

MATHEUS DE ANDRADE RODRIGUES

DESTOXIFICAÇÃO DA TORTA DE PINHÃO-MANSO
(*Jatropha curcas*): SELEÇÃO DE FUNGOS
POTENCIALMENTE DEGRADADORES DE ÉSTERES DE
FORBOL



Monografia apresentado 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
JANEIRO / 2019

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 co-orientação de Maysa Silva Barreto.

Rodrigues, Matheus

DESTOXIFICAÇÃO DA TORTA DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas*): SELEÇÃO DE FUNGOS POTENCIALMENTE DEGRADADORES DE ÉSTERES DE FORBOL / Matheus Rodrigues. -- Rio de Janeiro, 2018.

43 f.

Orientador: Mateus Godoy.

Coorientadora: Maysa Silva.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2018.

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

Aos meus pais e todos seus esforços investidos em mim

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais Lindalva e José pelo investimento na minha educação desde muito pequeno para que eu, hoje, estivesse aqui.

Às minhas queridas amigas que estiveram comigo durante essa jornada louca que foi a graduação. Amanda Ornellas, Caroline Montenegro, Julia Echardt, Natalia Martins, Victoria Sousa muito obrigado por estarem sempre do meu lado me apoiando e incentivando em todos os momentos, vocês foram o meu alicerce durante esses 4 anos.

Um agradecimento muito especial ao Dayvid Gonçalves por ser o meu confidente durante a execução desse trabalho, obrigado por todos os momentos de apoio e controle de surtos.

Esse trabalho não existiria sem a ajuda sempre pronta da Maysa Silva, minha co-orientadora e antes de tudo minha amiga, obrigado por todo o empenho e confiança em mim. Agradeço também ao Mateus Godoy, sem a sua brilhante orientação esse trabalho não teria vida.

À família LaBiM e os grandes amigos que fiz lá. Gabi, Ana Cristina, Thaissa, muito obrigado pelos momentos leves que tivemos juntos no meio dos cansativos experimentos, vocês trouxeram vigor e alegria para os meus dias de trabalho. Agradeço também à professora Denise por ceder o laboratório para a execução desse trabalho.

Aos amigos do LaBEM, LaBEP, LaBiM 7, LaMMP e LaGE por sempre me ajudarem em prontidão toda vez que precisava de um aparato para execução de algum experimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Iniciação Científica.

RESUMO

MATHEUS DE ANDRADE RODRIGUES

DESTOXIFICAÇÃO DA TORTA DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas*): SELEÇÃO DE FUNGOS POTENCIALMENTE DEGRADADORES DE ÉSTERES DE FORBOL

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.

ORIENTADOR: MATEUS GOMES DE GODOY

O pinhão-manso é uma oleaginosa muito estudada por conta da sua utilização na produção de biodiesel e pela presença de compostos tóxicos em suas sementes, como os ésteres de forbol. Devido a esses componentes tóxicos presentes principalmente no óleo, os resíduos (casca e outros restos da semente), vindos da extração industrial para produção de biodiesel, não podem ser aproveitados como, por exemplo, para produção de ração animal. Ésteres de forbol são compostos policíclicos nos quais dois grupos hidroxila nos átomos de carbono vizinhos são esterificados em ácidos graxos, apresentam altos graus de toxicidade e nos humanos têm papel promotor de tumor. Diante desses fatores, torna-se necessária a implementação de procedimentos de destoxificação desses resíduos de pinhão-manso para que possam ser melhor aproveitados. Um dos métodos mais promissores para o estudo da destoxificação é a fermentação em estado sólido (FES), pois ela permite a eliminação de compostos indesejáveis, tornando o resíduo agroindustrial adequado para outras utilizações. Neste estudo selecionamos fungos potencialmente degradadores de ésteres de forbol, que estão presentes na torta de pinhão-manso. Para execução da FES, foram utilizados fungos filamentosos da coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM-UFRJ) *Penicillium brevicompactum*, *Rhizopus sp.*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus awamori* e *Penicillium simplicissimum*. As fermentações foram realizadas em reatores do tipo becker, com 20g de torta de pinhão-manso, incubados a 30°C em estufas com injeção de ar úmido com 95% de saturação. A cada 24h, reatores foram retirados para determinação do teor de ésteres de forbol, além das medidas de parâmetros de processos (teor de umidade, atividade de água e pH). Foi observado que todos os microrganismos testados apresentaram boas condições de crescimento na torta tóxica de pinhão-manso. Os parâmetros do processo mostraram-se bem controlados com baixa perda de umidade após 72 horas (de 8 a 11% de perda em média) e altos valores de atividade de água (0,951 em média) no mesmo período. Durante o trabalho, foram testadas duas diferentes metodologias de extração de ésteres de forbol, sendo uma escolhida para os experimentos seguintes devido à uma maior eficiência na extração. As extrações foram realizadas nas amostras de pinhão-manso *in natura*, bem como das outras tortas fermentadas pelos fungos. Dentre eles, *P. simplicissimum* (controle), *Rhizopus sp.* e *T. harzianum* foram os fungos que atingiram os maiores níveis de redução do teor de ésteres de forbol em 120h: 42,5%, 30,6% e 14,8%, respectivamente. Assim, foi realizada uma cinética de degradação dos ésteres de forbol por *Rhizopus sp.* e *T. harzianum*, apresentando uma maior redução em 96h de fermentação, 46,3% e 50,3%, respectivamente. Os resultados obtidos no estudo são promissores e essenciais para a continuidade da obtenção de uma metodologia para destoxificação completa da torta de pinhão-manso e, assim, agregar valor a esse resíduo.

Palavras chave: Pinhão-manso, FES, destoxificação, ésteres de forbol.

ABSTRACT

MATHEUS DE ANDRADE RODRIGUES

DETOXIFICATION OF *Jatropha curcas* CAKE: SCREENING OF PHORBOL ESTERS-DEGRADING FUNGI

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.

ADVISOR: MATEUS GOMES DE GODOY

Jatropha is a well-studied oilseed because of its use in the production of biodiesel and the presence of toxic compounds in its seeds, such as phorbol esters. Due to these toxic compounds present mainly in *Jatropha curcas* oil, the residues (shell and other seed residues), from the industrial extraction for biodiesel production, cannot be used as, for example, animal feed. Phorbol esters are polycyclic compounds in which two hydroxyl groups on the neighboring carbon atoms are esterified into fatty acids, with a high degree of toxicity and in humans have tumor promoting role. Thus, it is necessary to implement detoxification procedures for *Jatropha* residues so that waste can be better utilized. The most common methods for the detoxification are the solid state fermentation (SSF), as it allows the elimination of undesirable compounds, making the agroindustrial residue suitable for other uses. In this study, we selected phorbol esters-degrading fungi. For the SSF, the filamentous fungi from the Microbial Biotechnology Laboratory (*Penicillium brevicompactum*, *Rhizopus* sp., *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus awamori* and *P. simplicissimum*) were used. The fermentations were carried out in becker type reactors, with 20g of *Jatropha* cake, at 30°C with 95% of water saturation. At 24h, bioreactors were taken to determine the phorbol ester content, as well as the process parameter measurements (pH, moisture and water activity). All the microorganisms tested showed good growth conditions in the toxic *Jatropha* cake. The process parameters were well controlled with low moisture loss after 72 hours (from 8 to 11% loss) and high values of water activity (0.951) over the same period. Two different phorbol ester extraction methodologies were tested, one being chosen for the following experiments due to a higher extraction efficiency. The extractions were carried out in the samples of *in natura* *Jatropha curcas* cake, as well as of the other fermented ones by the different fungi. Among them, *Penicillium simplicissimum*, *Rhizopus* sp. and *Trichoderma harzianum* were the fungi that achieved the highest levels of reduction of the phorbol ester content in 120h: 42.5%, 30.6% and 14.8%, respectively. Thus, degradation kinetics of the phorbol esters by *Rhizopus* sp. and *Trichoderma harzianum*, showing a greater reduction in fermentation 96 hours, 46.3% and 50.3%, respectively. The results obtained in this study are promising and essential for the continuity of obtaining a methodology for the complete detoxification of the *Jatropha* cake and, therefore, to add value to this undesirable residue.

Key-words: *Jatropha curcas*, SSF, detoxification, phorbol esters.

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: Matheus de Andrade Rodrigues
 DRE: 115047220

BANCA EXAMINADORA: Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida (Presidente)
 Profa. Elisa D'Avila Costa Cavalcanti
 Profa. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra
 Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)

Título da Monografia: "Destoxificação da torta de pinhão-manso (*Jatropha curcas*): Seleção de fungos potencialmente degradadores de ésteres de forbol"

Local: Sala de Reuniões do Departamento de Microbiologia Geral / Instituto de Microbiologia Paulo de Góes / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 29 de janeiro de 2019 às 10:00h

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 9,3 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 29 de01..... de 2019.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>9,5</u>	<u>Ana Maria M. de Almeida</u> Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida
<u>9,0</u>	<u>Elisa Cavalcanti</u> Profa. Elisa D'Avila Costa Cavalcanti
<u>9,3</u>	<u>Melissa Limoeiro Estrada Gutarra</u> Profa. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra
_____	_____ Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius
Aluno:	<u>Matheus A. Rodrigues</u> Matheus de Andrade Rodrigues
Orientador:	<u>Mateus Gomes de Godoy</u> Prof. Mateus Gomes de Godoy
Coorientador	<u>Mayra Silva Barreto</u> Mayra Silva Barreto
Coordenador de TCC	<u>Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho</u> Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

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	3
1.1.2 Toxicidade da torta de pinhão-manso	4
1.2 Ésteres de Forbol.....	5
1.2.1 Estrutura dos ésteres de forbol	6
1.2.2 Atividade Cancerígena dos Ésteres de Forbol	7
1.3 Destoxificação de coprodutos industriais	8
1.4 Fermentação em Estado Sólido	10
2 JUSTIFICATIVA	12
3 OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo Geral.....	13
3.2 Objetivos Específicos.....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 Microrganismos	14
4.2 Preparo do inóculo para fermentação em estado sólido.....	14
4.3 Fermentação em estado sólido (FES)	14
4.4 Medida de umidade	14
4.5 Atividade de água (Aw)	15
4.6 Medida de pH	15
4.7 Análise da presença de ésteres de forbol na torta de pinhão-manso	15
4.7.1 Metodologia I.....	15
4.7.2 Metodologia II	16
4.7.3 Quantificação dos ésteres de forbol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	16
5 RESULTADOS	18
5.1 Fermentação em estado sólido: acompanhamento de parâmetros de processo.....	18
5.1.1 <i>Penicillium simplicissimum</i>	18
5.1.2 <i>Rhizopus sp.</i>	19
5.1.3 <i>Trichoderma harzianum</i>	19
5.1.4 <i>Penicillium brevicompactum</i>	20
5.1.5 <i>Aspergillus awamori</i>	21
5.2 Análise do teor de ésteres de forbol.....	21
5.3 Perfil de degradação dos ésteres de forbol.....	23

6 DISCUSSÃO.....	27
7 CONCLUSÃO.....	30
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pinhão-manso (*Jatropha curcas*)

O pinhão-manso (*Jatropha curcas*) é uma planta pertencente a família Euphorbiaceae, a mesma família da mamona e da mandioca, e tem sua distribuição oriunda do México, América Central, Brasil, Bolívia, Peru, Argentina e Paraguai. O pinhão-manso é uma oleaginosa muito estudada por conta da sua utilização na produção de biodiesel e pela presença de toxinas e/ou compostos antinutricionais em suas sementes, tais como ésteres de forbol, curcina, inibidores de tripsina, lectinas e fitatos (Achten et al., 2008).

Jatropha curcas é um arbusto grande, de crescimento rápido, cuja altura normal é dois a três metros, mas pode alcançar até cinco metros. O diâmetro do tronco é de aproximadamente 20 cm, possui raízes curtas e pouco ramificadas, caule liso, de lenho mole e medula desenvolvida, mas pouco resistente. Seu floema apresenta longos canais que se estendem até as raízes, nos quais circula o látex (Brasil, 1985). O pinhão-manso contém uma grande variedade de fitoquímicos biologicamente ativos, dentre eles podem ser encontrados proteínas, peptídeos e diterpenos, exibindo um espectro de atividades biológicas (Devappa et al., 2010). Quando comparadas suas sementes com sementes de outras plantas, pode-se dizer que as proteínas presentes no pinhão-manso possuem níveis consideravelmente elevados de lisina e outros nutrientes.

Nas sementes do pinhão-manso são encontrados 7,2% de água, 37,5% de óleo e 55,3% de açúcar, amido, albuminóides e materiais minerais. Durante o processo de extração mecânica do óleo das sementes de pinhão-manso é gerado um resíduo sólido denominado torta de pinhão-manso. Cerca de 70 % dos ésteres de forbol, principal componente tóxico do pinhão-manso, ficam retidos com o óleo e o restante ainda está presente na torta prensada, tornando assim a torta e o óleo não comestíveis (Makkar et al., 2008).

O interesse comercial no cultivo de pinhão-manso no Brasil teve seu início de forma ampla a partir do ano de 2006, o que coincidiu com o início do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (Durães et al., 2012). Durante esse período, iniciou-se uma grande busca por fontes alternativas de matérias-primas e o pinhão-manso foi apontado como uma cultura que poderia potencialmente atender a produção de óleo em diversas regiões do Brasil. Na época, haviam poucos estudos com a espécie, portanto, para a análise do potencial de rendimento do pinhão-manso foram cultivadas (de forma não otimizada) e isoladas plantas

até a sua fase adulta e observaram que essas plantas produziam mais de 20 kg de grãos por arbusto. A produtividade do pinhão-manso varia muito em função da região de plantio, método de cultivo e tratos culturais, idade da cultura, bem como da quantidade de chuva e da fertilidade do solo. Em espaçamento 3x3 metros, o rendimento anual de óleo pode atingir de 3,0 a 4,0 t/ha (Dias et al., 2007). Em 2015 a produção de pinhão-manso no Brasil (em toneladas) foi de 8.393, em 2016 foi de 7.746 e em 2017 foi de 9.293 (Sidra IBGE, acesso em 10/01/2019).

A torta de pinhão-manso apresenta grande valor nutritivo com sua proteína bruta variando de 25% a 63%, extrato etéreo de 4% a 14,2%, fibra bruta de 36,7% a 45% (Abdalla et al., 2008; Fernandes, 2010; Souza et al., 2009). A composição química da torta de pinhão-manso varia conforme o genótipo da planta e também com a forma do seu processamento, no geral apresenta um bom perfil de aminoácidos. O pinhão manso apresenta, em média, a seguinte composição em aminoácidos: arginina (12,90%), cistina (1,58%), fenilalanina (4,89%), histidina (3,08%), isoleucina (4,85%), leucina (7,50%), lisina (3,40%), metionina (1,76%), tirosina (3,78%), treonina (3,59%), triptofano (1,31%) e valina (5,30%) (Nunes, 2007).

A torta do pinhão-manso é rica em nitrogênio, sendo utilizada como adubo orgânico. Outra aplicação poderia ser na alimentação animal, porém, devido à sua toxidez (não só a torta, mas a planta toda apresenta diversos compostos tóxicos, tanto para os animais como para o homem) ela se torna inviável. Entretanto, estudos acerca da destoxificação estão sendo realizados em diversos países, como é o caso do Brasil (Ávila et al. 2006).



Figura 1: Sementes da planta Pinhão-Manso (*Jatropha curcas*), família Euphorbiaceae.

Fonte: <http://www.fapema.br/index.php/projeto-busca-bioatividade-de-proteinas-obtidas-do-pinhao-manso/>

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

Os usos do pinhão-manso são vastos, como no controle e/ou prevenção da erosão e na recuperação de solos, apresenta propriedades medicinais e pesticidas (Openshaw, 2000). Há muitos anos, o óleo de pinhão-manso foi utilizado para produção de sabão caseiro, verniz e para iluminação de lamparinas e na iluminação pública de cidades pelo fato do seu óleo ser inodoro e sua queima não produzir fumaça (Saturnino et al., 2005; Durães et al., 2012).

A bioenergia gerada a partir de plantas vem desempenhando um papel fundamental no futuro fornecimento de energia e, recentemente, o pinhão-manso foi considerado como uma das culturas para produção de biocombustível mais sustentáveis do mundo. O grande protagonista na produção do biodiesel utilizando como matéria prima as sementes de pinhão-manso é o óleo que está presente nessas. O óleo de pinhão-manso pode ser convertido em biocombustível líquido, ao mesmo tempo que, os produtos dos seus resíduos orgânicos podem ser adicionados para produzir o biogás (Achten et al., 2008).

O biodiesel é um combustível de queima limpa e atualmente está sendo produzido através de óleos vegetais, gorduras animais e graxa. Apresenta estrutura química dos alquil ésteres de ácidos graxos e é produzido pela transesterificação, que consiste na transformação de triglicerídeos em alquil éster de ácido graxo, de óleos com álcoois de cadeia curta ou pela esterificação de ácidos graxos (Vasudevan; Briggs, 2008). O rendimento elevado das suas sementes, se comparado às oleaginosas tradicionais, além das características físico-químicas do óleo que são favoráveis à produção de biodiesel, tais como baixa acidez, boa estabilidade à oxidação e excelentes propriedades de fluidez a baixa temperatura (Durães et al., 2012) e o contexto atual de grande interesse por fontes renováveis de produção do biodiesel a partir de óleos vegetais para a redução da emissão de gases do efeito estufa levam à produção de biodiesel por *Jatropha curcas* como um negócio crescente em diversos países (Achten et al., 2008).

A utilização do pinhão-manso para suas vastas funcionalidades, principalmente a produção de biodiesel, gera produção de resíduos que necessitam de um destino, seja de descarte seguro ou de reutilização (Makkar, 2008). No Brasil, assim em como outros países, os resíduos agrícolas são produzidos em grandes quantidades e os seus destinos geralmente giram em torno da produção de alimentos para animais (rações) ou simplesmente como adubo ou são direcionados para aterros sanitários. Entretanto, esses resíduos agrícolas são promissoras matérias-primas para uso em processos biotecnológicos por conta do seu baixo

custo, acessibilidade facilitada e componentes nutritivos que, entre outros compostos, contém principalmente carbono, nitrogênio e minerais (Salihu et al., 2012).

1.1.2 Toxicidade da torta de pinhão-mansão

Uma série de estudos com diferentes tipos animais, ruminantes (bovinos e caprinos) ou não (camundongos, ratos, frangos, peixe, humanos), evidenciaram que as sementes de *J. curcas* são tóxicas. Nos estudos que envolviam animais ruminantes foram testadas doses únicas (2,5g sementes/Kg de peso do animal/dia) e doses fragmentadas (0,025g sementes/Kg de peso do animal/dia por 14 dias) e, independentemente do tipo de dose utilizada, todos os animais morreram. Os primeiros sinais observados nos animais foram diarreia, dispneia, desidratação e perda de condição geral. Em humanos, a ingestão ou contato com as sementes de pinhão-mansão levaram à intoxicação aguda (Adam, 1974; Ahmed e Adam, 1979; Liberalino et al., 1988, El Badawi et al., 1992, Gadir et al., 2003).

As intoxicações por ingestão de sementes de pinhão-mansão por humanos não leva a óbito e os sintomas geralmente observados são relacionados com a irritação gastrointestinal devido à inflamação aguda provocada. A sintomatologia tem início após a ingestão de, no mínimo, 2 ou 3 sementes, levando à ardência na garganta entre 30 a 60 minutos após a ingestão, vômitos acentuados e dor abdominal intensa, as vezes seguido de diarreia sanguinolenta, levando a um quadro brusco de desidratação. Em casos menos frequentes de intoxicação severa ocorrem implicações no sistema nervoso central e lesão renal. O método profilático recomendado para intoxicação por sementes de pinhão-mansão é a lavagem estomacal caso o tratamento ocorra logo após a ingestão. O óleo presente nas sementes de *J. curcas* tem efeito purgativo violento por conta da presença em grandes porcentagens de ésteres de forbol e também de outras moléculas tóxicas como a curcina. Do mesmo modo são encontrados na torta de pinhão-mansão fatores antinutricionais, como os antitripsínicos e o fitato. Apesar da torta de pinhão-mansão apresentar diferentes fatores tóxicos e antinutricionais, o principal componente tóxico presente no pinhão-mansão é o éster de forbol que pode agir de duas formas, uma com resposta inflamatória intensa e outra crônica por indução de formação de tumor (Mendonça e Laviola, 2009).

1.2 Ésteres de Forbol

Os ésteres de forbol, em sua definição, são “compostos policíclicos nos quais dois grupos hidroxila nos átomos de carbono vizinhos são esterificados em ácidos graxos” (Beutler et al. 1989). *Sapium indicum*, *S. japonicum*, *Euphorbia frankiana*, *E. cocrulescência*, *E. ticulli*, *Croton spareiflorus*, *C. tigilium*, *C. ciliatoglandulifer*, *Jatropha curcas*, *Excoecaria agallocha* e *Homalanthus nutans* são exemplos de plantas que são relatadas cientificamente como portadoras dos ésteres de forbol tóxicos (Beutler et al. 1989). Dentre elas, *J. curcas* se destaca por possuir outros tipos de compostos tóxicos, tais como curcina e ácido cianídrico (Makkar et al. 2007). A exposição a essas plantas ocorre na sua maioria de forma indireta, através do contato com produtos de origem animal contaminados com ésteres de forbol, como o mel de abelhas (Sosath; Ott; Hecker, 1988), peixe de pesca, carne e leite produzidos a partir de animais que se alimentam de dietas contaminadas com esses componentes tóxicos (Zayed et al. 1998).

Apesar da sua característica toxigenica, os ésteres de forbol são utilizados em estudos de medicina. O 12-0-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), também chamado forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), é um éster de forbol usado em modelos de carcinogênese como um indutor de diferenciação e/ou apoptose em múltiplas linhagens celulares e células primárias. Foi relatado que TPA causa um aumento nas células imunológicas sanguíneas, inclusive neutrófilos circulantes, em pacientes cuja função da medula óssea de geração de novas células foi deprimida pela quimioterapia (Han; et al., 1998), além disso também é sabido que os ésteres de forbol inibem os efeitos citopáticos do HIV sobre células MT-4. Entretanto, devido a vários fatores, incluindo a sua toxicidade potencial, não foi mostrado que TPA é uma ferramenta eficaz para tratamento, manejo ou prevenção de HIV (Mekkawy et al., 2000).

Em *J. curcas*, já foram relatados seis tipos de ésteres de forbol (Haas et al., 2002). A mistura purificada dos ésteres de forbol é tóxica para muitas espécies animais, incluindo ratos, camundongos, peixes, galinhas, cabras e vacas (Li et al., 2010; Adam; Magzoub, 1975; Ahmed; Adam, 1979). Além disso, os ésteres de forbol são encontrados de forma estável durante as fases iniciais de processamento do óleo no processo de produção de biodiesel, podendo ser um alerta para possível exposição ocupacional dos trabalhadores envolvidos (Makkar et al., 2009).

1.2.1 Estrutura dos ésteres de forbol

A estrutura dos ésteres de forbol é formada por um esqueleto de carbono do diterpeno tetracíclico conhecido como tigliane, que é uma porção de álcool fundamental nos ésteres de forbol. Tigliane possui quatro anéis determinados como A, B, C e D (Figura 2). A estrutura básica possui hidroxilas em diferentes posições e ligações éster às partes ácidas, o que resulta na formação de grandes variedades de compostos éster de forbol (Makkar et al. 2007). Por exemplo, o forbol, diterpeno parente dos ésteres de forbol, contém cinco grupos hidroxila com reatividade diferente para a acilação (Hecker; Schmidt, 1974 apud Makkar et al. 2007). O anel A está à esquerda e trans-ligado ao anel B. O anel C tem 6 membros e está ligado ao anel D do ciclopentano.

Os ésteres de forbol possuem duas categorias, α e β , que se diferem no grupo OH no anel C. A presença do grupo OH torna o forbol um tipo ativo (β) ou inativo (α), que resulta em arranjo espacial de anel D e impede a ativação da proteína quinase C (PKC) e outros receptores de éster de forbol que possuem semelhanças estruturais. Os ésteres que são α -forbol inativos possuem propriedades lipofílicas e físico-químicas semelhantes aos β -forbols ativos, porém não são capazes de ativar a PKC devido a mudanças estruturais (Silinsky; Searl, 2003). As moléculas de forbol amplamente ativas, TPA (4β -12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) e PDBu (4β -forbol-12,13-dibutirato) diferem-se apenas pelas suas substituições nas posições 12 e 13 do anel C (Makkar, 2007).

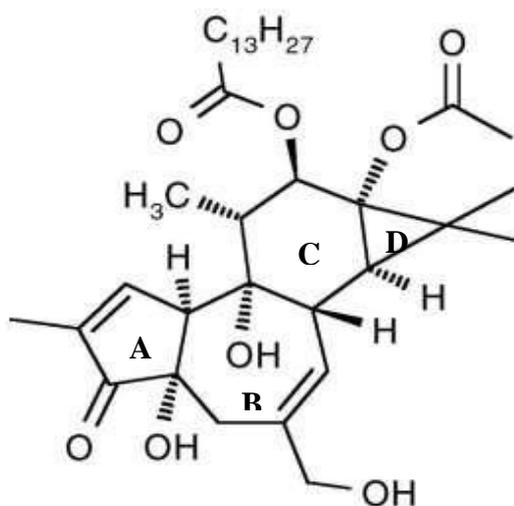


Figura 2: Molécula de um éster de forbol (forbol 12-miristato 13-acetato)

1.2.2 Atividade Cancerígena dos Ésteres de Forbol

A atividade promotora de tumor dos ésteres de forbol possui mecanismos de ação bem distintos dos responsáveis pela atividade inflamatória do organismo. A ação promotora de tumor é relacionada à habilidade que os ésteres de forbol apresentam de substituir o diacilglicerol na ativação da PKC e também pela capacidade de estimular a síntese de proteínas, de RNA e de DNA, o que revela um comportamento igual ao de agentes mitogênicos e a estimulação do crescimento celular, mesmo que em doses muito baixas. Numa visão mais objetiva, os ésteres de forbol alteram a fosforilação de proteínas celulares específicas e aumentam a transcrição de certos genes celulares que participam da divisão celular. O mecanismo relacionado com a produção do tumor é o de interação com a PKC, que regula ainda mais as vias de sinalização, levando à transcrição do gene, levando à indução da proliferação celular. O efeito promotor do tumor de ésteres de forbol já foi estudado em várias linhagens celulares humanas e animais. A mudança na atividade da PKC foi observada devido a seu papel em ativar uma diversidade de vias metabólicas, sua localização celular, sua fosforilação, sua interação com outras moléculas sinalizadoras e sua acessibilidade a diferentes substratos. (Brodie; Blumberg 2003; Gonzalez-Guerrico; Kazanitez 2005; Goel et al., 2007).

A demonstração de que a PKC é o principal receptor para os ésteres de forbol ajudou a racionalizar a ampla gama de atividades biológicas que haviam sido observadas anteriormente para os ésteres de forbol. Além disso, como os ésteres de forbol se comportam muito melhor como agentes farmacológicos do que os diglicéridos, foi sugerido que os ésteres de forbol poderiam ser muito úteis para identificar os processos fisiológicos em que a PKC estava envolvida. A compreensão detalhada da interação de ésteres de forbol com o domínio regulatório da PKC pode permitir o desenvolvimento de agentes que interferem na atividade da PKC, funcionando assim como antipromotores ou como inibidores de efetores fisiológicos que atuam nessa via. Essa interação entre ésteres de forbol e a PKC é utilizada até mesmo em estudos que visam a utilização e eliminação do HIV de pacientes infectados (Chowdhury, Iqbal Hossain, et al., 1990).

1.3 Destoxificação de coprodutos industriais

Atualmente existem vários tratamentos químicos e físicos que são capazes de degradar ésteres de forbol em *J. curcas*, como ozônio, luz solar, radiação γ , surfactantes e extração por metanol (Tabela 1). Entretanto a maioria desses tratamentos é agressiva, inativa ou diminui as qualidades nutricionais da *J. curcas*, resultando na degradação de aminoácidos funcionais e proteicos. Tratamentos com solventes orgânicos e NaOH, por exemplo, podem modificar o odor dos resíduos, levando à diminuição do consumo pelos animais. O metanol também é um solvente tóxico e pode envenenar a torta desintoxicada final, tornando-a imprópria como fonte de proteica. Como consequência, o uso do pinhão-manso pode ser restringido apenas a fertilizantes e à suplementação do solo, cujas práticas não são recomendadas (Katole et al., 2013).

A biodestoxificação mostra potencial em termos de eficiência e especificidade, este processo ainda apresenta limitações em termos de tempo de cultivo e aumento de escala. Esse tratamento com microrganismos, no entanto, não só pode permitir a degradação dos ésteres de forbol, mas também pode potencialmente melhorar o valor nutricional do resíduo, aumentando o teor proteico disponível e contribuindo com bioativos como a β -glucana e o ergosterol do micélio fúngico. Abordagens transcriptômicas e proteômicas oferecem considerável potencial para aumentar nossa compreensão da degradação enzimática de ésteres de forbol por microrganismos (Aregheore et al., 2003).

A bioprospecção de microrganismos capazes de degradar substâncias tóxicas é importante na biorremediação, uma vez que esses compostos são os principais poluentes nas indústrias alimentícias, de celulose e terpenos. A biodestoxificação oferece uma série de vantagens a outros métodos, entre eles maior eficiência, menor custo, e produção de produtos adicionais de valor agregado, como enzimas de interesse biotecnológico, incluindo lacases, fitases, xilanases e proteases (Zhang et al., 2014)

Alguns estudos sobre destoxificação têm utilizado o processo de fermentação em estado sólido (FES) como ferramenta. Brand et al., 2000 conseguiram, através da FES, melhorar as qualidades nutricionais de casca e polpa de café, eliminando cafeína e taninos presentes. Desta forma, o processo de destoxificação por FES permite, muitas vezes, a eliminação de compostos indesejáveis, tornando o resíduo agroindustrial adequado para outras utilizações, como por exemplo ração animal, ou mesmo para um descarte seguro e sustentável, além de ser possível também agregar valor ao rejeito através da produção de

enzimas, ácidos orgânicos ou aromas a custo reduzido (Freire et al., 2008; Holker; Lenz, 2005; Pandey; Soccol, 2000).

Em trabalhos anteriores, o grupo empregou FES com o fungo *Penicillium simplicissimum* para reduzir o teor de ricina a níveis não detectáveis por SDS-PAGE e por cromatografia em gel Sephadex G-50, reduzir 16% o potencial alergênico do rejeito de mamona e, aliado a este processo, agregar valor através da produção de enzimas de grande interesse biotecnológico, as lipases (Godoy et al., 2009). Foi desenvolvida, pelo nosso grupo, uma metodologia (patente concedida em 2017 INPI: PI 0703290-0), através da Fermentação em Estado Sólido, para a destoxificação de resíduos agroindustriais. O processo foi capaz de destoxificar completamente resíduos de mamona, além de agregar valor ao mesmo através da produção de lipases (Godoy et al, 2009; Godoy et al, 2011; Godoy et al, 2012). Na torta de pinhão-manso, em especial, já alcançamos redução de 86% do teor dos ésteres de forbol através desse processo, utilizando o fungo filamentosos *P. simplicissimum* (Godoy, 2013).

Tabela 1 - Comparação de métodos físicos, químicos e biológicos para a degradação de ésteres de forbol (Adaptado de Gomes, 2018).

Tratamento	Método de Degradação	Nível inicial de ésteres de forbol	Nível final de ésteres de forbol	Período	Redução	Referências
Físico	Ozônio	12ppm	Níveis não detectáveis	10min	100%	Kuvshinov et al., 2014
	Radiação γ	0,29 mg/g	0,012 mg/g	Não especificado	96%	Gogoi; Niyogi; Tyagi, 2014
	Luz solar	2,09g/L	1,04g/L	30 dias	49%	Phasukarratchai; Damrongsiri; Tongcumpou, 2017
Químico	Extração com Metanol	3,6 mg/g	0,10 mg/g	8h	97,30%	Guedes et al., 2014
	Extração com etanol	3,07mg/g	Níveis não detectáveis	60min	100%	Nokkaew; Punsuvon, 2013
	Sufactantes	1,45mg/g	0,27mg/g	15min	80%	Elangovan et al., 2013
Biológico	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>	0,13mg/g	0,03mg/g e 0,11mg/g	7 dias	76 e 15%	Belewu; Sam, 2010
	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Rhizopus nigricans</i>	0,13mg/g	0,12mg/g e 0,10mg/g	7 dias	7 e 23%	
	<i>Trichoderma longibrachitum</i>	0,13mg/g	0,11mg/g	7 dias	15%	
	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Paecilomyces sinensis</i>	2,78mg/g	0,05mg/g e 0,03mg/g	30 dias	99,7 e 98,9%	Najjar et al., 2014

1.4 Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido (FES) é uma técnica que consiste na utilização de um meio de cultivo sólido como fonte de nutrientes ou suporte para crescimento de microrganismos. A FES é um método alternativo para cultura que conquistou espaço na biotecnologia e vem se aprimorando durante os últimos 20 anos. Há muitas vantagens na utilização da fermentação em estado sólido (simplicidade do processo, custo geralmente inferior se comparado com as outras técnicas de fermentação, as condições de crescimento do microrganismo são próximas das encontradas naturalmente), o que levou ao grande interesse na pesquisa de novas possibilidades atreladas à FES. A pesquisa em FES é, em grande parte, dedicada à busca de substratos e otimização da produção de diferentes produtos e também na pesquisa de potenciais novas aplicações. A engenharia é a área onde a FES é mais comumente utilizada, além da sua utilização em estudos direcionados para a fisiologia dos fungos principalmente do ponto de vista do efeito dos principais parâmetros de fermentação (teor de umidade, aeração, etc.) no crescimento (Barrios-Gonzalez, 2012).

A técnica de fermentação em estado sólido baseia-se nas interações heterogêneas da biomassa microbiana com substrato sólido umedecido. Nela os microrganismos podem crescer através dos fragmentos do substrato, dentro da matriz do substrato e/ou em sua superfície. Durante o processo de fermentação, a biomassa microbiana que pode estar no interior da matriz do substrato, e/ou na sua superfície, consome substratos e secreta metabólitos e enzimas. Gradientes nas concentrações de substratos e produtos podem causar diferenças locais na atividade metabólica. Os fungos filamentosos são frequentemente usados no processo de FES devido ao seu alto potencial para excreção de enzimas hidrolíticas, sua tolerância consideravelmente alta à baixa atividade de água e pela sua morfologia característica (Rahardjo et al., 2006).

O fator determinante para a utilização de fermentação em estado sólido é o fato de ser uma opção bastante vantajosa para a obtenção de enzimas a custo reduzido (Castilho et al., 2000), além de ser comprovadamente um processo eficaz para a destoxificação simultânea de resíduos agroindustriais. Por conta desses fatores, a FES destaca-se como uma alternativa tecnológica e integralmente sustentável para a união entre a destoxificação biológica dos rejeitos e a valoração de resíduos sólidos tóxicos através do alcance de produtos de interesse biotecnológico (Amorim, 2017; Godoy, 2013; Godoy et al., 2009; Brand et al., 2000).

No entanto, existem desvantagens na utilização da FES, tais como a cinética da fermentação é consideravelmente longa e demorada quando comparada com outros métodos, por exemplo a autoclavagem, e a segurança do produto depende do metabolismo secundário microbiano. Como numerosas espécies de fungos podem secretar micotoxinas, microrganismos candidatos devem garantir a desintoxicação da torta sem a secreção simultânea de metabólitos secundários tóxicos. O cultivo de tais fungos em abundantes resíduos agroindustriais representa, assim, um arranjo potencialmente lucrativo e economicamente viável (Zain, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Os resíduos de pinhão-mansão são gerados em larga escala em diversos processos, principalmente na produção de biodiesel. A grande questão em torno da sua utilização é que, muitas vezes, os resíduos não são totalmente aproveitados. Esses resíduos apresentam grande potencial para muitas aplicações biotecnológicas e reutilização, porém o uso é impossibilitado por conta da presença de compostos antinutricionais e componentes tóxicos, o que tornam complicada a implementação de um destino sustentável.

É evidente a importância de estudos para a destoxificação da torta de pinhão-mansão pelo fato de os seus resíduos serem matérias primas de baixo custo, fácil acessibilidade e rica composição química e nutricional. Diante desses fatores, este estudo mostra-se importante na busca por alternativas biológicas de destoxificação da torta de pinhão-mansão através da seleção de fungos potencialmente degradadores dos componentes tóxicos presentes nela, através da técnica de fermentação em estado sólido, que possibilitará a implementação de ações biotecnológicas de reutilização para novo emprego desses resíduos que hoje se encontram sem destino e que podem causar danos severos ao meio ambiente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Selecionar fungos potencialmente degradadores de ésteres de forbol presentes na torta de pinhão-manso (*Jatropha curcas*).

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar fungos da Coleção de Culturas do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (IQ-UFRJ) capazes de crescer na torta de *Jatropha curcas* e degradar os ésteres de forbol através da técnica de FES;
- Testar diferentes metodologias de extração de ésteres de forbol;
- Acompanhar a cinética de degradação dos ésteres de forbol pelas cepas fúngicas mais promissoras.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Para execução das fermentações em estado sólido foram utilizados fungos filamentosos da coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM-UFRJ) *Penicillium brevicompactum*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus awamori* e *Trichoderma harzianum*. Uma cepa do fungo filamentoso *Penicillium simplicissimum*, isolada da fermentação natural de rejeitos do processamento da amêndoa de babaçu, foi utilizada como controle. A cepa já foi estudada como degradadora de ésteres de forbol (elimina 86% do teor de ésteres de forbol em condições não otimizadas) (Godoy, 2013). As cepas foram estocadas em meio PDA à -20°C.

4.2 Preparo do inóculo para fermentação em estado sólido

Para a fermentação em estado sólido (FES), os inóculos foram propagados em estufa à 30°C por 7 dias em meio PDA (Potato Dextrose Agar). Após o crescimento, foi feita raspagem e suspensão dos esporos utilizando tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7), tween 80 0,1% e pérolas de vidro para ajudar no desprendimento do fungo do meio. Em seguida, foi realizada a contagem dos esporos em câmara de Neubauer (Freire, 1996).

4.3 Fermentação em estado sólido (FES)

Para a execução da FES foi utilizado como meio basal e suporte sólido, a torta de pinhão-manso (Adquirido através da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais EPAMIG em 03/12/2014). As fermentações foram realizadas em frascos do tipo becker de 500ml (simulando reatores do tipo badeja), contendo 20g do meio de cultivo em camada de 1 cm de espessura, com inóculo de 2×10^7 esporos/g. Os reatores foram incubados em estufas com temperatura controlada e injeção de ar úmido com 95% de saturação, para que seja mantida a umidade do meio. A fermentação foi conduzida a 30°C e umidade inicial de 50% (m/m). Os frascos contendo o meio fermentado foram retirados a cada 24h de fermentação até um total de 120h, e foram recolhidas amostras para determinação do teor de ésteres de forbol, umidade, atividade de água e pH.

4.4 Medida de umidade

Aproximadamente 1,0 g do material fermentado foi pesada na balança determinadora de umidade (AnD MX-50 Moisture Analyzer Balance) e foi medida a porcentagem de umidade de cada ponto da fermentação.

4.5 Atividade de água (A_w)

As amostras (aproximadamente 1,0 g) de material fermentado foram analisadas em um higrômetro (Aqualab Decagon), para que fossem determinadas as atividades de água nos diferentes pontos de fermentação.

4.6 Medida de pH

Em 0,5 g do material fermentado foi adicionado 5 mL de água destilada, sucedida de vigorosa agitação. Após 10 minutos, o pH do sobrenadante foi medido em potenciômetro.

4.7 Análise da presença de ésteres de forbol na torta de pinhão-manso

Foram realizadas as extrações de ésteres de forbol das tortas de pinhão-manso com duas diferentes metodologias sugeridas por Makkar, 2007 para que fosse escolhida aquela que melhor realizasse extração na torta *in natura* e, depois de estabelecida a melhor metodologia, foram feitas as extrações das tortas fermentadas.

4.7.1 Metodologia I

Foram coletados 4 g de grão de torta de pinhão-manso em um pilão e almofariz e a torta foi moída. Foi adicionado 20 mL de diclorometano e a mistura foi moída novamente por 5 min. Após a mistura assentar, foi filtrada a fase líquida usando um papel de filtro. Foi transferido cerca de 20 mL de diclorometano para o pilão e a mistura foi moída novamente por cerca de 5 min. Após a mistura assentar, foi filtrada a fase líquida usando um papel de filtro e o processo foi repetido mais três vezes. Os filtrados de todas as cinco extrações foram unidos. O resíduo contendo a torta moída no pilão e o papel de filtro foram transferidos para um béquer e foi adicionado 50 mL de diclorometano e o béquer foi levado para sonificador (105 W por 3 min). A suspensão foi filtrada e o filtrado foi unido com os filtrados reunidos das cinco extrações anteriores. O solvente do filtrado foi recuperado em rotaevaporador. O resíduo seco foi dissolvido em 5 mL de tetrahydrofurano e foi filtrado através de um filtro de nylon ou teflon de 0,2 μm e injetado no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.7.2 Metodologia II

Foi realizado o seguinte procedimento três vezes utilizando a mesma amostra:

Foram adicionados 15 mL de metanol (100%) a 2 g de torta em um falcon de 50ml, sendo sonicado em um sonificador de ponta por 3 minutos a 240 W, utilizando um banho de gelo; o material foi então centrifugado à temperatura ambiente (3000g; 8 minutos) e foram unidos os sobrenadantes das repetições. O metanol dos sobrenadantes foi evaporado com auxílio de rotaevaporador e o material seco foi ressuscitado em 2 mL de metanol. Os frascos com o material ressuscitado foram sonicados por 4 minutos em um banho de ultrassom, o material dissolvido foi recuperado em falcon de 15ml. Foi colocado mais 2ml de metanol no frasco do rotaevaporador e levado para sonicação, o processo foi repetido mais duas vezes. O resultado das sonicações (6ml) foi levado ao speedvac para que o metanol fosse evaporado, após a secagem foi adicionado 2ml de metanol grau HPLC. O extrato obtido foi centrifugado a 17000 g por 10 minutos e o sobrenadante readquirido foi filtrado em membrana de Teflon 0,2 µm. O filtrado adquirido passou por cromatografia líquida de fase reversa em coluna C18 (KROMASIL 100 5µm X 4,6 X 250mm) em um sistema de CLAE.

4.7.3 Quantificação dos ésteres de forbol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Sob fluxo constante de 1,3 mL/min, a 25° C, para identificação dos ésteres de forbol, o material foi eluído da coluna com gradiente de três solventes:

1. Solvente A: 1,75 mL de ácido o-fosfórico (85%) em 1L de água deionizada
2. Solvente B: Acetonitrila (100%)
3. Solvente C: Tetrahidrofurano (THF)

Foi utilizado o forbol-12-miristato 13-acetato (Sigma) como padrão de éster de forbol. A tabela 2 apresenta os gradientes de eluição utilizados no CLAE.

Tabela 2. Gradiente de eluição a ser empregado no sistema CLAE

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Solvente 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

Os quatro picos característicos de ésteres de forbol obtidos foram integrados a 280 nm e o resultado expresso em equivalente de forbol-12- miristato 13-acetato foi expresso em micrograma de éster de forbol por grama de torta seca ($\mu\text{g/g}$).

5 RESULTADOS

5.1 Fermentação em estado sólido: acompanhamento de parâmetros de processo

À cada 24h de fermentação, foram coletadas amostras de torta fermentada, uma parte foi utilizada para medição da umidade, A_w e pH, a fim de acompanhar o processo de FES pelos fungos *Penicillium simplicissimum*, *Rhizopus* sp., *Trichoderma harzianum*, *P. brevicompactum* e *Aspergillus awamori*.

5.1.1 *Penicillium simplicissimum*

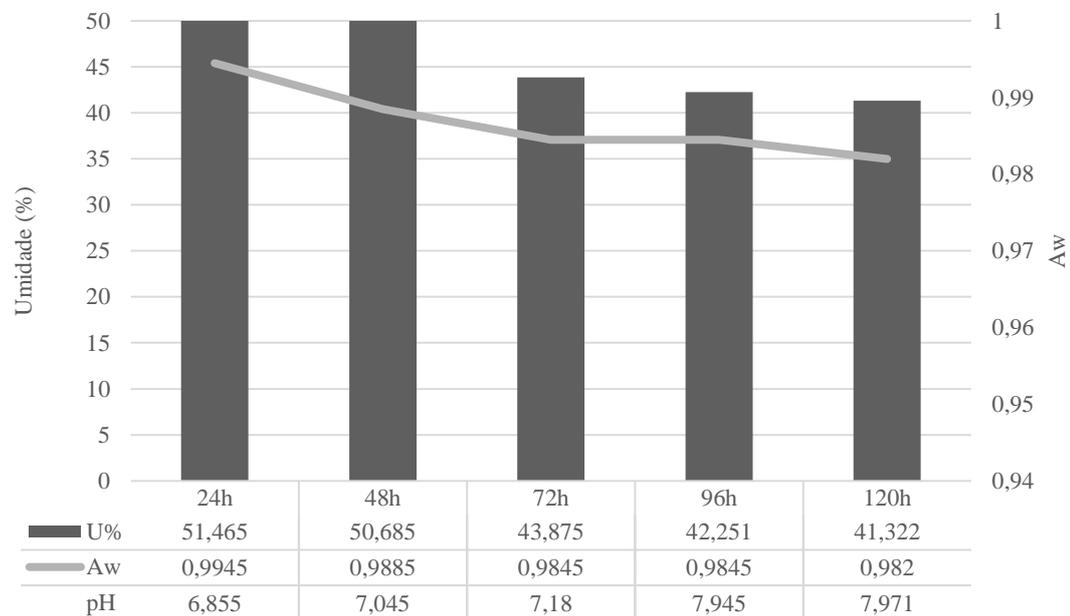


Figura 3 – Medidas dos parâmetros umidade, A_w e pH ao longo do processo de FES pelo fungo *P. simplicissimum* na torta de pinhão-manso

O fungo *Penicillium simplicissimum* foi capaz de crescer satisfatoriamente na torta de pinhão-manso. Durante o processo de FES, houve baixa perda de umidade (cerca de 10%), ao longo das 120h de crescimento (Figura 3). A umidade inicial, ajustada em 50%, manteve-se constante durante as primeiras 48h, observando-se uma queda a partir de 72h de fermentação (Umidade: 43,9%). A Atividade de água observada ao fim da fermentação ($A_w = 0,982$) também ainda era satisfatória para crescimento microbiano. Por fim, o pH manteve-se em torno de 7 ao longo do processo, chegando a 7,9 em 120h.

5.1.2 *Rhizopus sp.*

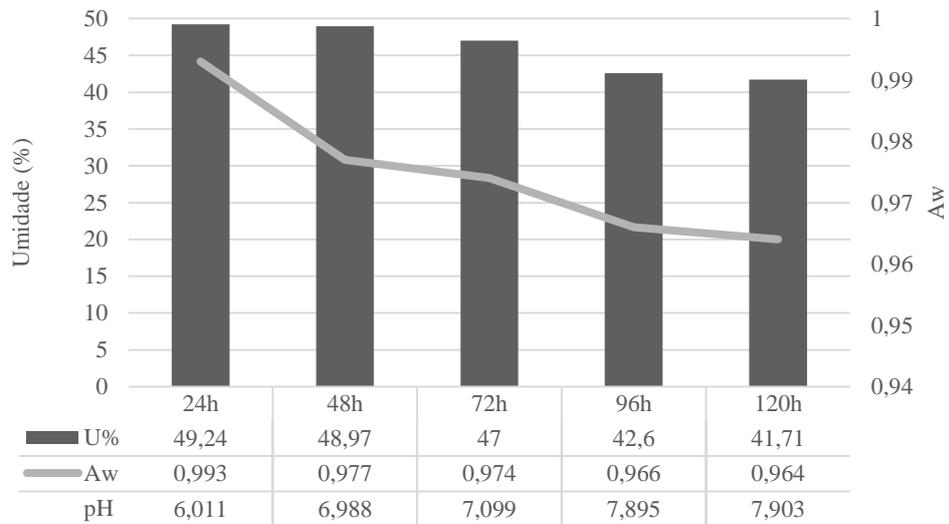


Figura 4 – Medidas dos parâmetros umidade, aw e pH ao longo do processo de FES pelo fungo *Rhizopus sp.* na torta de pinhão manso

O segundo fungo, *Rhizopus sp.*, também foi capaz de crescer satisfatoriamente na torta de pinhão-manso. Durante o processo de FES, houve baixa perda de umidade (menos de 10%), ao longo das 120h de crescimento (Figura 4). A umidade manteve-se próxima à inicial ajustada em 50%, observando-se uma maior queda a partir de 96h de fermentação (Umidade: 42,6%). A Atividade de água observada ao fim da fermentação ($A_w = 0,964$) continuava satisfatória para crescimento microbiano e o pH iniciou-se em torno de 6 e ao longo do processo chegou a 7,9 em 120h.

5.1.3 *Trichoderma harzianum*

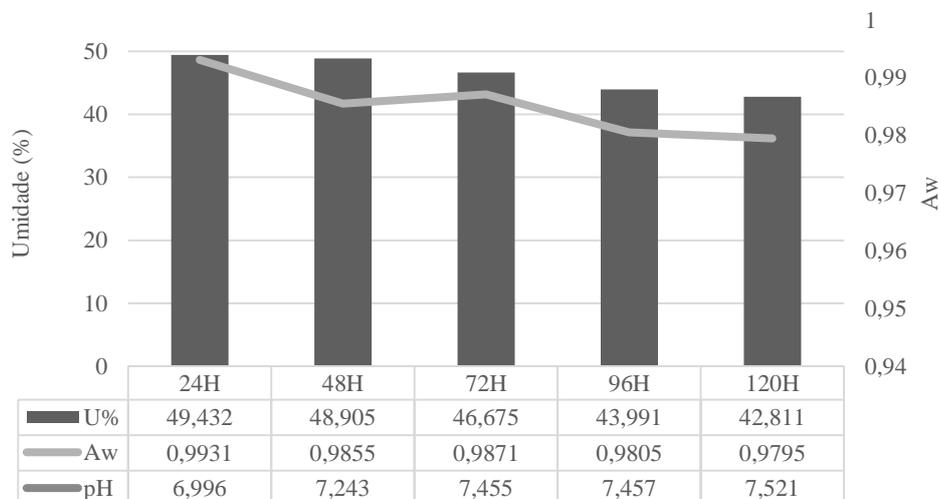


Figura 5 – Medidas dos parâmetros umidade, A_w e pH ao longo do processo de FES pelo fungo *T. harzianum* na torta de pinhão manso

Na Figura 5, pode-se observar que o crescimento do fungo *Trichoderma harzianum* proporcionou uma baixa perda de umidade (menos de 8%) ao longo das 120h de crescimento (Figura 5). A umidade inicial manteve-se constante durante as primeiras 48h com uma leve queda a partir de 72h de fermentação (Umidade: 46,675%). A Atividade de água observada ao fim da fermentação ($A_w = 0,9795$) manteve-se excelente para crescimento microbiano. O pH manteve-se em torno de 7 ao longo do processo, chegando a um pouco mais de 7,5 em 120h.

5.1.4 *Penicillium brevicompactum*

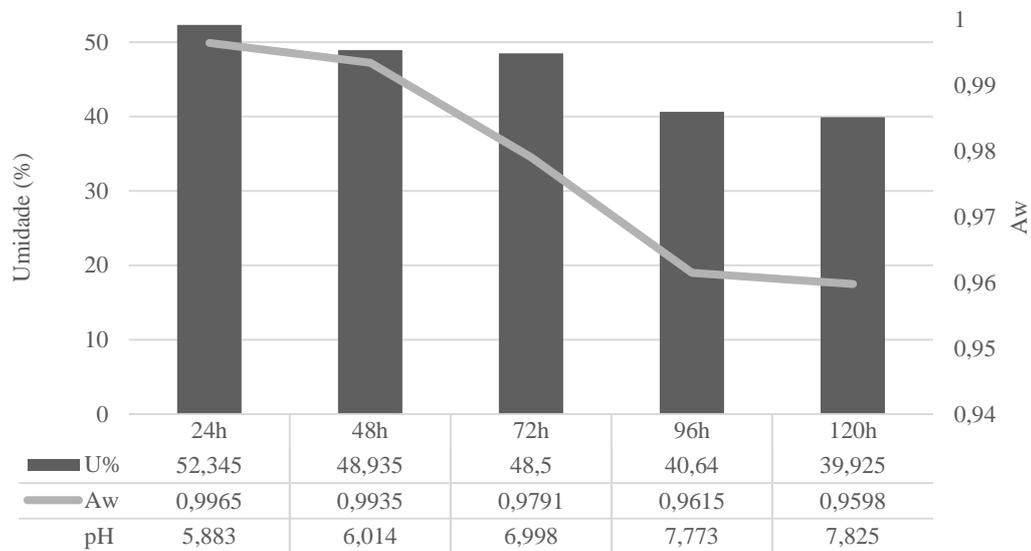


Figura 6 – Medidas dos parâmetros umidade, aw e pH ao longo do processo de FES pelo fungo *P. brevicompactum* na torta de pinhão manso

O penúltimo fungo avaliado, *Penicillium brevicompactum*, também teve o seu cultivo monitorado na torta de pinhão-manso. Durante o processo de FES, houve uma maior perda de umidade (mais de 10%), ao longo das 120h de crescimento (Figura 6). A umidade inicial ajustada em 50% manteve-se constante durante as primeiras 72h com uma queda de quase 8% a partir de 72h de fermentação (Umidade: 40,64%). A Atividade de água observada ao fim da fermentação ($A_w = 0,9598$) manteve-se favorável para crescimento microbiano. O pH iniciou-se em pouco menos de 6 e manteve-se em torno de 6 até 72h, chegando a um pouco mais de 7,8 em 120h.

5.1.5 *Aspergillus awamori*

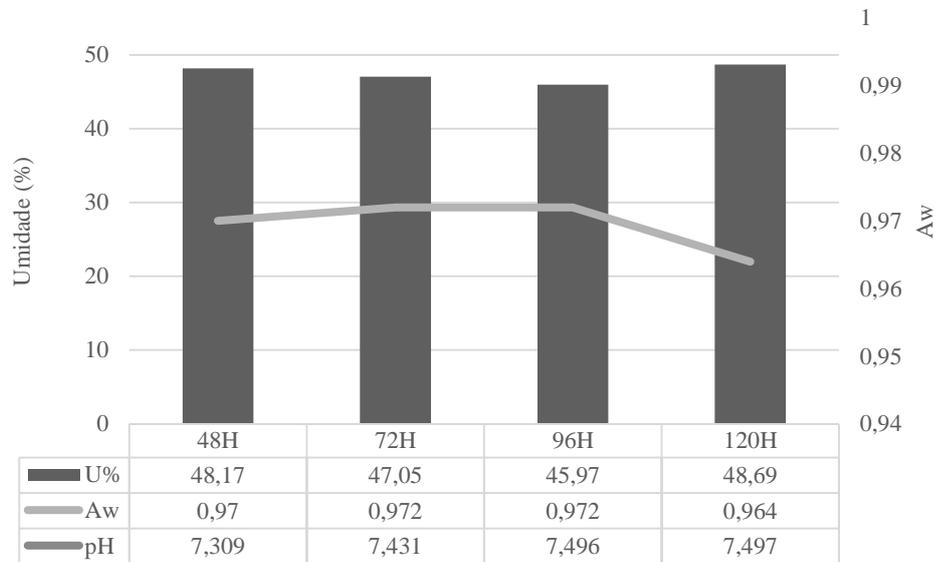


Figura 7 – Medidas dos parâmetros umidade, aw e pH ao longo do processo de FES pelo fungo *A. awamori* na torta de pinhão manso

O último fungo avaliado, *Aspergillus awamori* também foi capaz de crescer satisfatoriamente na torta de pinhão-manso. Durante o processo de FES, a umidade manteve-se acima de 45%, com queda de quase 5% em 96h ($U\% = 45,97$) e aumento de cerca de 3% em 120h ($U\% = 48,69$) (Figura 7). A Atividade de água observada ao fim da fermentação ($Aw = 0,964$) manteve-se boa para crescimento microbiano. O pH iniciou-se em pouco mais de 7 e manteve-se em torno de 7 até 120h.

5.2 Análise do teor de ésteres de forbol

Para análise do teor de ésteres de forbol na torta de pinhão-manso foram testadas duas metodologias, denominadas metodologia 1 e metodologia 2 propostas por Makkar (2007). Foi feita extração da mesma amostra *in natura* utilizando os dois métodos para que fossem comparados e escolhido o melhor para a continuidade do estudo.

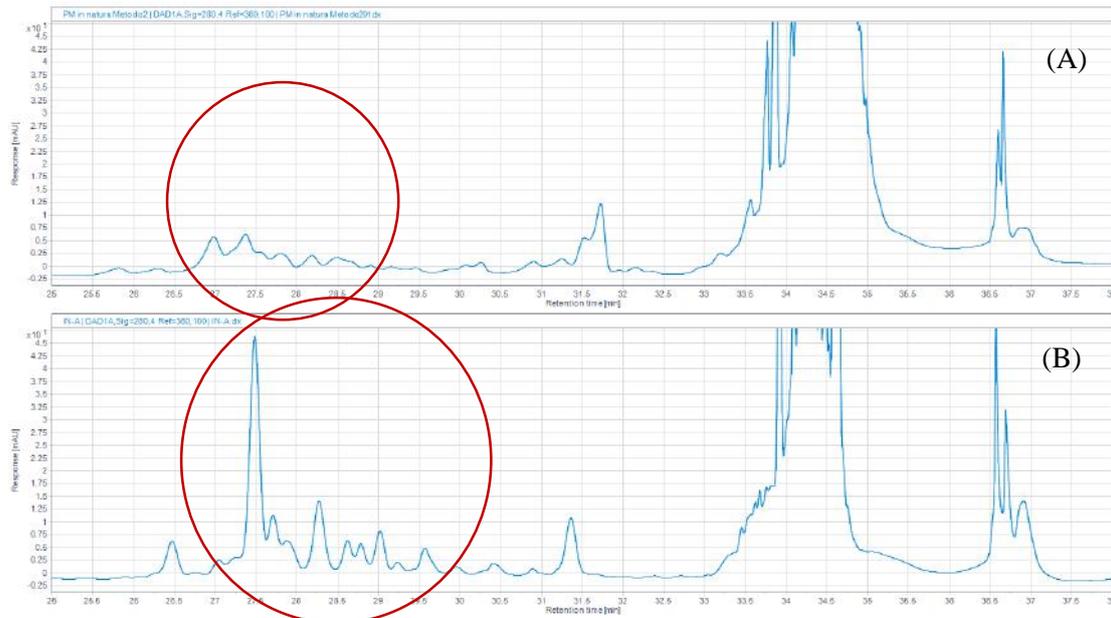


Figura 8 – Comparação dos cromatogramas para quantificação dos ésteres de ferulol na torta de pinhão-manso *in natura* (picos destacados no círculo) entre as metodologias 1 (A) e 2 (B)

Comparando as duas metodologias de extração de ésteres de ferulol foi possível observar que a metodologia 1 extraiu $203,4 \pm 85,2 \mu\text{g}$ de ésteres de ferulol/g torta (Figura 8 A), enquanto a concentração de ésteres de ferulol extraída pela metodologia 2 foi de $425,3 \pm 18,7 \mu\text{g/g}$ torta (Figura 8 B). Dessa forma, a metodologia 2 foi capaz de extrair 48% mais ésteres de ferulol da torta *in natura* do que a metodologia 1. Além disso, o erro experimental da metodologia 2 foi bem menor. No cromatograma (Figura 8) é possível observar a maior intensidade de sinal e melhor resolução dos picos na metodologia 2 (Figura 8 B), portanto foi estabelecido que a metodologia 2 seria utilizada nas análises posteriores.

Com a metodologia estabelecida, foram feitas as análises da concentração de ésteres de ferulol dos pontos de 120h de todos os fungos testados no estudo.

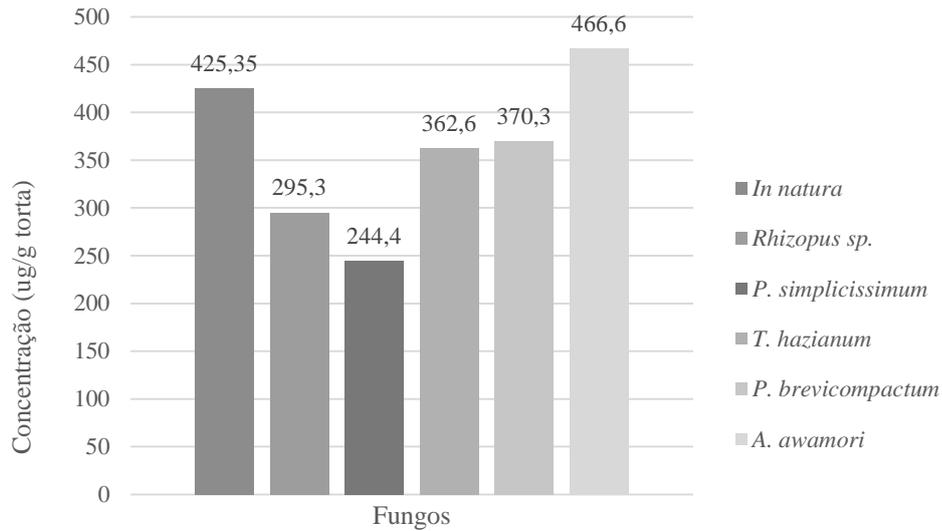


Figura 9 – Comparação das concentrações de ésteres de forbol de tortas fermentadas com todos os microrganismos em 120h e a torta *in natura*.

Na comparação de todas as concentrações obtidas às 120h de fermentação (Figura 9) pode ser observado que a torta fermentada que teve menor concentração de ésteres de forbol foi a do *P. simplicissimum* (244,4 ug/g torta), seguido da torta do *Rhizopus sp.* (295,3 ug/g torta) e também do *T. hazianum* (362,6 ug/g). A torta fermentada com *A. awamori* curiosamente apresentou níveis maiores de ésteres de forbol que o *in natura* (466,6 ug/g torta).

5.3 Perfil de degradação dos ésteres de forbol

Observadas as concentrações de todos os microrganismos testados, foram escolhidos *Rhizopus sp.* e *Trichoderma harzianum* para foco de estudo como potenciais degradadores dos ésteres de forbol. Desta forma, avaliou-se o perfil de degradação dos ésteres de forbol ao longo de 120h pelos fungos *Rhizopus sp.* (Figura 10) e *Trichoderma harzianum* (Figura 12).

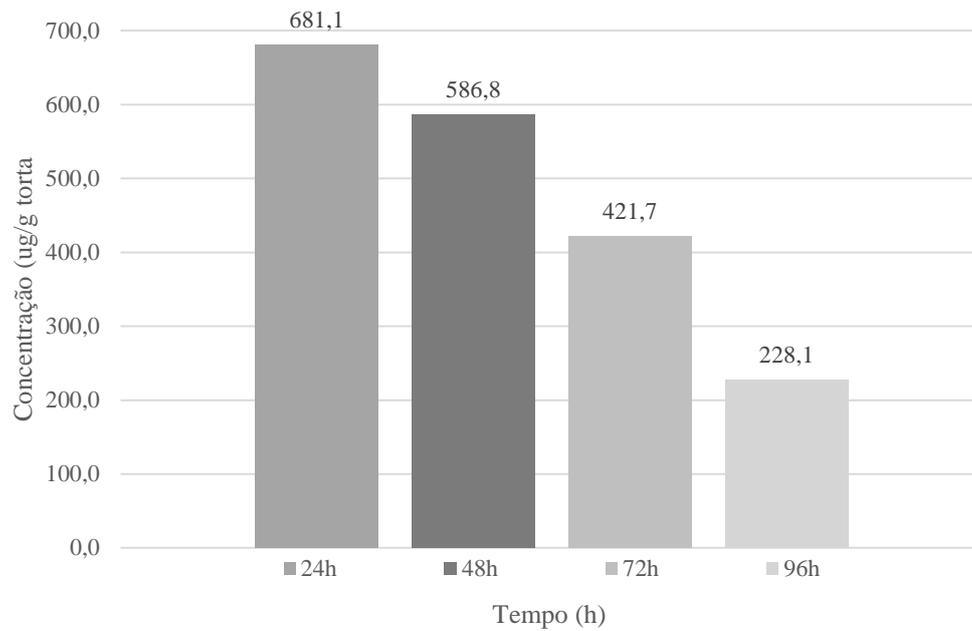


Figura 10 – Concentração de ésteres de forbol da torta de pinhão manso durante o processo de fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Rhizopus* sp. ao longo de 120h.

Analisando o perfil de degradação dos ésteres de forbol pelo fungo *Rhizopus* sp. (Figura 10), pode-se observar que em 96h foi detectada a menor concentração de éster de forbol (228,1 $\mu\text{g/g}$ torta).

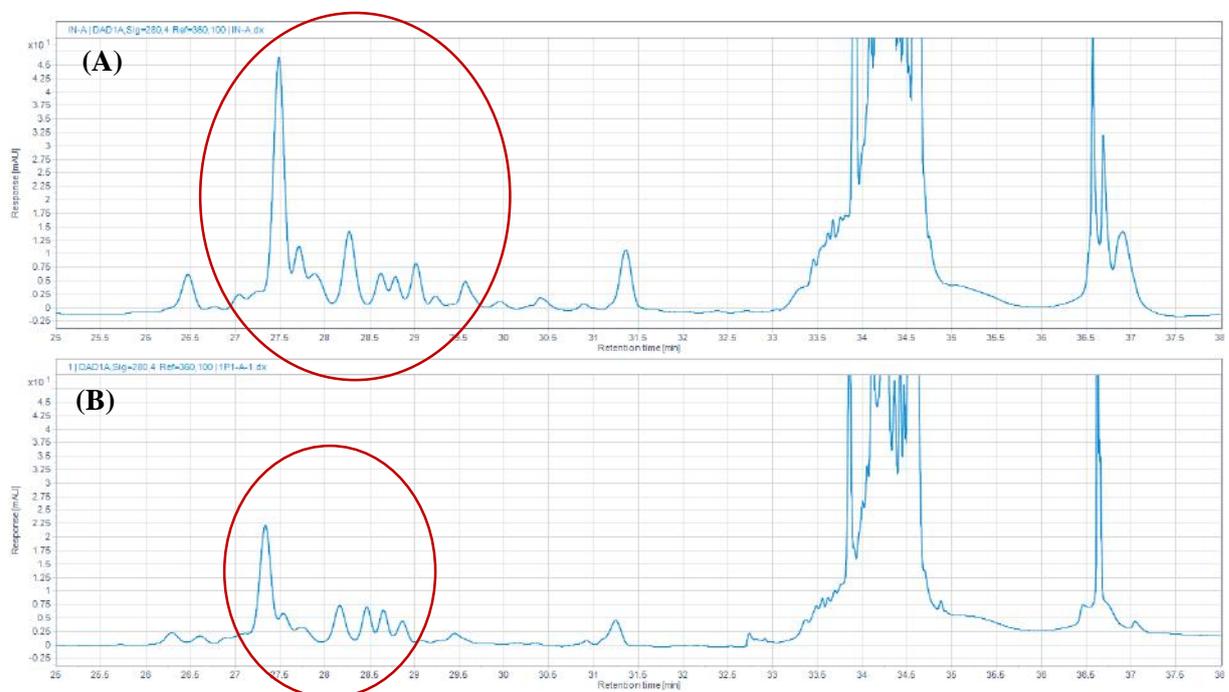


Figura 11 – Comparação dos cromatogramas das análises de ésteres de forbol da torta de pinhão-manso *in natura* (A) e da torta fermentada com *Rhizopus* sp. de 96h (B). Os picos referentes aos ésteres de forbol estão destacados no círculo.

No cromatograma (Figura 11) é possível observar a diferença entre a intensidade do sinal e da resolução de picos da torta *in natura* e fermentada com *Rhizopus* do ponto de 96h.

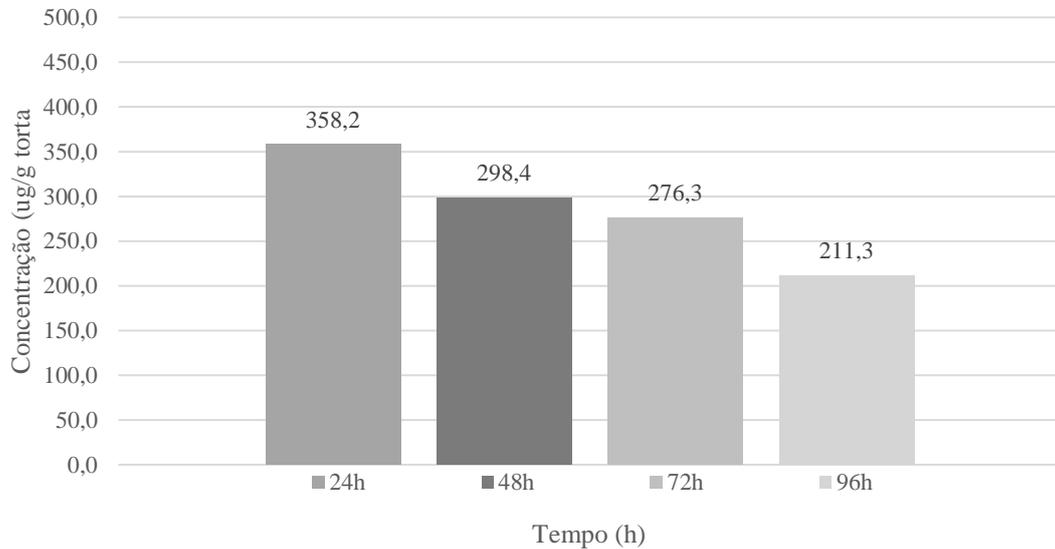


Figura 12 – Concentração de ésteres de forbol da torta de pinhão manso durante o processo de fermentação em estado sólido utilizando o fungo *T. harzianum* ao longo de 120h.

Na torta fermentada de *Trichoderma harzianum* foi observada a maior redução também em 96h, tempo no qual foi detectado 211,3 ug de éster de forbol por grama de torta (Figura 12).

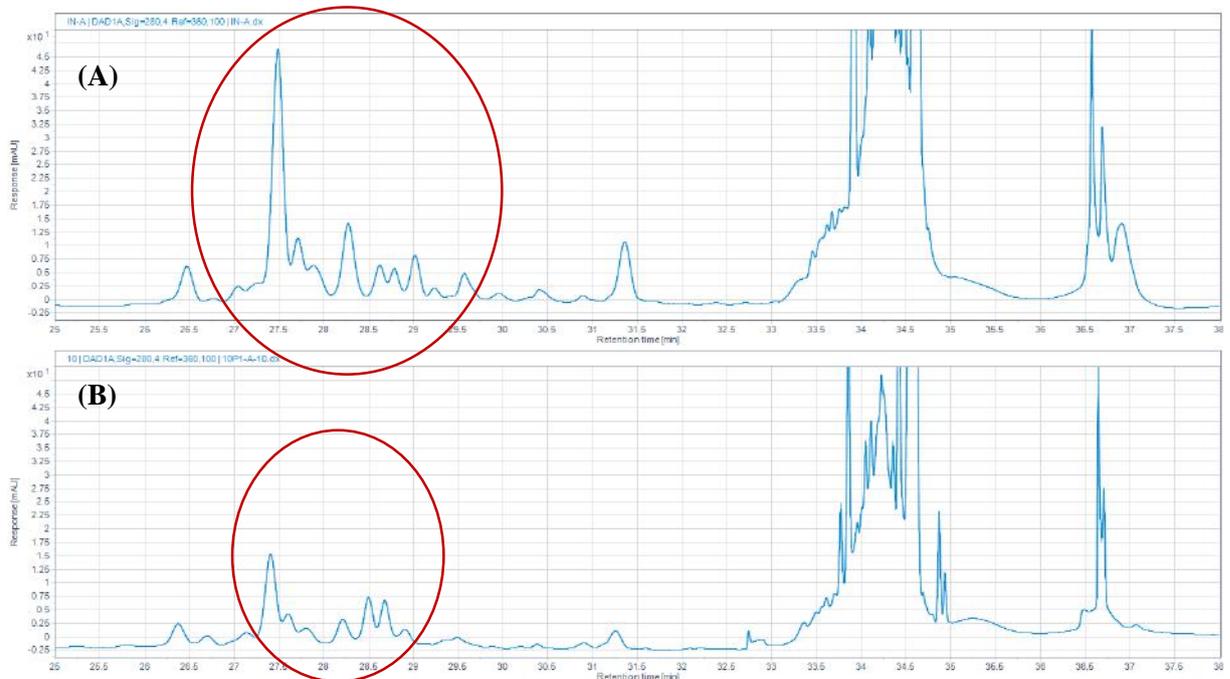


Figura 13 – Comparação dos cromatogramas das análises de ésteres de forbol da torta de pinhão-manso *in natura* (A) e torta fermentada com *Trichoderma harzianum* de 96h (B). Os picos referentes aos ésteres de forbol estão destacados no círculo.

No cromatograma da figura 13, é possível observar a diferença entre a intensidade do sinal e da resolução de picos da torta *in natura* (Figura 13 A) e fermentada com *Trichoderma harzianum* por 96h (Figura 13 B)

6 DISCUSSÃO

Atualmente existem diferentes métodos de destoxificação da torta de pinhão-manso, como ozônio, luz solar, radiação γ , surfactantes e extração por metanol. Porém, a maioria desses tratamentos é agressiva, inativa ou diminui as qualidades nutricionais da torta de *J. curcas*, resultando na degradação de aminoácidos funcionais e proteicos (Gomes, 2018). A FES vêm sendo utilizada como uma opção comprovadamente eficaz na destoxificação de resíduos agroindustriais e também na obtenção de enzimas a custo reduzido (Amorim, 2017).

Para a destoxificação de *J. curcas* por FES é necessário que existam condições favoráveis para o crescimento do microrganismo. Entre os parâmetros vistos que influenciam o processo fermentativo, a água apresenta papel mais importante na FES, por conta do seu elevado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida. A água está relacionada a dois parâmetros: o primeiro, é a umidade que está relacionada com a porcentagem de água na massa total do meio. O segundo é a atividade de água (A_w) que é um parâmetro termodinâmico relacionado ao potencial químico da água, ou seja, está relacionado com a quantidade de moléculas de água disponíveis para o metabolismo celular nas adjacências das partículas do substrato. A A_w se torna tão importante para a FES pois afeta diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (Gervais e Molin, 2003). Todas as FES feitas no dado estudo obtiveram baixa perda de umidade, o que é requerido para esse tipo de processo. Em 120h de fermentação praticamente todas as umidades apresentavam-se acima de 40%, com exceção do *P. brevicompactum* que obteve 39,9%. Com relação à atividade de água, foi observado que todas as FES estavam acima de 0,95 no tempo de 120h de fermentação. Pandey, 2003 descreveu que baixos níveis de A_w (em torno de 0,7) significam baixa disponibilidade de moléculas de água nas proximidades das células o que dificulta a troca de solutos na fase sólida e, com isso, diminui o metabolismo e impede o crescimento celular fúngico. Em contrapartida, elevados níveis de A_w (em torno de 0,99) dificultam a difusão de ar pelas partículas sólidas e, em caso de linhagens aeróbicas, esse efeito leva à redução no crescimento.

O pH é um parâmetro fundamental para a análise e controle dos processos de FES, uma vez que ele modula a atividade metabólica do microrganismo durante a fermentação. A necessidade de diferentes valores de pH depende de microrganismo para microrganismo, de metabolismo para metabolismo (Pandey, 2003). Em 120h de fermentação, todas as fermentações apresentavam, em média, o pH em torno de 7,7.

O fungo *Penicillium simplicissimum* cresceu em ótimas condições, terminando as 120h de fermentação com 41,3% de umidade e 0,982 de Aw (Figura 3), condições semelhantes às de Di Lucio, et al., 2004 em cinéticas de crescimento de *P. simplicissimum* em FES de pinhão-manso visando síntese enzimática. Em 120h, *P. simplicissimum* registrava pH de 7,9, o mesmo fungo foi testado por Godoy (2013) em torta de pinhão-manso e às 144h de fermentação o pH observado era 9.

Vaseghi 2012 obteve ótimos resultados de crescimento por FES de *Rhizopus sp.* em bagaço de cana, o que também foi observado no atual estudo, em que o crescimento do fungo em pinhão-manso apresenta condições muito favoráveis, uma vez que houve redução de menos de 10% de umidade durante as 120h de fermentação (Umidade inicial ajustada: 50%; Umidade em 120h: 41,7%) (Figura 4). A Aw de 0,96 às 120h também mostra boas condições para o crescimento do fungo em pinhão-manso, uma vez que o crescimento fúngico ocorre em Aw maior que 0,7, portanto há mais água disponível no meio para o crescimento microbiano (Pandey, 2001). Infelizmente, a quantificação do crescimento fúngico por metodologias indiretas já descritas, como teor de N-acetilglicosamina (Aidoo, Hendry e Wood, 1981) ou ergosterol (Silva, Machuca e Milagres, 2005), não foi possível nesse trabalho.

Trichoderma harzianum apresentou a menor queda de umidade às 120h de fermentação (Figura 5) dentre todos os fungos testados, menos de 8% (Umidade inicial ajustada: 50%; Umidade em 120h: 42,8%). A Aw observada ao fim das 120h de fermentação de *T. harzianum* foi de 0,97, sendo muito próximo do encontrado em *P. simplicissimum*. Najjar 2014 já descreveu que o fungo cresce sob ótimas condições de umidade e pH (em torno de 7) em pinhão-manso e apresenta grande potencial de destoxificação da torta, reduzindo de 99,7% (Tabela 1) da torta, utilizando metodologia de fermentação submersa.

Alani, 2009 demonstrou que *P. brevicompactum* é um ótimo candidato para crescimento por FES. Mesmo que, no presente estudo, a Aw do *P. brevicompactum* (Figura 6) tenha sido a menor entre todos os fungos ao final das 120h de fermentação (Aw = 0,95), ela ainda apresenta ótimos níveis para um bom crescimento microbiano na torta de pinhão-manso, o mesmo pode ser dito sobre a Umidade registrada em 120h de fermentação (39%). Essa maior queda da porcentagem de umidade do *P. brevicompactum* em relação aos outros fungos pode ser explicada como visto no estudo de Gervais e Molin (2003), em que são discutidos o papel da água na fermentação em estado sólido, e foi descrito que o alto crescimento celular gera calor metabólico levando à perda de umidade. Este fato não pode ser

confirmado no atual estudo, uma vez que não foram feitos experimentos de quantificação de crescimento.

Durante o processo de FES de *Aspergillus awamori* foi observado que a umidade se manteve acima de 45%, com queda de quase 5% em 96h (U% = 45,97) e houve, curiosamente um aumento de cerca de 3% de umidade em 120h (U% = 48,69) (Figura 7), que pode ser explicada por um possível erro experimental ou analítico .

Os resíduos de pinhão-manso apresentam os ésteres de forbol que impedem a sua utilização para alimentação animal (Makkar, 2007). Para análise do teor de ésteres de forbol na torta de pinhão-manso foram testadas duas metodologias, denominadas metodologia 1 e metodologia 2 (Makkar, 2007) (Figura 8). Foram comparados os resultados da cromatografia das duas metodologias de extração de ésteres de forbol e foi possível observar que a metodologia 1 extraiu $203,4 \pm 85,2$ μg de ésteres de forbol/g torta (Figura 8 A). Em contrapartida, a concentração de ésteres de forbol extraída pela metodologia 2 foi de $425,3 \pm 18,7$ $\mu\text{g/g}$ torta (Figura 8 B) o que demonstrou que a metodologia 2 foi capaz de extrair 48% mais ésteres de forbol da torta *in natura* do que a metodologia 1. É possível observar a maior intensidade de sinal e melhor resolução dos picos da metodologia 2 (Figura 8 B), no cromatograma (Figura 8) o que direcionou o estudo para a utilização da metodologia 2 para os experimentos de teor de ésteres de forbol na torta de pinhão-manso. A maior eficiência da metodologia 2 é devido, provavelmente, a utilização de ondas de ultrassom para a extração dos ésteres, diferente da metodologia 1, a qual utiliza moedor manual (Makkar, 2007).

Diversos autores observaram fungos capazes de destoxificar a torta de pinhão-manso, como está descrito na Tabela 1. A Figura 9 ilustra uma comparação de todas as concentrações obtidas às 120h de fermentação em que foi observado que a torta fermentada que teve menor concentração de ésteres de forbol foi a do *P. simplicissimum* (244,4 $\mu\text{g/g}$ torta), seguido da torta do *Rhizopus sp.* (295,3 $\mu\text{g/g}$ torta) e também do *T. hazianum* (362,6 $\mu\text{g/g}$). O fungo *P. simplicissimum* foi utilizado neste trabalho como controle positivo, pois já havia sido descrito por Godoy (2013) uma redução de 86% dos ésteres de forbol presentes na torta de pinhão-manso em 144h de fermentação. No presente trabalho, observamos uma redução de 42,5% do teor de ésteres de forbol. Vale salientar, entretanto, o teor de ésteres de forbol quantificados na torta não-tratada (*in natura*) nos dois trabalhos: Godoy (2013) encontrou cerca de 2200 $\mu\text{g/g}$, enquanto no presente estudo a torta *in natura* teve uma concentração de ésteres de forbol de 425 $\mu\text{g/g}$, cerca de 80% menor. Como o lote de pinhão-manso utilizado em ambos trabalhos é o mesmo, essa grande diferença do teor de ésteres de forbol é devido,

provavelmente, ao tempo de estocagem entre a execução dos trabalhos. A estocagem foi realizada com o material seco, embalados à vácuo e mantidos em temperatura ambiente. Posto isso, apesar da aparente menor redução dos ésteres de forbol pelo *P. simplicissimum* (42,5%) no presente estudo, o teor final deste composto foi de 244,4 µg/g de torta, menor do que o teor encontrado por Godoy (2013) ao final de 144h, que foi de 308 µg/g de torta.

Rhizopus sp. reduziu em torno de 30,6% e *T. harzianum* reduziu aproximadamente 14,8%. Em contraponto, a torta fermentada com *A. awamori* curiosamente apresentou níveis maiores e ésteres de forbol que a torta *in natura* (466,6 µg/g torta). Durante a extração de ésteres de forbol, foi observada a extração grande de pigmento de cor preta na fermentação de *A. awamori* em 120h, deixando o extrato a ser analisado por CLAE extremamente escuro. Esta informação se encaixaria numa possível hipótese para a interferência na análise do teor de ésteres de forbol, que foi maior na torta fermentada do que na *in natura*. Carvalho (2004), visando a quantificação de pigmentos de *Monascus sp.* produzido por FES em bagaço de mandioca, utilizou etanol ou metanol para extrair os pigmentos e analisou os mesmo por CLAE em coluna C18, a 260nm. Condições de extração e análise semelhantes às executadas na extração e quantificação de ésteres de forbol. Ou seja, uma possível hipótese para o maior nível de ésteres de forbol seria que os pigmentos presentes na torta fermentada de *A. awamori* podem estar interferindo e superestimando a quantificação dos ésteres de forbol.

Após essa seleção inicial, foi traçado um perfil de degradação dos ésteres de forbol ao longo de 120h pelos fungos que obtiveram a maior redução dos ésteres de forbol: *Rhizopus sp.* (Figura 10) e *Trichoderma harzianum* (Figura 12). *Rhizopus sp.* (Figura 10) apresentou, em 96h de fermentação, a menor concentração de éster de forbol, 228,1 µg/g torta, uma redução de cerca de 46,3% de ésteres de forbol em relação à torta *in natura*. Belewu e Sam, 2010 realizaram FES nas mesmas condições que o atual estudo com fungos *Rhizopus spp.* (*Rhizopus oligosporus* e *Rhizopus nigricans*) e observaram que os fungos possuem a capacidade de produzir enzimas na fase vegetativa e reprodutiva, tais como lipases e peptidases que podem ter contribuído para a destoxificação da torta de pinhão-manso. No atual estudo foi observada a capacidade do *Rhizopus sp.* de reduzir os níveis de ésteres de forbol da torta de pinhão-manso, o que leva a crer que, provavelmente, foi graças a capacidade dos fungos *Rhizopus spp.* de produzir enzimas degradadoras de compostos tóxicos.

Na figura 12 é visto que na torta fermentada de *Trichoderma harzianum* também foi observada uma alta redução em 96h de fermentação, 211,3 µg/g, aproximadamente 50,3% de

redução do teor de ésteres de forbol em relação ao *in natura*. No cromatograma (Figura 13), é possível observar a diferença entre a intensidade do sinal e da resolução de picos da torta *in natura* (Figura 13 A) e fermentada com *Trichoderma harzianum* de 96h (Figura 13 B). É sabido que os fungos *Trichoderma* spp. convivem em associação mutualista com a planta hospedeira e produz várias enzimas como mecanismos de defesa (Nalini et al., 2005). Najjar, 2014 especula que, por isso, os *Trichoderma* spp. podem produzir enzimas para neutralizar compostos tóxicos como os ésteres de forbol ou somente para explorar esses compostos como nutrientes para o seu crescimento e observou que *T. harzianum* produz lipase e ainda removeu ésteres de forbol da torta de pinhão-manso (redução de 97%), concluindo que a presença de ésteres de forbol estimulou a produção de enzima lipase. No atual estudo não foram quantificadas as produções enzimáticas dos fungos selecionados, porém pode-se especular que o *T. harzianum* teve o mesmo papel por aqui, uma vez que foi o fungo que atingiu maiores níveis de degradação de ésteres de forbol, assim como o *P. simplicissimum*, que é um fungo sabidamente produtor de lipase e degradador dos ésteres de forbol.

7 CONCLUSÃO

Os microrganismos *Penicillium simplicissimum*, *Rhizopus sp.*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium brevicompactum* e *Aspergillus awamori* apresentam boas condições de crescimento na torta tóxica de pinhão-manso. Dentre eles, *Penicillium simplicissimum* (244,4 µg/g torta), *Rhizopus sp.* (295,3 µg/g torta) e *Trichoderma harzianum* (362,6 µg/g), são os fungos que atingiram os maiores níveis de redução do teor de ésteres de forbol 42,5%, 30,6% e 14,8%, respectivamente, em comparação com a torta de pinhão-manso *in natura* (425,35 µg/g torta). As cepas usadas de *Rhizopus sp.* e *Trichoderma harzianum* foram os fungos que mostram ser os maiores potenciais de destoxificação da torta de pinhão-manso, eles apresentaram as suas maiores reduções de ésteres de forbol às 96h de fermentação, 46,3% e 50,3%, respectivamente. Vale salientar que as fermentações em estado sólido feitas no dado trabalho não foram realizadas em condição otimizada. Os resultados obtidos no estudo são promissores e essenciais para a continuidade da obtenção de uma metodologia eficaz e sustentável para a destoxificação completa da torta de pinhão-manso e, assim, garantindo a oportunidade de agregar valor ao resíduo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla, A. L., Silva Filho, J. C. D., Godoi, A. R. D., Carmo, C. D. A., & Eduardo, J. L. D. P. (2008). Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(SPE), 260-268.
- Achten, W., Verchot, L., Franken, Y.J., Mathijs, E., Singh, V.P., Aerts, R. e Muys, B. (2008). *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass and Bioenergy*, 32, 1063-1084.
- Adam, S. (1974). Toxic effects of *Jatropha curcas* in mice. *Toxicology*, 2, 67-76.
- Adam, S. E. I., & Magzoub, M. (1975). Toxicity of *Jatropha curcas* for goats. *Toxicology*, 4(3), 388-389.
- Ahmed, O. e Adam, S. (1979). Effects of *Jatropha curcas* on calves. *Veterinary pathology*, 16, 476-482.
- Aidoo, K. E., Hendry, R., & Wood, B. J. B. (1981). Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 12(1), 6-9. Silva, E.
- Amorim, G. M., Oliveira, A. C., Gutarra, M. L., Godoy, M. G., & Freire, D. M. (2017). Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 34-41.
- Aregheore, E. M., Becker, K., & 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(1), 51-56.
- Barrios-González, J. (2012). Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, 47(2), 175-185.
- Belewu, M.; Sam, R. Solid state fermentation of *Jatropha curcas* kernel cake: proximate composition and antinutritional components. *Journal of yeast and fungal research* 2010, 1, 44-46.
- 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., & Soccol, C. R. (2000). Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme and microbial technology*, 27(1-2), 127-133.
- Brodie, C., & Blumberg, P. M. (2003). Regulation of cell apoptosis by protein kinase c δ . *Apoptosis*, 8(1), 19-27.
- Carvalho, J. C. D. (2004). Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de pigmentos a partir de *Monascus* por fermentação em substrato sólido. Castro, H. F. D., Mendes, A. A., Santos, J. C. D., & Aguiar, C. L. D. (2004). Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*.
- Castilho, L. R., Medronho, R. A., & Alves, T. L. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 71(1), 45-50.
- Chowdhury, M. I. H., Koyanagi, Y., Kobayashi, S., Hamamoto, Y., Yoshiyama, H., Yoshida, T., & Yamamoto, N. (1990). The phorbol ester TPA strongly inhibits HIV-1-induced syncytia formation but enhances virus production: possible involvement of protein kinase C pathway. *Virology*, 176(1), 126-132.
- Chowdhury, M.I.H., Koyanagi, Y., Kobayashi, S., Hamamoto, Y., Yoshiyama, H., Yoshida, T. e Yamamoto, N. (1990). The phorbol ester TPA strongly inhibits HIV-1-induced syncytia formation but enhances virus production: possible involvement of protein kinase C pathway. *Virology*, 176, 126-132.
- de Janeiro, I. R. (2019). Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br> >. Acessado em, 10/01/2019.
- Devappa, R.K., Makkar, H.P. e Becker, K. (2010). Nutritional, biochemical, and pharmaceutical potential of proteins and peptides from *jatropha*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6543-6555.

- Di Luccio, M., Capra, F., Ribeiro, N. P., Vargas, G. D., Freire, D. M., & De Oliveira, D. (2004). Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. In Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO (pp. 173-180). Humana Press, Totowa, NJ.
- DIAS, L.d.S. (2007). Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível: LAS Dias.
- Duraes, F.O.M., Laviola, B.G.a. e Alves, A.A. (2012). Potential and challenges in making physic nut (*Jatropha curcas* L.) a viable biofuel crop: the Brazilian perspective. *Plant Sci. Rev*, 2011, 179.
- El Badwi, S., Mousa, H., Adam, S. e Hapke, H. (1992). Response of brown hisex chicks to low levels of *Jatropha curcas*, *Ricinus communis* or their mixture. *Veterinary and human toxicology*, 34, 304-306.
- El-Mekkawy, S., Meselhy, M. R., Nakamura, N., Hattori, M., Kawahata, T., & Otake, T. (2000). Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry*, 53(4), 457-464.
- Fernandes, R. D. N. (2010). Valor nutritivo do farelo de pinhão manso (*Jatropha curcas*) para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).
- Freire, D. M. G. et al. (2008). *Biocatalysis in Environmental Technology. Biocatalysis research progress*. New York: Nova Biomedical Books. cap. 3, p.166.
- Gadir, W.A., Onsa, T., Ali, W., El Badwi, S. e Adam, S. (2003). Comparative toxicity of *Croton macrostachys*, *Jatropha curcas* and *Piper abyssinica* seeds in Nubian goats. *Small Ruminant Research*, 48, 61-67.
- Gervais, Patrick, and Paul Molin. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13.2-3 (2003): 85-101.
- Godoy, M. G., Fernandes, K. V., Gutarra, M. L., Melo, E. J., Castro, A. M., Machado, O. L., & Freire, D. M. (2012). Use of Vero cell line to verify the biodetoxification efficiency of castor bean waste. *Process biochemistry*, 47(4), 578-584.
- Godoy, M. G., Gutarra, M. L., Castro, A. M., Machado, O. L., & Freire, D. M. (2011). Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(8), 945-953.
- Godoy, M. G., Gutarra, M. L., Maciel, F. M., Felix, S. P., Bevilacqua, J. V., Machado, O. L., & Freire, D. M. (2009). Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production. *Enzyme and microbial technology*, 44(5), 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.
- Gombert, A. K., Pinto, A. L., Castilho, L. R., & Freire, D. M. (1999). Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*, 35(1-2), 85-90.
- Gomes, T. G., Hadi, S. I., Costa Alves, G. S., Mendonça, S., De Siqueira, F. G., & Miller, R. N. (2018). Current Strategies for the Detoxification of *Jatropha curcas* Seed Cake: A Review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(11), 2510-2522.
- Gonzalez-Guerrico, A. M., Meshki, J., Xiao, L., Benavides, F., Conti, C. J., & Kazanietz, M. G. (2005). Molecular mechanisms of protein kinase C-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 38(6), 639.
- Gutarra, M. L. E. (2003). Produção de lipase por fermentação no estado sólido: seleção de fungos produtores e estudo das condições de cultivo. Rio de Janeiro: Ciência dos Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- Gutarra, M. L. E. (2007) Produção de lipase pelo fungo *Penicillium simplicissimum*: caracterização do processo fermentativo e do produto e desenvolvimento de biorreator para fermentação no estado sólido. 155 Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- 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.
- Han, Z., Wax, M. B., & Patil, R. V. (1998). Regulation of aquaporin-4 water channels by phorbol ester-dependent protein phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(11), 6001-6004.
- Hecker, E. e Schmidt, R. (1974). Phorbol esters—the irritants and cocarcinogens of *Croton Tiglium* L Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products (pp. 377-467): Springer.
- Jaeger, K.-E. e Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 13, 390-397.
- Jaeger, K.-E. e Reetz, M.T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 16, 396-403.
- Jisha, V.N., Smitha, R.B., Pradeep, S., Sreedevi, S., Unni, K.N., Sajith, S., Priji, P., Josh, M.S. e Benjamin, S. (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in enzyme research*, 1, 39.
- Katole, S., Saha, S. K., Das, A., Sastry, V. R. B., Lade, M. H., & Prakash, B. (2013). Nutrient intake, digestibility, and blood metabolites of goats fed diets containing processed *Jatropha* meal. *Tropical animal health and production*, 45(7), 1563-1569.
- Kumar, C.G. e Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advances*, 17, 561-594.
- Kumar, C.G. e Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advances*, 17, 561-594.
- Laviola, B., Alves, A., Kobayashi, A. e Formighieri, E. (2015). Pinhão-mansão na Embrapa Agroenergia. Embrapa Agroenergia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).
- Laviola, Bruno Galvêas, et al. Desempenho agrônômico e ganho genético pela seleção de pinhão-mansão em três regiões do Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 49.5 (2014): 356-363.
- Li, C. Y., Devappa, R. K., Liu, J. X., Lv, J. M., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2010). Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 620-625.
- Liberalino, A. A. A., Bambirra, E. A., Moraes-Santos, T., & Vieira, E. C. (1988). *Jatropha curcas* L. seeds: chemical analysis and toxicity. *Arquivos de biologia e tecnologia*, 31(4), 539-550.
- Linares, A., Caba, J. M., Ligeró, F., de la Rubia, T., & Martínez, J. (2003). Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavido-alba*. *Chemosphere*, 51(9), 887-891.
- Lotti, M. e Alberghina, L. (2007). Lipases: molecular structure and function *Industrial enzymes* (pp. 263-281): Springer.
- Madeira Jr, J. V., Macedo, J. A., & Macedo, G. A. (2011). Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. *Bioresour. Technol.*, 102(15), 7343-7348.
- Makkar, H. P., & 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(8), 773-787.
- Makkar, H. P., Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). *Plant secondary metabolites*. Humana Press.

- 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., Francis, G. e Becker, K. (2008). Protein concentrate from *Jatropha curcas* screw-pressed seed cake and toxic and antinutritional factors in protein concentrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1542-1548.
- Makkar, Harinder PS, Perumal Siddhuraju, and Klaus Becker. *Plant secondary metabolites*. Humana Press, 2007.
- Mendonça, S. e Laviola, B.G. (2009). Uso potencial e toxidez da torta de pinhão-manso. Embrapa Agroenergia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).
- Mojsov, K. (2012). Microbial alpha-amylases and their industrial applications: a review. *International Journal of Management, IT and Engineering (IJMIE)*, 2, 583-609.
- 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(2), 2274-2288.
- Najjar, A.; Abdullah, N.; Saad, W. Z.; Ahmad, S.; Oskoueian, E.; Gherbawy, Y. Removal of Phorbol Esters Present in *Jatropha curcas* Kernel by Fungal Isolates. *International Journal of Agriculture & Biology* 2014, 16, 871-878.
- Nunes, C. F., & Paschal, M. (2007). Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). *Mestrado em fitotecnia-Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG. 78pp.*
- Oboh, G., & Akindahunsi, A. A. (2003). Biochemical changes in cassava products (flour & gari) subjected to *Saccharomyces cerevisiae* solid media fermentation. *Food Chemistry*, 82(4), 599-602.
- Openshaw, K. (2000). A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass and Bioenergy*, 19, 1-15.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84. Pandey, Ashok. Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. Asiatech Publishers, 2001.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84.
- Pandey, Ashok. Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. Asiatech Publishers, 2001.
- Rahardjo, Y. S., Tramper, J., & Rinzema, A. (2006). Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnology Advances*, 24(2), 161-179.
- S., M.H.P. e Klaus, B. (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.
- Salihu, A., Alam, M.Z., AbdulKarim, M.I. e Salleh, H.M. (2012). Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 58, 36-44.
- Saturnino, H.M., Pacheco, D.D., Kakida, J., Tominaga, N. e Gonçalves, N.P. (2005). Cultivation of *Jatropha curcas* L. *Informe agropecuário*, 26, 44-78.
- Schrag, J.D. e Cygler, M. (1997). [4] Lipases and $\alpha\beta$ hydrolase fold Methods in enzymology (Vol. 284, pp. 85-107): Elsevier.
- Silinsky, E.M. e Searl, T.J. (2003). Phorbol esters and neurotransmitter release: more than just protein kinase C? *British journal of pharmacology*, 138, 1191-1201.

- Silva, E. M., Machuca, A., & Milagres, A. M. F. (2005). Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. *Process Biochemistry*, 40(1), 161-164.
- Sosath, S., Ott, H.H. e Hecker, E. (1988). Irritant principles of the spurge family (Euphorbiaceae) XIII. Oligocyclic and macrocyclic diterpene esters from latices of some Euphorbia species utilized as source plants of honey. *Journal of natural products*, 51, 1062-1074.
- Vargas, G. D., Treichel, H., de Oliveira, D., Beneti, S. C., Freire, D. M., & Di Luccio, M. (2008). Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(1), 47-54.
- Vasudevan, P.T. e Briggs, M. (2008). Biodiesel production—current state of the art and challenges. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35, 421.
- Yu, X.-W., Xu, Y. e Xiao, R. (2016). Lipases from the genus *Rhizopus*: Characteristics, expression, protein engineering and application. *Progress in Lipid Research*, 64, 57-68.
- Zayed, S.M., Farghaly, M., Taha, H., Gotta, H. e Hecker, E. (1998). Dietary cancer risk conditional cancerogens in produce of livestock fed on species of spurge (Euphorbiaceae). *Journal of cancer research and clinical oncology*, 124, 131-140.
- Zhang, L., Zhang, C., Wu, P., Chen, Y., Li, M., Jiang, H., & Wu, G. (2014). Global analysis of gene expression profiles in physic nut (*Jatropha curcas* L.) seedlings exposed to salt stress. *PLoS One*, 9(5), e97878.