of the PEs are withdrawn together with the extracted oil. However, the remainder PE is still much higher than the safe limit. Thus, several chemical, biological and physical methods were developed to remove the phorbol esters in order to make the seed cake useful and profitable. Solid-state fermentation (SSF) is one of the most promising methods for the detoxification process. In this work, we used the SSF with filamentous fungi lipases producers for the biodegradation of *Jatropha* cake. The fungi used were: *Penicillium simplicissimum*, *P. brevicompactum*, *Trichoderma sp.*, *Rhizopus sp.*. SSF was carried out at 30° C with initial moisture at 50% until 14 days. After the fermentation, the phorbol esters (PEs) were extracted from the cake and its amount was analyzed using High-performance liquid chromatography (HPLC). The final phorbol esters degradations were: *P. brevicompactum* (4,66%), *P. simplicissimum* (5,81%), *Rhizopus sp.* (35,74%) and *Trichoderma sp.* (56,36%). For a better understanding of the degradation promoted by *Rhizopus sp.* An enzymatic kinetic was carried out with lipase and peptidase. The higher lipase activity (0,31U/g) was found on day 6, and the higher peptidase activity (0,82U/g) was found on day 4. An analysis of N-acetylglucosamine concentration was made to better understand the fungi growth. The N-acetylglucosamine concentration stabilized at day 5. Moisture, water activity and pH were measured every 24 hours with the intent to check if their levels declined to levels non-sustainable for fungi growth. In the end, none of them were capable of completely degrading the PE. Nonetheless, the *Rhizopus sp.* and *Trichoderma sp.* capacity to degrade the PE shows that both genera have the potential to degrade the PE completely.

Keywords: Solid-state fermentation, Detoxification, *Jatropha curcas*, phorbol ester.

RESUMO PARA LEIGOS**LUCAS SOUZA DE CARVALHO****REDUÇÃO DA TOXICIDADE DE RESÍDUO DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas*) POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO****Orientador: Mateus Gomes de Godoy****Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

O pinhão-manso é uma planta oleaginosa cujo óleo extraído da semente pode ser utilizado para diversas aplicações, como, por exemplo, para a produção de biodiesel. Do processo de extração do óleo, há a geração de um resíduo sólido denominado torta de pinhão-manso. Esse resíduo é altamente nutritivo e de baixo custo, sendo um forte candidato para ração animal. Entretanto, apresenta níveis consideráveis de um conjunto de toxinas chamadas de ésteres de forbol, os quais inviabilizam o uso da torta para alimentação animal. Portanto, é necessário destoxificar a torta para que adquira valor comercial (Godoy, 2013). Ao longo do tempo foram desenvolvidos diferentes métodos químicos, físicos e biológicos, como a fermentação em estado sólido (FES), para a remoção dos ésteres de forbol (Gomes *et al.*, 2018). A FES é uma fermentação na presença de oxigênio em que não há líquido livre e microrganismo cresce no material sólido. Nesse trabalho foi utilizada FES, sendo a torta de pinhão-manso a matriz sólida e a fonte de nutrientes. Os fungos utilizados foram: *Penicillium simplicissimum*, *P. brevicompactum*, *Trichoderma sp.* e *Rhizopus sp.* A fermentação ocorreu em câmara com controle de umidade e temperatura por 14 dias. Após a fermentação, os ésteres de forbol que permaneceram na torta de pinhão-manso foram removidos com o auxílio de um solvente e sua quantidade foi medida por uma técnica chamada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Makkar, 2016). Parâmetros importantes para a sobrevivência do fungo como pH, umidade e atividade de água foram medidos diariamente para assegurar o sucesso da FES. Os dois fungos com maior degradação foram *Rhizopus sp.* (35,74%) e *Trichoderma sp.* (56,36%). Para melhor compreensão da degradação promovida pelo fungo, *Rhizopus sp.* foi feita a análise da produção de enzimas, mais especificamente de lipase e peptidase, onde foi possível encontrar a atividade de lipase máxima no 6º dia e a atividade máxima de peptidase no 4º dia da fermentação. Para maior compreensão do crescimento do fungo foi feita uma análise de crescimento onde ele estabilizou a partir do 5º dia. Nenhum dos fungos foi capaz de degradar completamente os ésteres de forbol, ainda assim a degradação promovida pelo *Rhizopus sp.* e pelo *Trichoderma sp.* são um indicativo do potencial de ambos os gêneros.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais matérias-primas utilizadas como fonte de óleo para produção de biodiesel no Brasil em 2020, os respectivos volumes de óleo utilizados, porcentagem de óleo e massa de resíduo estimada.....	9
Tabela 2 – Gradiente de eluição utilizado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) para análise de ésteres de forbol.....	18
Tabela 3 – Resultados de análise de pH na fermentação por 7 dias dos fungos: <i>P. simplicissimum</i> , <i>P. brevicompactum</i> e <i>Rhizopus sp.</i>	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- <i>Jatropha curcas</i> . A. Plantação de <i>J. curcas</i> . Extraído de: https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/667003/pinhao-manso . Acesso em 21/05/2021. B. Cacho de frutos de <i>J. curcas</i> . Extraído de: https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/1162002/pinhao-manso . Acesso em 21/05/2021.....	1
Figura 2 – Representação da geração de óleo a partir da semente de pinhão-manso.....	4
Figura 3 – Ésteres de forbol presentes em <i>Jatropha curcas</i> . Extraído de: (Roach <i>et al.</i> 2012).....	6
Figura 4 - Fermentação em estado sólido com torta de pinhão-manso. Fermentação de 7 dias com <i>Rhizopus sp.</i> em torta de pinhão-manso (esquerda). Torta de pinhão-manso in natura (centro). Corte lateral de FES com <i>Rhizopus sp.</i> em torta de <i>J. curcas</i> (direita).	10
Figura 5 - Análises de umidade e atividade de água de torta de pinhão-manso em FES com <i>P. simplicissimum</i> por 14 dias.	21
Figura 6 - Análises de umidade e atividade de água de torta de pinhão-manso em FES com <i>P. brevicompactum</i> por 7 dias.	22
Figura 7 - Análises de umidade e atividade de água de torta de pinhão-manso em FES com <i>Rhizopus sp.</i> por 7 dias.	22
Figura 8 - Análises de umidade e atividade de água de torta de pinhão-manso em FES com <i>Rhizopus sp.</i> por 14 dias.	23
Figura 9 - Análises de umidade da fermentação por 14 dias com o fungo <i>Trichoderma sp.</i>	23
Figura 10 – Cromatograma típico do extrato metanólico obtido da torta de pinhão-manso <i>in natura</i>	24
Figura 11 - Resultados da análise por CLAE de concentração ($\mu\text{g/g}$) de ésteres de forbol da torta de pinhão-manso <i>in natura</i> e da fermentação por 14 dias dos fungos: <i>P. simplicissimum</i> (dias 7 e 14), <i>Rhizopus sp.</i> (dias 3, 7 e 14), <i>P. brevicompactum</i> (dia 7) e <i>Trichoderma sp.</i> (dias 7 e 14). Os valores foram obtidos a partir da média de duplicatas.....	25
Figura 12 - Medidas de umidade e atividade de água da fermentação com <i>Rhizopus sp.</i> por 7 dias...	26
Figura 13 - Evolução da fermentação com <i>Rhizopus sp.</i> em torta de pinhão-manso. A: 1 dia de crescimento. B: 2 dias de crescimento. C: 3 dias de crescimento. D: 7 dias de crescimento.....	26
Figura 14 - Cinética enzimática e curva de crescimento de <i>Rhizopus sp.</i> em torta de pinhão-manso.	27
Figura 15 - Curva padrão de forbol-12-miristato 13-acetato.	38

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i>)	1
1.1.1	Usos do óleo de pinhão-manso e dos seus resíduos	2
1.2	Toxicidade da torta de pinhão-manso	5
1.2.1	Ésteres de Forbol	5
1.2.1.1	Atividade Cancerígena e inflamatória dos ésteres de forbol	6
1.2.2	Outros compostos antinutricionais	7
1.3	Destoxificação de coprodutos industriais	8
1.4	Fermentação em Estado Sólido	10
2	JUSTIFICATIVA	13
3	OBJETIVOS	14
3.1	Objetivo geral	14
3.2	Objetivos específicos	14
4	MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1	Microrganismos	15
4.2	Preparo do inóculo para fermentação	15
4.3	Fermentação em Estado Sólido	15
4.4	Medida de atividade de água	16
4.5	Medida de pH	16
4.6	Medida de Umidade	16
4.7	Quantificação do crescimento celular	16
4.8	Extração de ésteres de forbol	17
4.9	Detecção e quantificação de ésteres de forbol	17
4.10	Atividade enzimática	18
4.10.1	Atividade Lipásica	18
4.10.2	Atividade Peptidásica	19
5	RESULTADOS	21
5.1	Acompanhamento dos parâmetros de processo	21
5.1.1	Umidade e atividade de água	21
5.1.2	pH	24
5.2	Ésteres de forbol	24
5.3	Perfil de produção enzimática	26
6	DISCUSSÃO	28
7	CONCLUSÃO	33
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pinhão-manso (*Jatropha curcas*)

O pinhão-manso é um arbusto (Figura 1) da família Euphorbiaceae, conhecido por ser uma planta oleaginosa e da sua semente ser extraído um óleo de alta pureza com várias aplicações, sendo a principal o uso como matéria-prima para biocombustíveis (Laviola et al., 2012; Makkar; Becker, 2009; Ranucci et al., 2015; Sánchez-Arreola et al., 2015). As principais vantagens do pinhão-manso frente as outras oleaginosas são: (i) não compete com o mercado de alimentos, portanto não gera conflitos éticos; (ii) é uma planta capaz de crescer em solos degradados, possivelmente recuperando-os; (iii) gera biodiesel de alta qualidade; e (iv) possui teor de óleo superior ao encontrado nas sementes de soja e de outras oleaginosas como mamona e linhaça (Makkar *et al.*, 2009; Makkar e Becker, 2009; Herrera *et al.*, 2010; Singh; Singh, 2010; Russin *et al.*, 2011; Singh et al., 2021).



Figura 1- *Jatropha curcas*. **A.** Plantação de *J. curcas*. Extraído de: <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/667003/pinhao-manso>. Acesso em 21/05/2021. **B.** Cacho de frutos de *J. curcas*. Extraído de: <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/1162002/pinhao-manso>. Acesso em 21/05/2021.

Por se tratar de uma planta versátil capaz de crescer em diversos locais do mundo e nas mais diversas condições climáticas e tipos de solo (Makkar e Becker, 2009; Pereira *et al.*, 2018), foi considerada uma das melhores alternativas para a fonte de óleo para biocombustíveis. No entanto, alguns aspectos ainda dificultam a ampla comercialização do óleo de pinhão-manso: a queda no preço do petróleo, aliada com má gestão de subsídios, falta de linhagens de plantas otimizadas para as características regionais e a consequente baixa (Edrisi *et al.*, 2015; Navarro-Pineda *et al.*, 2017; Gomes *et al.*, 2018; Soto *et al.*, 2018). Porém, perspectivas de aumento do

preço do petróleo a longo prazo, por se tratar de um recurso finito, e a pressão de ambientalistas por fontes energéticas menos poluentes, fazem com que pesquisas na área de biocombustíveis, inclusive sobre o pinhão-mansão, se justifiquem. Um dos indicativos é persistência na produção de trabalhos sobre *J. curcas*, inclusive com estudos buscando identificar genes que podem ser alvos de aprimoramento genético para aumentar a produtividade da planta (Gangwar e Shankar, 2020) e trabalhos que buscam aprimorar a planta com diferentes técnicas de cruzamento (Laviola *et al.*, 2012, 2017). Entretanto, a vida longa da planta torna o cruzamento lento, de forma que, até hoje a planta ainda está em processo de domesticação (dos Santos *et al.*, 2021). Um estudo feito em uma província mexicana indicou que seria necessário aumentar a produtividade da planta em mais de duas vezes para o seu cultivo ser economicamente viável. Entretanto o mesmo estudo indicou que a maior parte do custo de produção vinha da mão de obra durante a colheita, portanto o problema real não parece ser a falta de produtividade da planta e sim a falta de técnicas e maquinário adequados para a colheita. (Navarro-Pineda *et al.*, 2017). Para isso, estão sendo feitos estudos para determinar as práticas de manejo adequadas, corrigir mitos como a suposta resistência a seca, quando na verdade a *J. curcas* somente é capaz de sobreviver em momentos de estiagem (Wani, Garg e Chander, 2016), além de aumentar a rentabilidade da cultura ao agregar valor comercial aos subprodutos, por exemplo a torta de pinhão-mansão, gerados no cultivo e na extração de óleo de pinhão-mansão.

1.1.1 Usos do óleo de pinhão-mansão e dos seus resíduos

Embora o óleo de pinhão-mansão tenha diversas aplicações, o uso na produção de biodiesel é a principal e, dessa forma, a queda do preço do petróleo foi de grande impacto na viabilidade comercial do óleo de pinhão-mansão (Pereira *et al.*, 2018; Soto *et al.*, 2018). Ainda assim, é importante que um país tenha a matriz energética, inclusive as fontes de óleo vegetal, diversificada, portanto é necessário continuar buscando meios de lidar com o principal resíduo do pinhão-mansão, a torta de pinhão-mansão. Esse resíduo é gerado pela extração do óleo da semente do pinhão-mansão por prensagem mecânica (Figura 2). Após a extração o óleo é destinado para produção de biocombustíveis enquanto a torta de pinhão-mansão, por ser tóxica, permanece sem destino definido. Os trabalhos sobre a torta de pinhão-mansão envolvem tentativas de destoxificar a torta por meio de: processos fermentativos extremamente longos (Barros *et al.*, 2011; Najjar *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2018;) ou com microrganismos potencialmente patogênicos (Joshi, Mathur e Khare, 2011); processos de combustão da torta

para geração de energia (Makkar e Becker, 2009; Heredia Salgado *et al.*, 2020); torrefação da biomassa vegetal (Watanabe *et al.*, 2014); e uso como fertilizante natural (Gomes *et al.*, 2018).

O óleo de pinhão-mansão possui diversas utilidades, por exemplo: matéria-prima para sabão (Openshaw, 2000), na medicina alternativa como purgativo (Sánchez *et al.*, 2018), fonte de ésteres de forbol para laboratórios e, principalmente, como matéria-prima para biocombustíveis, desde biodiesel para veículos (Makkar e Becker, 2009) até mesmo bioquerosene de aviação (Ranucci *et al.*, 2015). A consequência disto é a geração em larga escala do seu principal resíduo, a torta de pinhão-mansão, em proporção aproximada de 2 toneladas de torta por tonelada de óleo produzida (Gomes *et al.*, 2018).

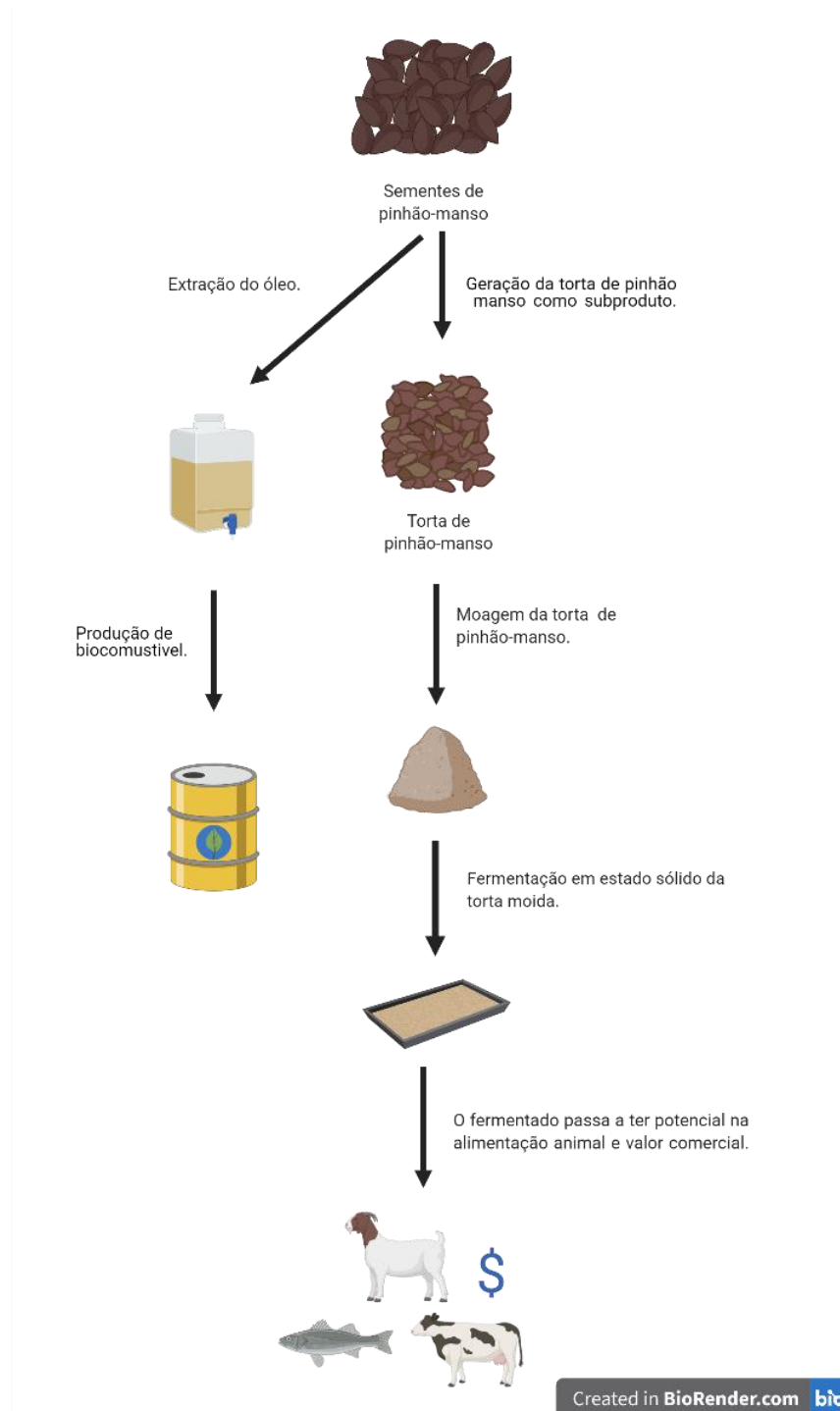


Figura 2 – Representação da geração de óleo a partir da semente de pinhão-mansão.

O mercado brasileiro de biocombustíveis é expressivo, tendo produzido, somente em 2020, 6 milhões de metros cúbicos de biodiesel (ANP, 2020), tendendo a crescer nos próximos anos. Os biocombustíveis aumentam a sua parcela no mercado de combustíveis anualmente, não somente por ser previsto o esgotamento das reservas de petróleo nas próximas décadas como também por conta dos diversos acordos ambientais firmados ao longo das últimas décadas (Makkar e Becker 2009; Shafiee e Topal, 2009; Sánchez-Arreola *et al.*, 2015; OECD/FAO, 2019). Tais acordos pressionam governos e empresas multinacionais a adotarem fontes

energéticas menos poluentes que os combustíveis fósseis, por exemplo substituindo o diesel fóssil por biodiesel produzido a partir do óleo extraído de plantas oleaginosas como pinhão-manso e a soja.

O mercado de biocombustíveis, assim como outras *commodities*, oscila bastante, principalmente para plantas que não podem ser usadas na alimentação e para as quais outras aplicações não são capazes de absorver o excesso de produção. Ainda assim, segundo relatório da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), o mercado de óleos vegetais tende a crescer nos próximos anos e dessa forma há possibilidade de recuperação da produção perdida na última década. Uma outra projeção importante para os próximos anos é o aumento na preferência, da União Europeia e dos Estados Unidos, por biocombustíveis oriundos de matérias-primas não comestíveis, como lignocelulose, resíduos agroindustriais e plantas não alimentícias (OECD/FAO, 2019).

Com isso, é inevitável o aumento na produção da torta de pinhão-manso. Essa torta é rica em proteínas, (Makkar, Aderibigbe e Becker, 1998) e carboidratos. O teor de proteína na faixa de 45% e os teores de aminoácidos, exceto lisina, superiores aos recomendados pela FAO/OMS, indicam potencial para uso na alimentação animal (Martínez-Herrera *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2016). Entretanto, um dos mecanismos de defesa da planta contra pragas e doenças é a produção de ésteres de forbol, compostos que possuem efeito tóxico e indutor de tumores em animais (Makkar e Becker, 2009; EFSA, 2015), o que torna o seu uso na alimentação animal inviável.

Existem trabalhos sobre a redução de ésteres de forbol em pinhão-manso por via molecular (Li *et al.*, 2016). Entretanto, alterar mecanismos de defesa da planta pode ter um resultado incerto, pois pode fazer com que a planta seja mais suscetível a pragas e doenças, o que compromete a produtividade da planta. O impacto direto entre a produção de ésteres de forbol e a produtividade da planta é alvo de contestações, entretanto alguns autores encontraram dados experimentais indicando tal relação causa-efeito (Laviola *et al.*, 2012) corroborando que é preferível encontrar métodos de destoxificar a torta ao invés de usar plantas atóxicas.

1.2 Toxicidade da torta de pinhão-manso

1.2.1 Ésteres de Forbol

Os ésteres de forbol (Figura 3) são estruturalmente um esqueleto carbônico de diterpenos tetracíclicos que se esterificam a ácidos graxos e assim formam o éster de forbol.

São definidos como: “compostos policíclicos nos quais dois grupos hidroxila nos átomos de carbono vizinhos são esterificados em ácidos graxos” (Beutler *et al.*, 1989). Dentre as diversas plantas portadoras de ésteres de forbol, *J. curcas* se destaca por possuir 6 tipos de ésteres de forbol (Haas, Sterk e Mittelbach, 2002) e outros tipos de compostos tóxicos e/ou antinutricionais, tais como curcina, fitatos, saponinas e ácido cianídrico (Makkar e Becker, 2009; Xiao *et al.*, 2011; Veerabhadrapa, Shivakumar e Devappa, 2014; Zhang *et al.*, 2016). A via metabólica da produção de ésteres de forbol ainda não foi completamente elucidada, mas já foram identificados genes essenciais para a via (King *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2016).

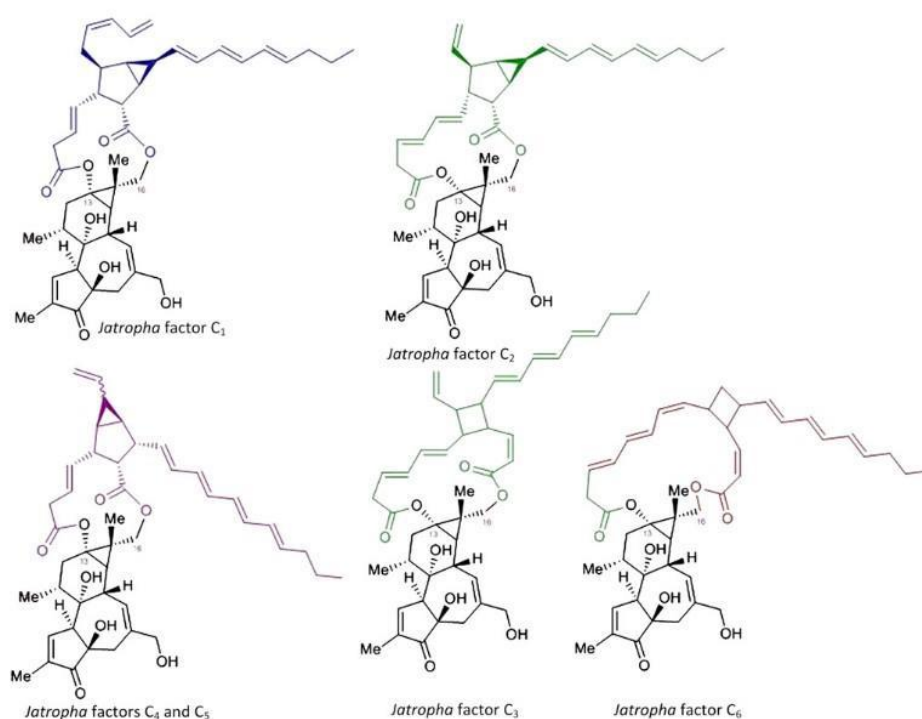


Figura 3 – Ésteres de forbol presentes em *Jatropha curcas*. Extraído de: (Roach *et al.* 2012)

1.2.1.1 Atividade Cancerígena e inflamatória dos ésteres de forbol

O conjunto de ésteres de forbol (Figura 3) presente em *J. curcas* é tóxico para muitas espécies animais, como ratos, camundongos, peixes, galinhas, cabras e vacas (Aregheore, Becker e Makkar, 2003; Martínez-Herrera *et al.*, 2006; Makkar e Becker, 2009; Li *et al.*, 2010; Katole *et al.*, 2013). Nas etapas iniciais do processamento de biodiesel, ainda é possível verificar a presença de ésteres de forbol que, por apresentarem toxicidade dérmica e ocular em testes *in vitro* (Devappa *et al.*, 2013), representam um possível risco ocupacional para os trabalhadores da usina de processamento (Makkar e Becker, 2009). Quanto ao biodiesel pronto,

não há presença de ésteres de forbol, pois eles são degradados durante a etapa de produção (Makkar *et al.*, 2009), de forma que não há risco de exposição dos trabalhadores de postos de abastecimento.

Os ésteres de forbol são considerados co-carcinogênicos, pois não tem efeito direto na indução de tumores, mas promovem o seu crescimento ao ativar a proteína quinase C (PKC) que tem papel regulatório no ciclo celular. No metabolismo celular convencional, a PKC é ativada por diacilglicerol (DAG) que é rapidamente degradado. Já no caso dos ésteres de forbol, eles não são rapidamente degradados, o que leva a ativação contínua da PKC. A ativação prolongada dessa enzima afeta o seu papel na regulação do crescimento e diferenciação celular, resultando no aumento da eficiência de outros agentes carcinogênicos (Goel *et al.*, 2007; Oskoueian, Abdullah e Ahmad, 2012).

A característica co-carcinogênica dos ésteres de forbol, além de serem potentes e tóxicos em baixas concentrações, faz com que os níveis considerados seguros de ésteres de forbol sejam extremamente baixos, pois efeitos tardios por exposição a concentrações sub-inflamatórias não podem ser descartados. Consequentemente, a concentração segura de ésteres de forbol foi estabelecida em 3µg/g de resíduo tratado, que é o mínimo detectável pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizado (Makkar, 2016).

Os diferentes tipos de ésteres de forbol tem efeitos diferentes em cada espécie de animal por afetarem vias metabólicas ligeiramente distintas. Entretanto, o efeito inflamatório agudo é quase canônico, ocorrendo principalmente no trato gastrointestinal, que é o principal tecido exposto. De modo geral, leva a perda de apetite, diarreia, desidratação e possivelmente morte (EFSA, 2015). Ensaios *in vitro* indicaram relação entre os ésteres de forbol e a ativação de proteína quinase C promotora de apoptose, elucidando assim um dos modos como os ésteres de forbol geram intensa resposta inflamatória (Oskoueian, Abdullah e Ahmad, 2012). Além disso, ensaios *in vitro* também indicaram que a característica anfipática dos ésteres de forbol tornam propícias ligações com receptores celulares, promovendo alterações na absorção de nutrientes, na adesão celular e no metabolismo de lipídeos (Goel *et al.*, 2007).

1.2.2 Outros compostos antinutricionais

Além dos ésteres de forbol, foi descrita a presença de curcuma, fitatos, inibidores de tripsina e saponinas (Makkar e Becker, 2009; Xiao *et al.*, 2011). Entretanto, por se tratar de compostos termolábeis ou em concentrações baixas, não tem efeitos particularmente significativos em testes na alimentação animal, como na de carpas (Makkar e Becker, 2009).

Além disso, em testes *in vitro*, com o óleo de pinhão-manso de variantes não produtoras de ésteres de forbol, não foi observada toxicidade dérmica e ocular, indicando que os ésteres de forbol são os responsáveis pelo efeito tóxico. Ainda assim, esses compostos antinutricionais prejudicam a absorção de nutrientes e a digestão, conseqüentemente, diminuem a qualidade da ração. Portanto, é recomendado a aplicação de tratamento térmico e adição de fitase (Makkar e Becker, 2009). A aplicação de fitase é feita para a degradação dos fitatos, já o tratamento térmico degrada consideravelmente lectinas, inibidores de tripsina e outros compostos antinutricionais presentes (Aregheore, Becker e Makkar, 2003). Tradicionalmente, algumas populações no México consomem variantes que não possuem ésteres de forbol, portanto consideradas atóxicas, sem gerar sintomas de intoxicação, pois o tratamento térmico desenvolvido e aperfeiçoado por gerações degrada a maior parte dos compostos antinutricionais, de tal forma que o consumo é considerado seguro (Martínez-Herrera *et al.*, 2006).

1.3 Destoxificação de coprodutos industriais

Países com expressiva participação da agropecuária na economia como o Brasil geram anualmente milhões de toneladas em resíduos agroindustriais. Por exemplo, segundo painel da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) foram usados 7 milhões de m³ de óleos e gorduras para a produção de biodiesel em 2020 (ANP, 2020). Para a produção desses óleos foram geradas milhões de tonelada de resíduos que, devido à grande quantidade, se tornam um problema econômico e ambiental. Por isso, são procurados meios de utilizar esses resíduos de forma economicamente viável, seja como ração, como matéria-prima para processos biológicos ou como matéria-prima para geração de energia pela sua queima (Bocchini Martins *et al.*, 2011; Liguori, Amore e Faraco, 2013; Maiti *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2018; Heredia Salgado *et al.*, 2020).

Tabela 1 – Principais matérias-primas utilizadas como fonte de óleo para produção de biodiesel no Brasil em 2020, os respectivos volumes de óleo utilizados, porcentagem de óleo e massa de resíduo estimada.

Matéria-prima para biodiesel	Volume de óleo usado	Porcentagem de óleo	Massa de resíduo estimada (t)**
Óleo de Soja	4,7 milhões de m ³	15-20% ^[1]	22 milhões
Outros materiais graxos*	750 mil m ³	----	----
Gordura animal	738 mil m ³	----	----
Óleo de palma	166 mil m ³	30-60% ^[1]	203 mil
Óleo de algodão	110 mil m ³	23-27% ^[3]	330 mil
Óleo de milho	15 mil m ³	4% ^[2]	360 mil
Óleo de Canola	4 mil m ³	40-45% ^[1]	5,4 mil
Óleo de girassol	1000 m ³	25-35% ^[1]	2,3 mil
Óleo de palmiste	338 m ³		

*Contempla misturas de matérias-primas em tanque e reprocessamento de sub-produtos gerados na produção de biodiesel. ** Estimativa baseada no teor de óleo da oleaginosa e no volume de óleo utilizado. [1] (Singh *et al.*, 2020). [2] (Lima *et al.*, 2004). [3] (Gondim-Tomaz *et al.*, 2016)

No caso da torta de pinhão-manso é necessária a eliminação dos ésteres de forbol da mesma para que possa ser utilizada, por exemplo, para alimentação animal (Gomes *et al.*, 2018). Como a ausência de ésteres de forbol tornaria a planta mais vulnerável a pragas e doenças (Makkar e Becker, 2009), logo menos produtiva, a utilização comercial das linhagens atóxicas se torna dificultada, sendo, portanto, necessário o desenvolvimento de métodos capazes de destoxificar este resíduo.

Existem métodos químicos, enzimáticos e físicos de destoxificação que utilizam calor, solventes, enzimas e radiação (Aregheore, Becker e Makkar, 2003; Xiao *et al.*, 2011; Gogoi, Niyogi e Tyagi, 2014), entretanto tais métodos são problemáticos em muitos aspectos. O uso de radiação é caro, a operação é perigosa e a degradação é insuficiente; o uso de enzimas é inviabilizado pelo alto custo das mesmas; o uso de calor consegue degradar a maior parte dos compostos antinutricionais, mas não tem impacto expressivo nos ésteres de forbol; já os métodos químicos apresentaram resultados mais satisfatórios a custos mais acessíveis, entretanto tem impacto ambiental negativo por serem poluentes, além de poderem degradar componentes nutricionais e tornar o odor da torta pouco atraente para os animais, de forma que há redução do consumo pelos mesmos (Aregheore, Becker e Makkar, 2003; Krishna, 2005; Xiao *et al.*, 2011). O uso de processamento biológico, utilizando microrganismos em um

processo biotecnológico conhecido como fermentação em estado sólido (FES), tem se mostrado uma opção potencialmente mais vantajosa para eliminação de compostos tóxicos em resíduos agroindustriais (Brand *et al.*, 2000; Godoy *et al.*, 2009; Chen, Vadlani e Madl, 2014).

1.4 Fermentação em Estado Sólido

Os microrganismos podem ser usados para degradar os ésteres de forbol tanto em fermentação submersa (Najjar *et al.*, 2014) quanto em fermentação em estado sólido (FES). A fermentação em estado sólido consiste na utilização de um meio de cultivo sólido como fonte de nutrientes e suporte para crescimento de microrganismos, sem presença de líquido livre visível (Krishna, 2005).



Figura 4 - Fermentação em estado sólido com torta de pinhão-manso. Fermentação de 7 dias com *Rhizopus sp.* em torta de pinhão-manso (esquerda). Torta de pinhão-manso in natura (centro). Corte lateral de FES com *Rhizopus sp.* em torta de *J. curcas* (direita).

A FES tem algumas vantagens quando comparada a fermentação submersa, dentre elas o menor risco de contaminação, por ser um ambiente mais hostil para o crescimento microbiano no qual nem todos os microrganismos conseguem prosperar. Além disso, os meios de cultura comerciais usados na fermentação submersa correspondem a parte significativa do custo do processo. Já na FES, resíduos agroindustriais podem ser utilizados como fonte de nutrientes, o que gera uma economia significativa. Uma outra economia é de a água, já que fermentação submersa, em escala industrial, envolve o uso de imensos tanques como reatores levando a uma grande geração de resíduos de fermentação. Também se destaca a produtividade volumétrica maior, pois na FES a torta de pinhão-manso não está diluída em meio líquido e sim concentrada de forma sólida. Com isso, a fábrica pode ser mais compacta o que significa menor custo de aluguel e de construção. Entretanto, a FES também tem desvantagens como difícil

escalonamento, troca de calor e aeração limitadas, difícil regulação da umidade e incompatibilidade com diversos microrganismos (Krishna, 2005).

Ao longo dos anos, foi demonstrado que a FES pode ser utilizada na destoxificação de diferentes resíduos, por exemplo na degradação de taninos e cafeína da casca de café (Brand *et al.*, 2000), na degradação de fitatos do farelo de soja (Chen, Vadlani e Madl, 2014), na degradação de corantes da indústria têxtil (Iandolo *et al.*, 2011) e na degradação da ricina da torta de mamona (Godoy *et al.*, 2009). A fermentação em estado sólido também pode ser utilizada para aumentar o valor nutricional de resíduos agroindustriais para uso na alimentação animal, por exemplo do farelo de trigo (Zhao, Guo e Zhu, 2017) e aumentando a concentração de compostos fenólicos, flavonoides e a atividade antioxidante da aveia comum (Cai *et al.*, 2012). Quase todos esses processos supracitados de FES foram realizados com fungos filamentosos, que, em geral, são microrganismos tolerantes a baixa atividade de água e alta pressão osmótica presentes na FES, além de sua forma de crescimento em hifas propiciar a colonização e melhor aproveitamento da matéria-prima. Dessa forma, os fungos filamentosos são considerados microrganismos ideais para serem usados na FES (Krishna, 2005).

Para poder ser feita a seleção dos microrganismos a serem utilizados em uma fermentação, seja ela submersa ou em estado sólido, é necessário definir as características desejadas para o microrganismo que irá executar o bioprocessamento de interesse. No caso da destoxificação da torta de pinhão-manso por FES, como explicado acima, é importante que seja um fungo filamentoso. Hidayat *et al.*, (2014), propôs que a semelhança entre a ligação éster forbol-ácido graxo com a ligação éster no diacilglicerol tornava os ésteres de forbol potenciais alvos de lipases. Após testes usando lipases extraídas de arroz, Hidayat *et al.*, (2014) concluiu que as lipases, em meio aquoso, são capazes de hidrolisar ésteres de forbol. Portanto também é importante que o microrganismo escolhido seja produtor de lipases. As peptidases não têm um papel muito importante na degradação dos ésteres de forbol, entretanto são capazes de degradar as lipases, e assim limitar a atividade lipásica. Portanto, é desejado que os fungos utilizados produzam pouca peptidase ou peptidases com baixa atividade.

Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa foi feita a degradação parcial dos ésteres de forbol com *Penicillium simplicissimum* (Godoy, 2013; Rodrigues, 2019), entretanto a impossibilidade de atingir a degradação completa tornou necessária a busca por novos fungos que em condições otimizadas podem ser capazes de degradar os ésteres de forbol até níveis seguros. O potencial dos fungos de degradar os ésteres de forbol pode ser confirmado pelos diferentes trabalhos encontrados na literatura. Barros *et al.*, (2011) utilizaram fungos lignolíticos em fermentação submersa por 30 dias para degradar os ésteres de forbol até níveis

seguros. Veerabhadrapa, Shivakumar e Devappa, (2014) conseguiram reduzir a concentração de ésteres de forbol em 81% ao utilizar o fungo *Aspergillus versicolor* em fermentação em estado sólido por 4 dias.

2 JUSTIFICATIVA

Os altos níveis de emissão de CO₂ gerados pelo consumo de combustíveis fósseis levam a busca de novas fontes energéticas (OECD/FAO, 2019), sendo uma delas os biocombustíveis. O uso de biocombustíveis leva a diminuição da emissão de CO₂, entretanto os resíduos de agroindústria inevitavelmente gerados na produção de biocombustíveis muitas vezes são problemas ambientais. Somente em 2020 o Brasil usou 7 milhões m³ de óleos e gorduras para a produção de biodiesel, considerando que as plantas oleaginosas, em geral, têm teor de óleo de até 50% (Singh e Singh, 2010) é possível presumir que foram produzidas milhões de toneladas de resíduos. Seja pelo volume ou pela toxicidade, o descarte de tais resíduos não pode ser feito em aterros sanitários ou incinerados, necessitando de despejo adequado, o que é oneroso para o produtor. No caso da torta de pinhão-manso, resíduo oriundo da extração do óleo das sementes de pinhão-manso, é necessária a eliminação dos ésteres de forbol (compostos extremamente tóxicos, presentes na torta) para que esse resíduo tenha utilidade industrial. Como a ausência de ésteres de forbol tornaria a planta mais vulnerável a pragas e doenças, logo menos produtiva (Laviola *et al.*, 2012), é necessário desenvolver métodos de destoxificar a torta e não a planta. Além de mitigar o custo de descarte de torta de pinhão-manso, o seu uso como ração aumenta a margem de lucro do produtor rural, o que é extremamente importante para a *J. curcas*, que nem sempre apresenta produtividades economicamente viáveis (Soto *et al.*, 2018). Uma outra vantagem é deixar de usar grãos utilizados na alimentação humana como componentes de ração animal, evitando-se, assim, possíveis conflitos éticos.

Os outros métodos, sejam eles químicos ou físico geralmente são mais dispendiosos e tem efeitos negativos na capacidade nutritiva e no odor da torta, levando a redução do consumo pelos animais (Aregheore, Becker e Makkar, 2003; Krishna, 2005; Xiao *et al.*, 2011), fazendo com que o uso de microrganismos seja a melhor opção. Ainda que alguns autores já tenham utilizado fungos filamentosos, nenhum autor conseguiu a degradação completa dos ésteres de forbol com um processo economicamente viável. Dessa forma, é necessário buscar novos fungos que sejam capazes de degradar os ésteres de forbol em tempo curto e sem necessidade de suplementação dispendiosa.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Selecionar fungos potencialmente degradadores dos ésteres de forbol presentes na torta de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) por meio da fermentação em estado sólido.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar fungos filamentosos potencialmente degradadores de ésteres de forbol.
- Acompanhar o perfil de crescimento fúngico durante o cultivo.
- Avaliar a produção de lipases e peptidases fúngicas na torta de pinhão-manso fermentada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram utilizados 4 fungos produtores de lipases, portanto potenciais degradadores de ésteres de forbol, da coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM-IQ-UFRJ). Os fungos escolhidos foram: *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium simplicissimum*, *Trichoderma sp.* e *Rhizopus sp.* Os microrganismos e o resíduo utilizados nesse trabalho estão cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, do Ministério do Meio Ambiente (Cadastro de acesso A7A68AD).

4.2 Preparo do inóculo para fermentação

A obtenção do inóculo para a FES foi realizada através da propagação das cepas em meio BDA (batata-dextrose-ágar) e incubados em estufa por 7 dias a 30° C, quando foram então recuperados com tampão fosfato de sódio pH 7 e 0,1M adicionada de pérolas de vidro e tween 80. A suspensão de esporos gerada foi contada em câmara de Neubauer (Freire *et al.*, 1997) e o inóculo padronizado adicionado diretamente a matéria-prima da fermentação.

4.3 Fermentação em Estado Sólido

O processo de fermentação em estado sólido (FES) foi conduzido em reatores do tipo bandeja (béquer de 600ml), sendo a torta de pinhão-manso (adquirido através da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais EPAMIG em 03/12/2014) o meio basal e o suporte sólido.

A FES foi baseada em método descrito por Godoy (2013), sendo conduzida com 20g de matéria-prima, formando uma camada de aproximadamente 1 cm de espessura com umidade inicial de 50% e inóculo de 2×10^7 esporos/g de torta seca. O cultivo foi conduzido em câmara climática à 30°C e 90% de umidade. Foram conduzidas fermentações individuais com os fungos *P. simplicissimum*, *P. brevicompactum*, *Trichoderma sp.* e *Rhizopus sp.* por até 14 dias e foram retirados pontos de análise em duplicata a cada 24 horas. Na fermentação para obter a cinética enzimática foram retirados pontos em triplicata. Cada amostragem foi realizada de forma destrutiva, ou seja, um béquer foi utilizado para cada tempo analisado.

4.4 Medida de atividade de água

Amostras de aproximadamente 1,0 g de material fermentado foram analisadas em um higrômetro (Aqualab Decagon), para a determinação da atividade de água em diferentes tempos de fermentação (Godoy, 2013). De cada duplicata da fermentação foi feita a análise de atividade de água em duplicata.

4.5 Medida de pH

Foi adicionado 0,5 g do material fermentado em 5 ml de água destilada, seguido de agitação vigorosa. Depois de 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e o pH aferido com o auxílio de um potenciômetro (Hanna edge® HI2002) (Godoy, 2013). De cada duplicata da fermentação foi feita a análise de pH em duplicata.

4.6 Medida de Umidade

A umidade foi determinada em balança de umidade (AnD MX-50 Moisture Analyzer Balance) utilizando 1g de material fermentado em alguns pontos (Godoy, 2013). Para o *P. simplicissimum* foi feita análise dos pontos dos dias 3, 4, 5, 6, 7 e 14. Para o *P. brevicompactum* foi feita análise dos pontos dos dias 3, 5, 6 e 7. Para o *Rhizopus sp.* foi feita análise dos pontos dos dias 3, 4, 5, 6, 7 e 14. Para o *Trichoderma sp.* foi feita análise dos pontos dos dias 7 e 14. De cada duplicata da fermentação foi feita a análise de umidade em duplicata.

4.7 Quantificação do crescimento celular

A quantificação do crescimento celular foi realizada de forma indireta através da dosagem de N-acetilglicosamina. Para isto, foram adicionados 5 ml de HCl 6N a 0,5 g de amostra, colocando-se a mistura em banho de água fervente por 2 horas. Em seguida, a amostra foi resfriada e filtrada em filtro de papel. Em seguida 2 ml do filtrado foram transferidos para um balão volumétrico de 10 ml, adicionando-se 1 gota de solução alcoólica de fenolftaleína 0,5% (m/v), sendo a neutralização efetuada com solução de NaOH 6 N, até que a coloração

fique de tonalidade rosa. Posteriormente, foi realizada a titulação reversa com KHSO_4 , 1%, até a coloração voltar a cor original. O volume do balão volumétrico foi completado com água destilada. Após esta etapa, foi adicionado 1 ml de solução de acetilacetona em Na_2CO_3 0,5 N (1:50) à 1ml da solução, colocando a mistura em banho de água fervente por 20 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 6 ml de etanol e, em seguida, 1 ml de p-dimetilaminobenzaldeído (reagente de Erlich). Os tubos foram então incubados a 65°C por 10 minutos e a absorbância lida a 530 nm contra um branco, no qual foi adicionada água destilada ao invés de amostra (Aidoo, Henry e Wood, 1981).

4.8 Extração de ésteres de forbol

A extração foi feita com 2g de fermentado em 15ml metanol (100%) alocados em um Falcon de 50ml; o material, mantido em banho de gelo, foi sonicado em um sonicador de ponta (SONICS Vibra cell 750) à 240W por 3 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado à temperatura ambiente (3000 g; 8 minutos) e o sobrenadante retirado; o processo foi repetido mais duas vezes com a mesma amostra. O sobrenadante das três repetições foi então seco em rotaevaporador a vácuo. Para recuperar o extrato, foram adicionados 2ml de metanol e o balão de rotaevaporador sonicado em sonicador de banho por 4 minutos. O recuperado foi retirado e o processo repetido por mais duas vezes, gerando volume total de 6ml. O extrato resultante dos três ciclos de sonicação foi novamente seco, utilizando gás nitrogênio, para em seguida ser suspenso utilizando 2ml de metanol grau HPLC e agitação em vortex. O extrato foi centrifugado a 8100 g por 15 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro de teflon $0,22\mu\text{m}$ e alocado em vial âmbar para ser analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Makkar, Siddhuraju e Becker, 2007).

4.9 Detecção e quantificação de ésteres de forbol

A análise foi realizada em CLAE (HPLC - Agilent Technologies 1260 Infinity II, CA, EUA) utilizando três fases móveis denominadas A, B e C sendo elas respectivamente: 1,75 mL de ácido *o*-fosfórico (85%) em 1L de água deionizada, Acetonitrila (100%) e Tetrahidrofurano.

As amostras foram eluídas de uma coluna de fase reversa C-18 (KROMASIL 100 $5\mu\text{m}$ X 4,6 X 250mm), à 25°C , sob um fluxo de 1,3 ml/min, seguindo gradiente de eluição da

Tabela 2 (Makkar, Siddhuraju e Becker, 2007). Os picos característicos de ésteres de forbol foram detectados utilizando um detector de arranjo de diodos (DAD - Agilent Technologies 1260 Infinity II, CA, EUA), integrados a 280 nm e o resultado expresso em

equivalente de forbol-12- miristato 13-acetato (Sigma-Aldrich) a partir de uma curva de calibração com forbol-12- miristato 13-acetato em concentrações entre 25 µg/ml e 1000 µg/ml.

Tabela 2 – Gradiente de eluição utilizado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) para análise de ésteres de forbol.

Tempo (minutos)	Fase Móvel A (%)	Fase Móvel B (%)	Fase Móvel C (%)
0	40	60	0
0-20	25	75	0
20-28	0	100	0
28-30	0	100	0
30-33	0	0	100
33-34	0	0	100
34-36	40	60	0
36-38	40	60	0

O resultado foi expresso em micrograma de éster de forbol por grama de torta seca (µg/g).

4.10 Atividade enzimática

Ao final da fermentação, foram adicionados 5 ml de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0) por grama de torta. A extração enzimática foi realizada em um agitador rotatório a 35°C e 200 rpm por 20 minutos. Posteriormente, a torta fermentada foi prensada manualmente para a obtenção do extrato enzimático bruto. Em seguida, o extrato bruto foi centrifugado, a 604 g por 5 minutos, para remoção de sólidos mais finos. O sobrenadante foi utilizado para dosagem da atividade lipásica e peptidásica (Godoy, 2013).

4.10.1 Atividade Lipásica

A quantificação da atividade de lipase foi realizada por método espectrofotométrico, o qual se baseia na formação de um produto cromóforo (*p*-nitrofenol) a partir da reação de hidrólise do *p*-nitrofenil laurato catalisada pelas lipases. A solução do substrato é preparada utilizando-se 0,25 mL de *p*-nitrofenil laurato 2,5 mM em 2,2 ml de tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7.0. A reação foi iniciada utilizando 0,05 ml do extrato enzimático e conduzida a 30°C.

O progresso da reação (formação do *p*-nitrofenol) foi acompanhado em tempo real em espectrofotômetro com leituras das absorvâncias a 412 nm. Uma unidade internacional (UI) é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1,0 μmol de *p*-nitrofenil laurato por minuto nas condições descritas anteriormente. A atividade lipásica foi expressa em U/g de massa seca inicial. (Godoy, 2013)

4.10.2 Atividade Peptidásica

A atividade peptidásica foi determinada pelo método descrito por (Charney e Tomarelli, 1947 *apud* Godoy, 2013) que se baseia na formação de derivados corados de proteínas a partir da digestão de uma solução de azocaseína com as enzimas proteolíticas presentes no extrato enzimático. Deve ser adicionado 0,5 ml de azocaseína 0,5% m/v em tampão acetato (50mM, pH 5.0) a amostra (0,5 ml), já previamente diluída em tampão acetato (50 mM, pH 5,0). A mistura resultante foi incubada a 40°C por 10 minutos, de forma a garantir que a reação ocorra em condições de velocidade inicial. Em seguida, a reação foi paralisada adicionando-se 1 ml. de ácido clorídrico (HCl 1 M). A seguir, os tubos são centrifugados a 6700 g por 2 minutos para remover o substrato não digerido. Depois da centrifugação a absorvância desta solução é então determinada em espectrofotômetro a 345 nm. O branco do aparelho foi preparado adicionando-se 0,5 ml de água destilada em substituição à amostra. O branco da reação foi preparado adicionando-se 0,5 ml da amostra somente após a adição do HCl. Uma unidade de atividade de peptidase (U) é definida como a quantidade de enzima que causa uma diferença unitária de absorvância entre a amostra e seu respectivo branco por minuto, nas condições de ensaio, de modo que o cálculo da atividade enzimática foi realizado de acordo com a equação abaixo.

$$A_p = \frac{(Abs_a \cdot f_a - Abs_b \cdot f_b)}{t \cdot V_a}$$

Onde:

- A_p = atividade de peptidase (U/ml)
- Abs_a = absorvância da amostra
- f_a = fator de diluição da amostra
- Abs_b = absorvância do branco da reação
- f_b = fator de diluição do branco
- t = tempo de reação (min)
- V_a = volume da amostra (ml)

A atividade peptidásica por grama (U/g) é calculada pela multiplicação da U/ml pelo volume de tampão utilizado na extração e esse resultado dividido pela massa seca.

5 RESULTADOS

5.1 Acompanhamento dos parâmetros de processo

A água é essencial para o metabolismo dos microrganismos na FES, para saber se as condições da fermentação ainda estavam favoráveis para o crescimento, foram analisadas as atividades de água e umidade das fermentações com os fungos *P. simplicissimum*, *P. brevicompactum*, *Rhizopus sp.* e *Trichoderma sp.* Ademais também foi feita a análise do pH, pois é um parâmetro que pode ser responsável por modular o metabolismo do fungo ou de suas enzimas.

5.1.1 Umidade e atividade de água

A Figura 5 mostra os valores de umidade e atividade de água da fermentação conduzida utilizando o fungo *P. simplicissimum* em torta de pinhão-manso por 14 dias.

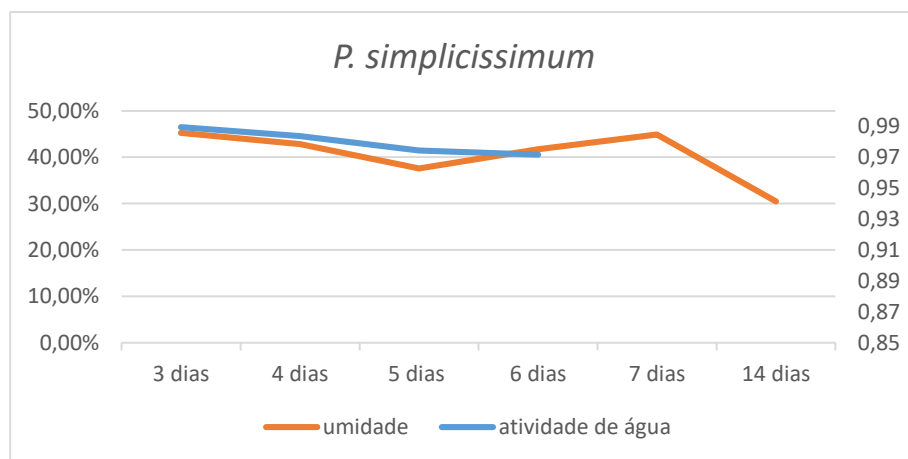


Figura 5 - Análises de umidade e atividade de água de torta de pinhão-manso em FES com *P. simplicissimum* por 14 dias.

Ao longo dos primeiros 7 dias da fermentação com o fungo *P. simplicissimum* os valores de umidade e atividade de água oscilaram, mas a umidade reduziu somente 5%. A queda na umidade foi mais acentuada entre os dias 7 e 14, onde observou-se um decréscimo de quase 15%, acumulando 19,5% de queda desde o início da fermentação. Não foi necessário medir a atividade de água entre os dias 6 e 14.

Foi realizado um cultivo com o fungo *P. brevicompactum* por 7 dias e durante o processo também foi feito o acompanhamento dos valores de umidade e atividade de água (Figura 6).

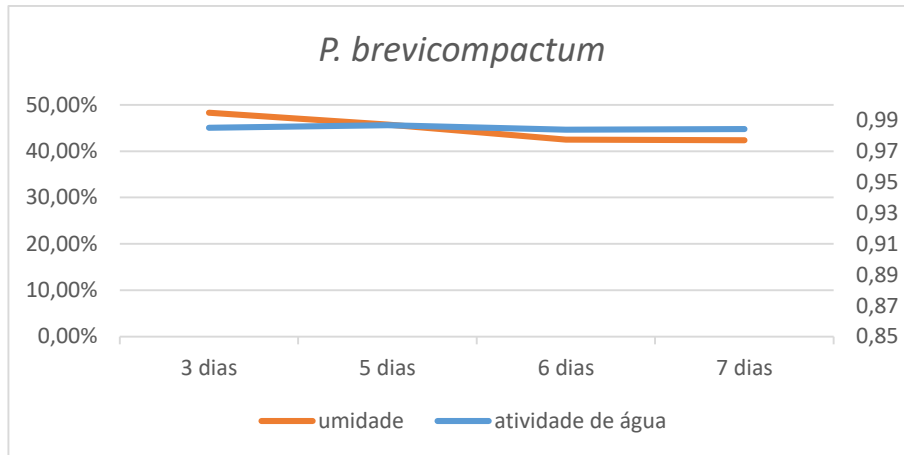


Figura 6 - Análises de umidade e atividade de água de torta de pinhão-mansão em FES com *P. brevicompactum* por 7 dias.

Ao longo da fermentação por 7 dias com o fungo *P. brevicompactum*, a atividade de água permaneceu estável e a umidade reduziu somente 7,6%.

A Figura 7 mostra o cultivo de 7 dias realizado com o fungo *Rhizopus sp.* Visando verificar se os parâmetros de processo ainda eram favoráveis ao crescimento, foi feita análise de umidade e atividade de água ao longo da fermentação.

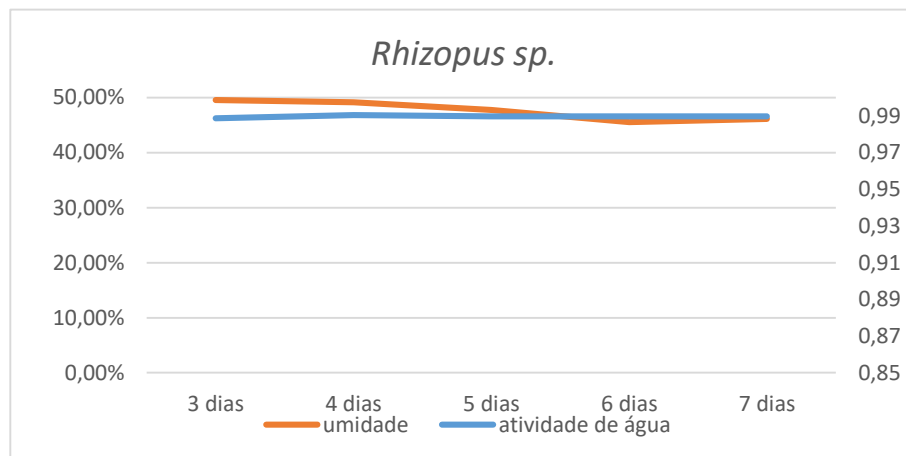


Figura 7 - Análises de umidade e atividade de água de torta de pinhão-mansão em FES com *Rhizopus sp.* por 7 dias.

Ao longo do crescimento por sete dias com o fungo *Rhizopus sp.*, os valores de umidade caíram, mas a queda foi de somente 4%. Já a atividade de água permaneceu estável.

Foi feita uma segunda fermentação, dessa vez por 14 dias, a fim de verificar os parâmetros do processo em um tempo maior (Figura 8).

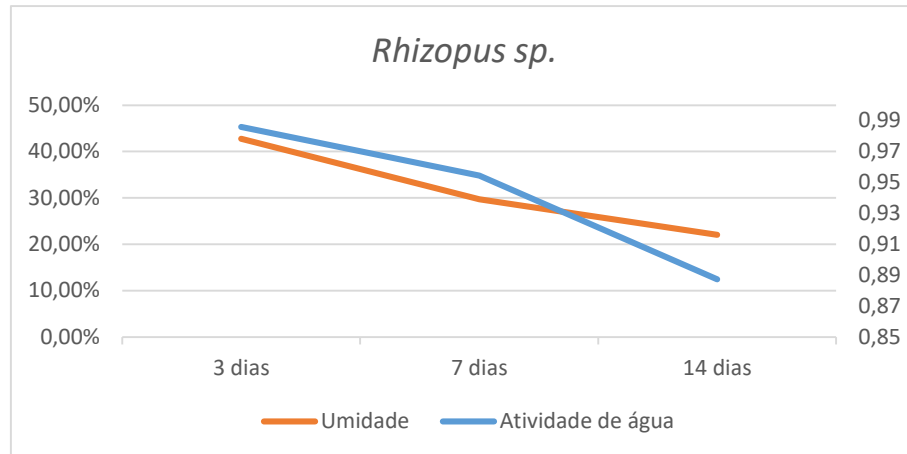


Figura 8 - Análises de umidade e atividade de água de torta de pinhão-manso em FES com *Rhizopus sp.* por 14 dias.

Durante a fermentação por 14 dias com o fungo *Rhizopus sp.* os valores de atividade de água caíram drasticamente, assim como a umidade que reduziu 28%, o que, considerando o tempo de fermentação, já era esperado.

Ao longo das fermentações anteriores foi possível observar que a umidade não caiu para níveis muito baixos nos 7 primeiros dias e, conforme será explicado no tópico 5.2, seria necessário estender a fermentação. Portanto o cultivo com o fungo *Trichoderma sp.* foi conduzido por 14 dias e foi medido o valor de umidade dos pontos de 7 e 14 dias (Figura 9).

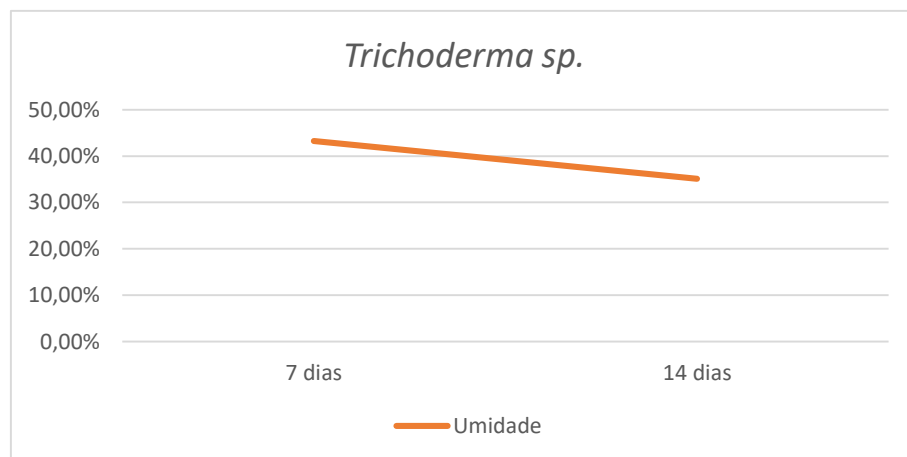


Figura 9 - Análises de umidade da fermentação por 14 dias com o fungo *Trichoderma sp.*

A fermentação por 14 dias foi conduzida com os fungos *P. simplicissimum*, *Rhizopus sp.* e *Trichoderma sp.*. Nessa fermentação a queda de umidade foi maior que na fermentação por 7 dias e chegou a níveis que possivelmente comprometem o metabolismo fúngico

5.1.2 pH

Durante a fermentação, o pH da matéria-prima pode variar. Para saber se o pH tinha mudado para valores extremos foi feita a medição do pH dos cultivos por 7 dias dos fungos *P. simplicissimum*, *P. brevicompactum* e *Rhizopus sp.*

Tabela 3 – Resultados de análise de pH na fermentação por 7 dias dos fungos: *P. simplicissimum*, *P. brevicompactum* e *Rhizopus sp.*

Dias de fermentação	<i>P. simplicissimum</i>	<i>P. brevicompactum</i>	<i>Rhizopus sp.</i>
3	7,07	7,46	8
4	7,47	-----	8,04
5	7,61	8,14	8,25
6	7,72	8,32	8,15
7	-----	8,27	8,08

Em nenhum dos três fungos houve grande variação do pH, especialmente o *Rhizopus sp.* que permaneceu estável durante os 7 dias de fermentação.

5.2 Ésteres de forbol

Ao longo do cultivo, foram analisadas as concentrações de ésteres de forbol, a fim de verificar uma possível degradação desses compostos tóxicos pelo crescimento fúngico. Essa análise, executada conforme metodologia explicada no tópico 4.9, é feita por CLAE e o resultado obtido a partir de curva de calibração com forbol-12-miristato 13-acetato (Anexo 1). Na Figura 10 é possível observar o cromatograma da torta *in natura* em que o somatório das áreas dos picos de ésteres de forbol, área do gráfico sombreada, corresponde a concentração de ésteres de forbol.

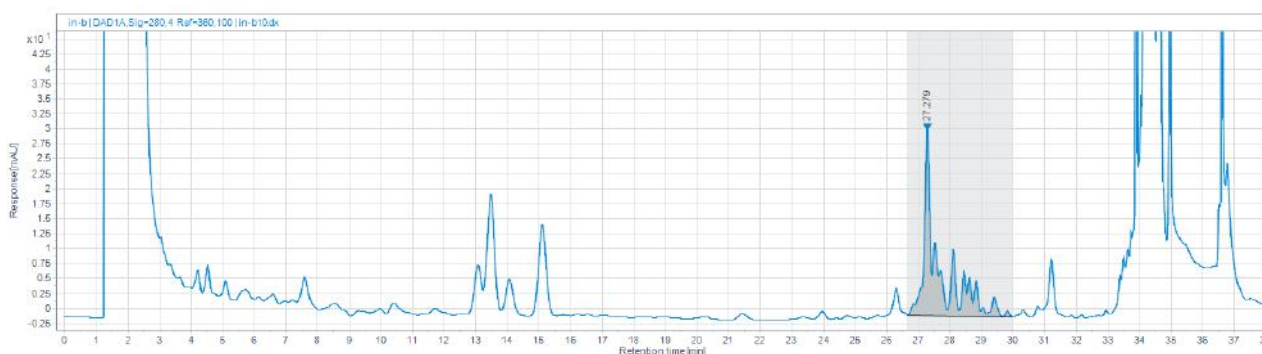


Figura 10 – Cromatograma típico do extrato metanólico obtido da torta de pinhão-manso *in natura*.

Foi feita análise da concentração de ésteres de forbol na torta de pinhão-manso fermentada por 7 dias com *P. brevicompactum*, na torta de pinhão-manso fermentada por 14 dias com os fungos *P. simplicissimum*, *Rhizopus sp.* e *Trichoderma sp.* Além da torta *in natura* que foi utilizada como controle negativo (Figura 11).

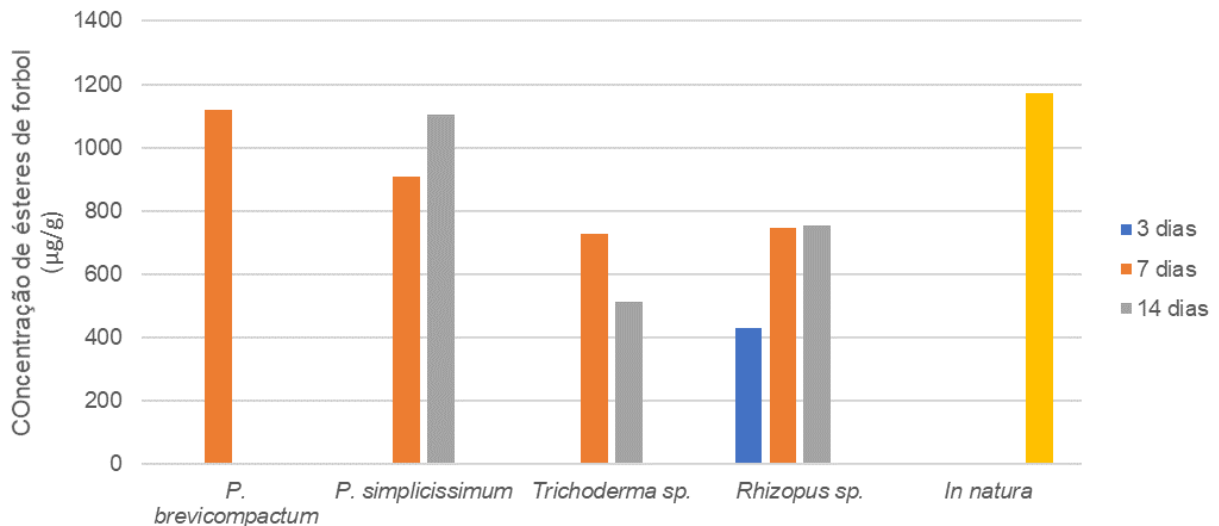


Figura 11 - Resultados da análise por CLAE de concentração ($\mu\text{g/g}$) de ésteres de forbol da torta de pinhão-manso *in natura* e da fermentação por 14 dias dos fungos: *P. simplicissimum* (dias 7 e 14), *Rhizopus sp.* (dias 3, 7 e 14), *P. brevicompactum* (dia 7) e *Trichoderma sp.* (dias 7 e 14). Os valores foram obtidos a partir da média de duplicatas.

Na fermentação por 7 dias (Figura 11) é possível observar que o *P. brevicompactum* só foi capaz de degradar 4,7% dos ésteres de forbol. Já o *P. simplicissimum* foi capaz de degradar os ésteres de forbol em quantidade mais expressiva, 22,4%, entretanto o *Rhizopus sp.* reduziu a concentração de ésteres de forbol em 70,8%, chegando a $437,63\mu\text{g/g}$ (Figura 11).

Usando os dados da fermentação por 7 dias foi possível constatar que não era provável um dos fungos conseguir degradar em menos de 14 dias, portanto foram feitas novas fermentações com 14 dias. Foram retirados pontos de 7 e 14 dias para poder acompanhar eventuais distorções em relação aos cultivos anteriores. *Trichoderma sp.* apresentou expressiva degradação em 14 dias (56,36%) o que o torna muito promissor. Já o *Rhizopus sp.*, no sétimo dia de fermentação, apresentou uma concentração de ésteres de forbol superior ao encontrado em 3 dias. Concentração que se manteve igual no 14º dia de fermentação, resultado em 35,7% de degradação (Figura 11).

Os fungos *Trichoderma sp.* e o *Rhizopus sp.* tiveram as maiores porcentagens de degradação, respectivamente 56,36% e 35,74%, portanto são os fungos com maior potencial. Já o *P. simplicissimum* em 7 dias degradou pouco, 22,4%, e em 14 dias a degradação também diminuiu, indicando que não será capaz de degradar completamente os ésteres de forbol.

5.3 Perfil de produção enzimática

O fungo *Rhizopus sp.* foi o fungo com maior degradação em 3 dias, (70,25%), conforme apresentado na Figura 11. Entretanto, pode-se observar uma diminuição dessa degradação em 7 e 14 dias. Visando explorar o que havia acontecido, foi realizada uma nova fermentação com *Rhizopus sp.* por 7 dias, com retirada de amostras a cada 24 horas. De todos os pontos, foram analisadas a umidade (Figura 12) e as atividades de lipase e peptidase dos extratos brutos obtidos. Visualmente, é possível observar crescimento a partir do ponto de 48 horas, sendo a matéria-prima totalmente colonizada a partir de 3 dias (Figura 13).

Para fazer o perfil de produção enzimática e a curva de crescimento foi feita uma nova fermentação, nesse cultivo também foram feitas análises de atividade de água e umidade.

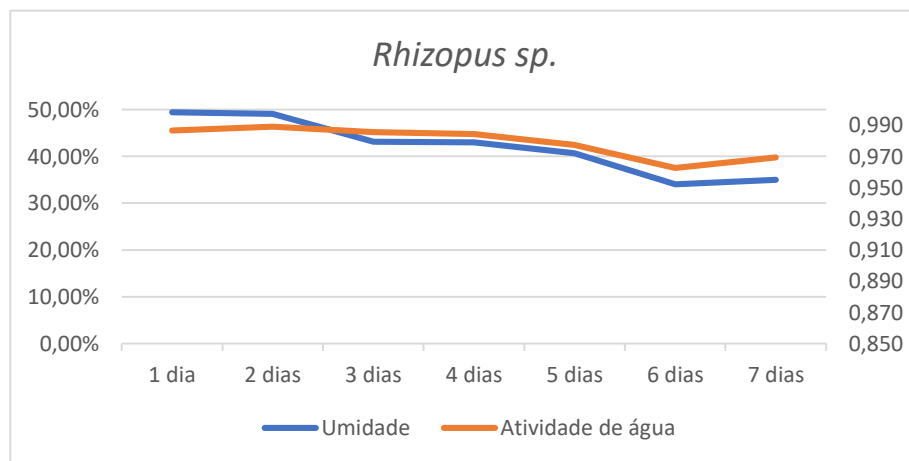


Figura 12 - Medidas de umidade e atividade de água da fermentação com *Rhizopus sp.* por 7 dias.



Figura 13 - Evolução da fermentação com *Rhizopus sp.* em torta de pinhão-manso. A: 1 dia de crescimento. B: 2 dias de crescimento. C: 3 dias de crescimento. D: 7 dias de crescimento.

Parâmetros como umidade e concentração de N-acetilglicosamina permitem compreender mais detalhes sobre como o fungo se desenvolveu na matéria-prima, entretanto a avaliação visual do crescimento do microrganismo (Figura 13) também tem valor ao permitir avaliar se o fungo cresceu por toda a matéria-prima ou se o crescimento foi só superficial.

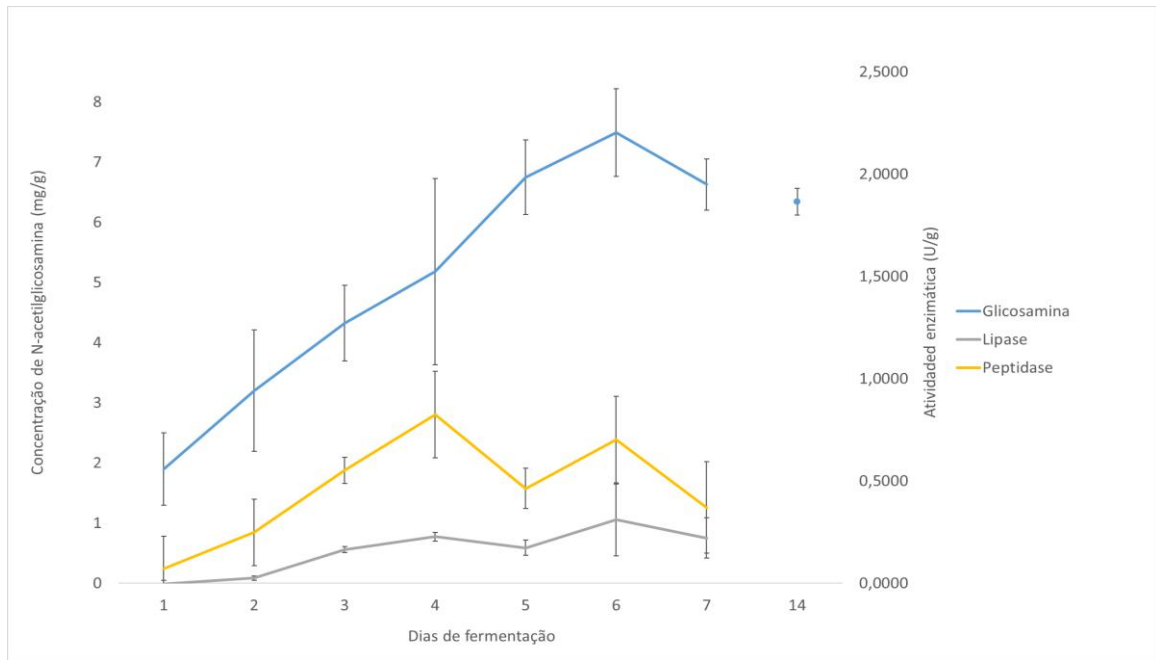


Figura 14 - Cinética enzimática e curva de crescimento de *Rhizopus sp.* em torta de pinhão-mansão.

Conforme é possível observar na curva de crescimento por N-acetilglicosamina (Figura 14) e visualmente analisando o fermentado, o fungo não colonizou completamente a matéria-prima até o terceiro dia. Isso se reflete nas atividades lipásica e peptidásica que, só começaram a aumentar a partir do 2º dia de fermentação. Conforme é possível observar na Figura 14, a atividade lipásica atingiu o pico no 6º dia de fermentação (0,31 U/g), a atividade peptidásica atingiu o pico no 4º dia (0,82 U/g) e a concentração de N-acetilglicosamina estabilizou a partir do 5º dia.

6 DISCUSSÃO

A umidade e atividade de água são dois dos principais fatores limitantes do crescimento microbiano ao longo da fermentação em estado sólido (Krishna, 2005), entretanto a umidade inicial máxima é limitada pela capacidade da matéria-prima de absorver água sem compactar ou ter água livre. Dois dos principais fatores que influenciam a capacidade da matéria-prima de absorver água são a higroscopicidade dos componentes da matéria-prima e a sua granulometria. Nesse trabalho foi utilizada a maior umidade possível sem ter água livre no meio. A umidade inicial das fermentações utilizadas (50%) foi mais baixa que a utilizada por outros autores, em outras matérias-primas. Silva *et al.*, (2011), por exemplo, utilizaram umidade de até 80% em torta de babaçu e Costa *et al.*, (2020) utilizaram 70% de umidade na fermentação com farelo de trigo. Ainda assim a atividade de água nos pontos iniciais das fermentações com os quatro fungos sempre esteve em valores favoráveis para o crescimento fúngico.

Godoy (2013), estabeleceu que o *P. simplicissimum* era um degradador de ésteres de forbol, entretanto a degradação até então descrita era insuficiente. Dessa forma, a fermentação foi repetida com um tempo ligeiramente maior que o utilizado por Godoy (2013), de 5 para 7 dias (Figura 11). Ao final dos 7 dias de fermentação, o teor de ésteres de forbol ainda era bem mais alto que desejado e os valores de umidade e atividade de água, respectivamente 39% e 0,971 Aw, permaneciam favoráveis. Além disso, Najjar *et al.*, (2014) e Veerabhadrapa, Shivakumar e Devappa, (2014) somente conseguiram degradar os ésteres de forbol em 30 dias. Desta forma, optou-se por estender o tempo de cultivo novamente, dessa vez para 14 dias. No cultivo mais longo, a umidade caiu para 30,5%. A falta de degradação entre os dias 7 e 14 indicou que se o fungo fosse capaz de degradar completamente os ésteres de forbol, seria necessário um cultivo muito mais longo. Porém, considerando que a queda de umidade já tinha sido acentuada, estender a fermentação não era uma opção viável. Um dos fatores que explica a menor degradação encontrada em relação a trabalhos anteriores do grupo, utilizando o mesmo fungo, foi a diferença entre a concentração de ésteres de forbol na torta *in natura* utilizada nesse trabalho (1441 µg/g) e a concentração de aproximadamente 2200 µg/g da torta *in natura* utilizada por Godoy (2013). Essa concentração mais baixa faz com que a porcentagem de degradação fique menor, ainda que os valores absolutos de concentração de ésteres de forbol na torta fermentada por Godoy (2013) tenham sido similares aos encontrados no presente trabalho.

Considerando a já conhecida capacidade do *P. simplicissimum* de degradar os ésteres de forbol, foi escolhido um segundo fungo do mesmo gênero, *P. brevicompactum*, que também já

tinha sido identificado como produtor de lipases (Silva *et al.*, 2011). Apesar dos altos valores de umidade e atividade de água, respectivamente 42% e 0,984 Aw, e do crescimento aparente, o fungo foi incapaz de degradar os ésteres de forbol. O fungo já tinha sido descrito como produtor de lipases, entretanto é possível que as condições da fermentação em estado sólido utilizada tenham sido desfavoráveis para a atividade das lipases produzidas. Além disso, Chen, (2013) descreve como as diferentes condições do meio ao longo da fermentação afetam o metabolismo do microrganismo. Portanto é possível que o microrganismo tenha priorizado a produção de hidrolases capazes de degradar as proteínas e carboidratos presentes na torta de pinhão-manso. Como a degradação não foi significativa nas condições estudadas (Figura 11), ele foi cortado de experimentos seguintes, não sendo feita uma fermentação por 14 dias.

O terceiro fungo escolhido foi o *Rhizopus sp.*, que em experimentos anteriores do grupo de pesquisa já tinha sido estabelecido como produtor de lipases. Na fermentação por sete dias, o fungo apresentou expressiva degradação dos ésteres de forbol (70,81%) no ponto de 3 dias, entretanto não foi suficiente para atingir a concentração considerada segura pela EFSA (*European food safety authority*) de 3µg/g. Os valores de umidade e atividade de água ainda não eram limitantes para o crescimento fúngico, respectivamente 46% e 0,989 Aw. Desta forma, optou-se por aumentar o tempo de fermentação, de forma a verificar se haveria um aumento da degradação dos ésteres de forbol. Na fermentação mais longa, a umidade caiu para 22% e a atividade de água caiu para 0,887. Os valores baixos não são limitantes para o crescimento fúngico, entretanto as alterações no metabolismo do fungo também se expressam no perfil de produção de enzimas. Considerando que não foi encontrada diminuição nos valores de ésteres de forbol entre os pontos de 7 e 14 dias, é possível presumir que nessas condições de umidade e atividade de água a produção de lipases não é suficiente para degradar os ésteres de forbol. Um outro fator a ser considerado é o pH da matéria-prima ao longo da fermentação (Tabela 3), pois enzimas tem sua atividade máxima em faixas de pH definidas (Punekar, 2018) e o pH da matéria-prima ao longo da fermentação não necessariamente corresponde ao pH ótimo da enzima. Dependendo da matéria-prima e do microrganismo utilizado, o pH ótimo pode variar bastante. Kar *et al.* (2012), por exemplo, caracterizou a xilanase produzida por *Trichoderma reesei* com o pH 5 sendo o pH ótimo enquanto Diaz *et al.* (2006) definiu o pH 7,5 como ótimo para a lipase produzida por *Rhizopus homothallicus*.

O quarto fungo escolhido foi o *Trichoderma sp.* Como esperado, a umidade encontrada com 7 dias de fermentação era absolutamente aceitável, 43% de umidade, entretanto com o andamento da fermentação a umidade caiu para 35%. Embora, em 7 dias, a degradação não

tenha sido muito grande, 37,95%, com o aumento do tempo da fermentação a degradação chegou a 56,36%.

Os fungos *Trichoderma sp.* e o *Rhizopus sp.* tiveram as maiores porcentagens de degradação, especialmente o *Rhizopus sp.*. De acordo com relatório da EFSA (2015), suínos podem ter até 50% da fonte de proteína da ração substituída por torta de pinhão manso com até 3 μ /g de ésteres de forbol. Considerando os valores finais obtidos nas fermentações com ambos os fungos seria possível substituir, 0,35% da parte proteica da ração por torta de pinhão-manso fermentada com *Rhizopus sp.* e 0,26% pelo fermentado com *Trichoderma sp.*. Portanto é necessário que a degradação seja maior para que a torta de pinhão-manso seja um substituinte viável da parte proteica das rações.

Como nenhum dos dois fungos conseguiu degradar os ésteres completamente, foi necessário compreender melhor como a degradação estava ocorrendo. No caso do *Rhizopus sp.* não houve evolução na degradação entre os dias 7 e 14. Para compreender melhor como funciona a degradação promovida pelo *Rhizopus sp.*, escolhido por ser o maior degradador, foi feita uma cinética enzimática e de crescimento por 7 dias. Hidayat et al., (2014) usaram lipases de arroz para caracterizar que lipases promovem a degradação de ésteres de forbol, portanto medir a atividade de lipases no fermentado era o meio mais apropriado de acompanhar a capacidade “degradadora” do fungo. O método utilizado para medir a atividade lipásica usa p-nitrofenil laurato como substrato. Existem outros substratos que podem ser usados ao invés do p-nitrofenil laurato e as lipases produzidas pelo *Rhizopus sp.* talvez sejam mais eficientes com esses substratos. Além disso, o protocolo utilizado faz uso de acetonitrila e dimetilsulfóxido, a maior parte das lipases é tolerante a esses solventes, mas não todas. O uso de outros métodos, como o método titulométrico utilizado por Freire *et al.* (1997), que por utilizarem emulsão em óleo em água, possivelmente resultaria em valores de atividade lipásica maiores. Entretanto, não foi possível realizar esses testes no presente trabalho. A produção de lipases pelo fungo pode ser limitada por diversos fatores, como o momento metabólico do fungo, a viabilidade metabólica do fungo, fatores externos e é claro a produção de peptidases que ao degradarem as lipases reduzem a sua concentração, conseqüentemente limitando a atividade lipásica. Portanto, é importante medir a atividade peptidásica para definir se foi um fator limitante ou não. Nesse trabalho a atividade peptidásica estava baixa demais para ser responsável pela baixa atividade lipásica, além disso, não foi possível observar queda na atividade lipásica nos momentos de pico de atividade peptidásica.

Fermentações em estado sólido apresentam como uma das problemáticas a dificuldade em acompanhar o crescimento microbiano, pois a biomassa microbiana está irreversivelmente

ligada a matriz. Aidoo, Hendry e Wood (1981) estabelecem que a *N*-acetilglicosamina pode ser usada como acompanhamento do crescimento microbiano em fermentação em estado sólido. A *N*-acetilglicosamina é o monômero que forma quitina da parede fúngica, portanto a sua concentração está intrinsicamente ligada ao crescimento do microrganismo. Conforme apresentado na Figura 14, foi possível observar crescimento até sexto dia de fermentação, o que é compatível com a queda na atividade enzimática encontrada nos resultados de atividade enzimática (Figura 14).

Aparentemente a concentração de *N*-acetilglicosamina se manteve estável entre os dias 7 e 14, entretanto é possível presumir que houve redução na biomassa metabolicamente ativa, com aumento na biomassa relativa a restos celulares e espessamento da parede das hifas (Krishna, 2005; Steudler e Bley., 2015), o que é compatível com a falta de degradação entre os dias 7 e 14. Como a produção de esporos não era objeto do trabalho, não foi feita a contagem de esporos do fermentado. A estabilidade da concentração de *N*-acetilglicosamina entre os dias 6 e 14, somada a baixa umidade e atividade de água no dia 14 e a queda na atividade lipásica no dia 7 sugerem que nessas condições o metabolismo do fungo não produz lipases de forma eficiente. A baixa umidade afeta a difusão de nutrientes da matéria-prima para a células (Chen, 2013), portanto é de se esperar que também afete a difusão das enzimas fúngicas na matéria-prima. Sendo assim, mesmo que o fungo esteja produzindo pequenas quantidade de lipase não haverá degradação. O que é corroborado pela falta de degradação encontrada entre os dias 7 e 14.

Inicialmente, o aparente aumento na concentração de ésteres de forbol entre os dias 3 e 7 foi associado a algum interferente produzido pelo fungo, entretanto é possível observar uma boa resolução dos picos referentes aos ésteres de forbol nas corridas cromatográficas. Considerando que é impossível o fungo ter produzido ésteres de forbol, a única explicação plausível é que o aumento da concentração de ésteres de forbol seja provocada pela maior facilidade de extrair ésteres de forbol da torta após os fungos terem prejudicado a integridade das fibras de celulose, seja fisicamente ou pela produção de xilanases. King et al. (2013) definiram que os ésteres de forbol tem sua origem no tegumento das sementes e ao longo do desenvolvimento das sementes difundem para o endosperma. O tegumento é um tecido vegetal compacto rico em celulose, portanto é de se esperar que o fungo tenha maior dificuldade em degradar os ésteres de forbol presentes no tegumento. Entretanto, com o andamento da fermentação esse tecido deve ter sido degradado, tornando a extração metanólica dos ésteres mais eficiente, resultando no aparente aumento na concentração de ésteres. Não foi feita a medição de atividade de xilanases, entretanto ambos os gêneros fúngicos tem diversas espécies capazes de produzir xilanases. Sousa *et al.*, (2018) mostram como o crescimento de *Aspergillus*

ibericus em diferentes resíduos leva a redução de teor de celulose e de hemicelulose, além de degradar a estrutura do resíduo. Dave *et al.*, (2012), associaram baixa umidade com aumento na produção de celulasas por *Thermoascus aurantiacus* em torta de pinhão-manso por fermentação em estado sólido. Cabe ressaltar que esse tipo de regulação varia de acordo com a espécie do fungo, portanto não é possível afirmar que o mesmo ocorreu com o *Rhizopus sp.* sem que outros experimentos sejam realizados.

7 CONCLUSÃO

Durante o projeto, foi possível constatar que, embora o *P. simplicissimum* seja degradador de ésteres de forbol, ele não é muito eficiente em concentrações mais baixas desse composto. Dentre os outros três fungos testados, os fungos mais promissores foram o *Rhizopus sp.* e *Trichoderma sp.*. Ambos tiveram uma degradação boa, respectivamente 35,74% e 56,36%, ainda que em uma fermentação mais longa que o planejado. Por conta do tempo de fermentação maior que o inicialmente esperado, não foi possível realizar a etapa de otimização dos fungos com potencial de degradação, *Rhizopus sp.* e *Trichoderma sp.*

Não foi possível determinar uma espécie fúngica capaz de degradar os ésteres de forbol até níveis seguros. Ainda assim, foi possível confirmar a FES como método de reduzir a toxicidade da torta de pinhão-manso e identificar dois gêneros com potencial para degradação de ésteres de forbol. Vale ressaltar, que os cultivos realizados neste trabalho foram conduzidos em condições não otimizadas. Espera-se, em trabalhos futuros, que o processo de degradação possa ser melhorado por meio de um estudo mais aprofundado da influência de variáveis do processo, e.g., temperatura de crescimento, suplementação do meio de cultivo, granulometria dos sólidos utilizados, umidade inicial, dentre outros.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aidoo, K.E., Hendry, R. e Wood, B.J.B.(1981). Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 12, 6–9.
- ANP (2020). Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis. Painel Dinâmico Produção de Biodiesel. Disponível em: <<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiOTlkODYyODctMGJjNS00MGlyLWJmMWItNGJINDg0ZTg5NjBlliwidCI6IjQ0OTlmNGZmLTI0YTYtNGI0Mi1iN2VmLTEyNGFmY2FkYzIxMyJ9&pageName=ReportSection8aa0cee5b2b8a941e5e0%22>>. Acesso em 27/02/2021
- Aregheore, E.M., Becker, K. e Makkar, H.P.S.(2003) Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences* 21, 50–56.
- Barros, C.R.M., Ferreira L.M.M., Nunes F.M., Bezerra, R.M.F., Dias, A.A., Guedes, C.V., Cone, J.W. ,Marques, G.S.M. e Rodrigues, M.A.M.(2011). The potential of white-rot fungi to degrade phorbol esters of *Jatropha curcas* L. seed cake. *Engineering in Life Sciences* 11, 107–110.
- Beutler, J.A., Alvarado, A.B., McCloud, T.G. e Cragg, G.M.(1989). Distribution of phorbol ester bioactivity in the euphorbiaceae. *Phytotherapy Research* 3, 188–192.
- Brand, D., Pandey, A., Roussos, S. e Soccol, C.R.(2000). Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology* 27,127–133.
- Cai, S., Wang, O., Wu, W., Zhu, S., Zhou, F., Ji, B., Gao, F., Zhang, D., Liu, J. e Cheng, Q.(2012). Comparative study of the effects of solid-state fermentation with three filamentous fungi on the total phenolics content (TPC), flavonoids, and antioxidant activities of subfractions from oats (*Avena sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 507–513.
- Chen, H.(2013). Aerobic Solid-State Fermentation. In: *Modern Solid State Fermentation*. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 140–197.
- Chen, L., Vadlani, P.V. e Madl, R.L.(2014). High-efficiency removal of phytic acid in soy meal using two-stage temperature-induced *Aspergillus oryzae* solid-state fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 113–118.
- Costa, R.S., Almeida, S.S., Cavalcanti, E.D.C., Freire, D.M.G., Moura-Nunes, N., Monteiro, M. e Perrone, D. (2021). Enzymes produced by solid state fermentation of agro-industrial by-products release ferulic acid in bioprocessed whole-wheat breads. *Food Research International* 140, 109843.
- Dave, B.R., Sudhir, A.P., Pansuriya, M., Raykundaliya, D.P. e Subramanian R.B.(2012). Utilization of *Jatropha* deoiled seed cake for production of cellulases under solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35, 1343–1353.
- Devappa, R.K., Roach, J.S., Makkar, H.P.S. e Becker K.(2013). Ocular and dermal toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 94, 172–178.
- Diaz, J. C.M., Rodríguez, J. A., Roussos, S., Cordova, J., Abousalham, A., Carriere, F. e Baratti, J.(2006). Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 1042–1050.
- dos Santos, A., Rodrigues, E.V., Laviola, B.G., Teodoro, L.P.R., Teodoro, P.E. e Bhering, L.L.(2021). Increasing selection gain and accuracy of harvest prediction models in *Jatropha* through genome-wide selection. *Scientific Reports* 11, 13583.
- Edrisi, S.A., Dubey, R.K., Tripathi, V., Bakshi, M., Srivastava, P., Jamil, S., Singh, H.B., Singh, N. e Abhilash, P. C.(2015). *Jatropha curcas* L.: A crucified plant waiting for resurgence. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 41, 855–862.
- EFSA (2015). European Food Safety Authority. Risks for human and animal health related to the presence of phorbol esters in *Jatropha* kernel meal. *EFSA Journal* 13.
- Freire, D.M, Teles, E.M.F., Bon, E.P.S. e Anna, G.L.S.(1997). Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 63–65, 409–421.
- Gangwar, M. e Shankar, J.(2020). Molecular Mechanisms of the Floral Biology of *Jatropha curcas*: Opportunities and Challenges as an Energy Crop. *Frontiers in Plant Science* 11, 609.

- Godoy, M.G. (2013) Valoração e biodestoxificação das tortas de mamona (*Ricinus communis*) e pinhão-manso (*Jatropha curcas*) por fermentação em estado sólido. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 153f..
- Godoy, M.G., Gutarra, M.L., Maciel, F.M., Felix, S.P., Bevilacqua, J.V., Machado, O.L., e Freire, D.M. (2009). Use of a low-cost methodology for biodegradation of castor bean waste and lipase production. *Enzyme and microbial technology* 44, 317-322.
- Goel, G., Makkar, H.P., Francis, G. e Becker, K. (2007). Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *International journal of toxicology* 26, 279-288.
- Gogoi, R., Niyogi, U.K. e Tyagi, A.K.(2014). Reduction of phorbol ester content in jatropha cake using high energy gamma radiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7, 305–309.
- Gomes, T.G., Hadi, S.I., Costa Alves, G.S., Mendonça, S., De Siqueira, F.G., e Miller, R. N. (2018). Current Strategies for the Detoxification of *Jatropha curcas* Seed Cake: A Review. *Journal of agricultural and food chemistry* 66, 2510-2522.
- Gondim-Tomaz, R.M.A., Erismann, N.M., Cia, E., Kondo, J., Fuzatto, M.G. e Carvalho, C.R.L.(2016). Teor de óleo e composição de ácidos graxos em sementes de diferentes genótipos de algodoeiro. *Brazilian Journal of Food Technology* 19, e2015071.
- Haas, W., Sterk, H. e Mittelbach, M. (2002). Novel 12-Deoxy-16-hydroxyphorbol Diesters Isolated from the Seed Oil of *Jatropha curcas*. *Journal of natural products* 65, 1434-1440.
- Herrera, J.M., Ayala, A.L.M., Makkar, H.P.S., Francis, G. e Becker, K.(2010). Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *European Journal of Scientific Research* 39, 396–407.
- Hidayat, C., Hastuti, P., Wardhani, A.K. e Nadia, L.S.(2014). Method of phorbol ester degradation in *Jatropha curcas* L. seed cake using rice bran lipase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117, 372–374.
- Iandolo, D., Amore, A., Birolo, L., Leo, G., Olivieri, G. e Faraco, V.(2011). Fungal solid state fermentation on agro-industrial wastes for acid wastewater decolorization in a continuous flow packed-bed bioreactor. *Bioresource Technology* 102, 7603–7607.
- Joshi, C., Mathur, P. e Khare, S.K.(2011). Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. *Bioresource Technology* 102, 4815–4819.
- Kar, S., Gauri, S.S., Das, A., Jana, A. Maity, C., Mandal, A., Das Mohapatra, P.K., Pati, B.R. e Mondal, K.C.(2013). Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 36, 57–68.
- Katole, S., Saha, S.K., Das, A., Sastry, V.R.B., Lade, M.H. e Prakash, B.(2013). Nutrient intake, digestibility, and blood metabolites of goats fed diets containing processed jatropha meal. *Tropical Animal Health and Production* 45, 1563–1569.
- King, A.J., Montes, L.R., Clarke, J.G., Affleck, J., Li, Y. Witsenboer, H., van der Vossen, E., van der Linde, P., Tripathi, Y., Tavares, E., Shukla, P., Rajasekaran, T., van Loo, E.N. e Graham, I.A.(2013). Linkage mapping in the oilseed crop *Jatropha curcas* L. reveals a locus controlling the biosynthesis of phorbol esters which cause seed toxicity. *Plant Biotechnology Journal* 11, 986–996.
- Krishna, C.(2005). Solid-state fermentation systems - An overview. *Critical Reviews in Biotechnology* 25, 1–30.
- Laviola, B.G., Alves, A.A., Rocha, R.B. e Drumond, M.A.(2012). The Importance of *Jatropha* for Brazil. In: CARELS, N.; SUJATHA, M.; BAHADUR, B. (Eds.). *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop*. (New York: Springer New York),pp. 71–94.
- Laviola, B.G., Rodrigues, E.V., Teodoro, P.E., Peixoto, L.A. e Bhering L.L.(2017). Biometric and biotechnology strategies in *Jatropha* genetic breeding for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 76, 894–904.
- Li, C., Ng, A., Xie, L., Mao, H., Qiu, C., Srinivasan, R., Yin, Z. e Hong, Y.(2016). Engineering low phorbol ester *Jatropha curcas* seed by intercepting casbene biosynthesis. *Plant Cell Reports* 35, 103–114.
- Li, C-Y., Devappa, R.K., Liu, J-X., Lv, J-M., Makkar, H.P.S. e Becker, K. (2016). Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. *Food and Chemical Toxicology* 48, 620–625.

- Liguori, R., Amore, A. e Faraco, V.(2013). Waste valorization by biotechnological conversion into added value products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 6129–6147.
- Lima, G.J.M.M., Canziani, N.J., Pitol. C., Sangoi, S., Klein, C.H. e Schmidt, A.(2004). Teores de Óleo e Proteína Bruta de Híbridos Comerciais de Milho Testados no Sindicato Rural De São Gabriel do Oeste , MS , na Safrinha de 2003. Comunicado técnico Embrapa 359.
- Maiti, S., Bapat, P.P. e Ghosh, P.K.(2014). Feasibility study of jatropha shell gasification for captive power generation in biodiesel production process from whole dry fruits. *Fuel* 121, 126–132.
- Makkar, H. P., Siddhuraju, P., e Becker, K. (2007). Phorbol Esters. In: WALKER, J. M. (Ed.). . *Plant Secondary Metabolites*. (Totowa: Humana Press), 393, pp. 101–105.
- Makkar, H.P. (2016). State-of-the-art on detoxification of *Jatropha curcas* products aimed for use as animal and fish feed: a review. *Animal Feed Science and Technology* 222, 87-99.
- Makkar, H.P.S. e Becker, K.(2009). *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111, 773–787.
- Makkar, H.P.S., Aderibigbe, A. e Becker K.(1998) Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. *Food Chemistry* 62, 207–215.
- Makkar, H.P.S., Maes, J., De Greyt, W. e Becker, K.(2009). Removal and Degradation of Phorbol Esters during Pre-treatment and Transesterification of *Jatropha curcas* Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86, 173–181.
- Martínez-Herrera, J., Siddhuraju, P., Francis, G., Dávila-Ortíz, G. e Becker, K.(2006). Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food Chemistry* 96, 80–89.
- Martins, D.A.B., Prado, H.F.A., Leite, R.S.R., Ferreira, H., Moretti, M.M.S., Silva, R. e Gomes, E.(2011). Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. In: KUMAR, S. (Ed.). . *Integrated Waste Management - Volume II*. [s.l.] InTech, 2011. v. 2p. 319–360.
- Najjar, A., Abdullah, N., Saad, W. Z., Ahmad, S., Oskoueian, E., Abas, F., & Gherbawy, Y. (2014). Detoxification of toxic phorbol esters from Malaysian *Jatropha curcas* Linn. kernel by *Trichoderma spp.* and endophytic fungi. *International journal of molecular sciences* 15, 2274-2288.
- Navarro-Pineda, F.S., Ponce-Marbán, D.V., Sacramento-Rivero, J.C. e Barahona-Pérez, L.F.(2017). An economic model for estimating the viability of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 92, 971–980.
- OECD/FAO (2019). Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico. OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028. (Paris: OECD).
- Openshaw, K. (2000). A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass and Bioenergy* 19, 1-15.
- Oskoueian, E., Abdullah, N. e Ahmad, S.(2012). Phorbol Esters Isolated from *Jatropha* Meal Induced Apoptosis-Mediated Inhibition in Proliferation of Chang and Vero Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 13816–13829.
- Pereira, I.R., D'Abadia P.L., Prado, A.D.L., Matos, F.S., Nabout, J.C., Gonçalves, P.J. e Almeida, L. M. (2018). Trends and gaps in the global scientific literature about *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae), a tropical plant of economic importance. *Semina: Ciências Agrárias* 39, 7-18.
- Punekar, N. S.(2018) Good Kinetic Practices. In: ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms. (Singapore: Springer Singapore) pp. 130–142.
- Ranucci, C. R., Alves, H.J., Silva, C., Monteiro, M.R., Santos, K.A., Bariccatti, R.A. e Antonio, E.(2015). Obtenção de Bioquerosene de Pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) e suas misturas ao querosene fóssil. *Revista Tecnológica*, 43–52.
- Roach, J.S., Devappa, R.K., Makkar, H.P.S. e Becker, K. (2012). Isolation, stability and bioactivity of *Jatropha curcas* phorbol esters. *Fitoterapia* 83, 586-592.
- Rodrigues, M.A. (2019). Destoxificação da torta de pinhão-mansô (*Jatropha curcas*): Seleção de fungos

potencialmente degradadores de ésteres de forbol. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 43 f.

Russin, T.A., Boye, J.I., Arcand, Y. e Rajamohamed, S.H.(2011). Alternative Techniques for Defatting Soy: A Practical Review. *Food and Bioprocess Technology* 4, 200–223.

Salgado, M.A.H., Tarelho, L.A.C., Rivadeneira, D., Ramírez, V. e Sinche, D.(2020). Energetic valorization of the residual biomass produced during *Jatropha curcas* oil extraction. *Renewable Energy* 146, 1640–1648.

Sánchez, M., Marchetti, J.M., Martínez, M. e Aracil, J.(2018). Technoeconomic analysis of *Jatropha curcas* integral valorization. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 12, 577–585.

Sánchez-Arreola, E., Martín-Torres, G., Lozada-Ramírez, J.D., Hernández, L.R., Bandala-González, E.R. e Bach, H. (2015). Biodiesel production and de-oiled seed cake nutritional values of a mexican edible *jatropha curcas*. *Renewable Energy* 76, 143–147.

Shafiee, S. e Topal, E.(2009). When will fossil fuel reserves be diminished? *Energy Policy* 37,181–189.

Silva, M.F., Freire, D.M.G., de Castro, A.M., Di Luccio, M., Mazutti, M.A., Oliveira, J.V., Treichel, H., e Oliveira, D.(2011). Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 34, 145–152.

Singh, D., Sharma, D., Soni, S.L., Inda, C.S., Sharma, S., Sharma P.K. e Jhalani, A.(2021). A comprehensive review of physicochemical properties, production process, performance and emissions characteristics of 2nd generation biodiesel feedstock: *Jatropha curcas*. *Fuel* 285, 119110.

Singh, D., Sharma, D., Soni, S.L., Sharma, S., Sharma P.K., Jhalani, A.(2020). A review on feedstocks, production processes, and yield for different generations of biodiesel. *Fuel* 262, 116553.

Singh, S.P. e Singh, D.(2010). Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 200–216.

Soto, I., Ellison, C., Kenis, M., Diaz, B., Muys, B. e Mathijs, E.(2018). Why do farmers abandon *jatropha* cultivation? The case of Chiapas, Mexico. *Energy for Sustainable Development* 42, 77–86.

Sousa, D., Venâncio, A., Belo, I. e Salgado, J.M.(2018). Mediterranean agro-industrial wastes as valuable substrates for lignocellulolytic enzymes and protein production by solid-state fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98, 5248–5256.

Stuedler, S. e Bley, T.(2015). Biomass estimation during macro-scale solid-state fermentation of basidiomycetes using established and novel approaches. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 38, 1313–1323.

Veerabhadrappe, M.B., Shivakumar, S.B. e Devappa, S.(2014). Solid-state fermentation of *Jatropha* seed cake for optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in *Jatropha* seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117, 208–214.

Wani, S.P., Garg, K.K. e Chander, G.(2016). Water needs and productivity of *Jatropha curcas* in India: myths and facts. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 10, 240–254.

Watanabe, T., Shino, A., Akashi, K. e Kikuchi, J.(2014). Chemical Profiling of *Jatropha* Tissues under Different Torrefaction Conditions: Application to Biomass Waste Recovery. *PLoS ONE* 9, e106893.

Xiao, J., Zhang, H., Niu, L., Wang, X. e Lu, X.(2011). Evaluation of Detoxification Methods on Toxic and Antinutritional Composition and Nutritional Quality of Proteins in *Jatropha curcas* Meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 4040–4044.

Zhang, X., Yang, Z., Liang, J., Tang, L. e Chen F.(2016). Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake in solid-state fermentation of newly isolated endophytic strain and nutrition assessment for its potential utilizations. *International Biodeterioration & Biodegradation* 109, 202–210.

Zhao, H., Guo, X., Zhu, K.(2017). Impact of solid state fermentation on nutritional, physical and flavor properties of wheat bran. *Food Chemistry* 217, 28–36.

Zhao, Y., Wang, Y., Wang, H., Wu, Y., Makkar, H.P.S. e Liu, J.(2018). Nutritional value of *detoxified Jatropha curcas* seed cake protein isolates using rats as an animal model. *Animal Nutrition* 4, 429–434.

Anexo I

Curva de calibração do cromatógrafo líquido de alta eficiência com forbol-12-miristato 13-acetato.

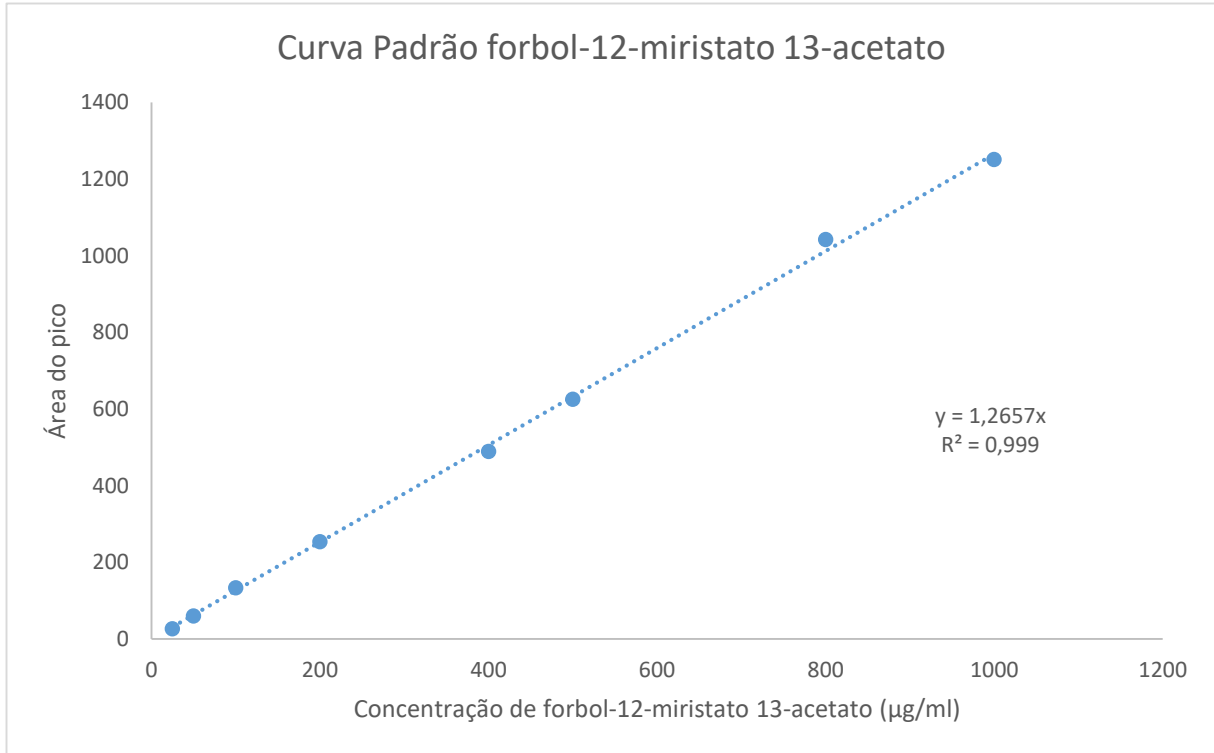


Figura 15 - Curva padrão de forbol-12-miristato 13-acetato.