



Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.72, n.5, p.1947-1958, 2020

## Destoxificação e perfil nutricional da torta de mamona destoxificada por diferentes soluções alcalinas

[*Detoxification and nutritional profile of the detoxified castor by different alkaline solutions*]

R.A. Araújo<sup>1</sup>, J.N.M. Neiva<sup>2</sup>, M.C.P. Rogério<sup>3</sup>, M.J.D. Cândido<sup>4</sup>,  
A.S. Egito<sup>3</sup>, P.L. Pereira<sup>5</sup>, R.C. Lucas<sup>4</sup>, R.C.F.F. Pompeu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Maranhão – Itapecuru-Mirim, MA

<sup>2</sup>Universidade Federal do Tocantins - Araguaína, TO

<sup>3</sup>Embrapa Caprinos e Ovinos - Sobral, CE

<sup>4</sup>Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

<sup>5</sup>Universidade Estadual Vale do Acaraú - Sobral, CE

### RESUMO

Objetivou-se avaliar a destoxificação da torta de mamona bruta (TMB), por meio de dois produtos alcalinos em diferentes concentrações, e seus efeitos sobre a composição química, a degradabilidade *in situ* da MS e o fracionamento de proteínas. Utilizou-se o hidróxido de cálcio [Ca(OH)<sub>2</sub>] e o hidróxido de sódio (NaOH) em duas concentrações (60 e 90 gramas), diluídos em quatro quantidades de água (1.000; 1.500; 2.000 e 2.500mL de água por quilo de TMB). Observou-se que, das diferentes concentrações utilizadas, somente a utilização de 90 e 60 gramas de Ca(OH)<sub>2</sub> e NaOH, respectivamente, conseguiu destoxificar 100% da TMB, ambas diluídas em 2.000mL de água. Por outro lado, ao avaliar o tempo mínimo de contato dos reagentes com a TMB para uma máxima destoxificação, observou-se que três horas de contato é o tempo necessário para os reagentes diminuírem em 100% as proteínas citotóxicas, além de não deixar atividade hemaglutinante nesse material. A destoxificação com o NaOH proporcionou maior degradação das proteínas solúveis e da matéria seca, favorecendo a disponibilização do nitrogênio não proteico, estando sua aplicação em escala industrial na dependência de estudos sobre viabilidade operacional e econômica.

Palavras-chave: biodiesel, degradação ruminal, hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio, ovino

### ABSTRACT

*This study aimed to evaluate the detoxification of crude castor (DCC) through two alkaline products in different concentrations and their effects on the chemical composition, in situ degradability of DM and the fractionation of proteins. We used the calcium hydroxide [Ca(OH)<sub>2</sub>] and sodium hydroxide (NaOH) in two concentrations (60 and 90 grams) diluted in 4 quantities of water (1,000; 1,500; 2,000 and 2,500ml of water per kilo of DCC). It was observed that in the different concentrations used, only the use of 90 and 60 grams of Ca(OH)<sub>2</sub> and NaOH, respectively managed to detoxify 100% of the DCC, both diluted in 2,000ml of water. On the other hand, when assessing the minimum time of contact of the reagents with the DCC for maximum detoxification, it was observed that with three hours of contact is the time required for the reagents decrease in 100% of the cytotoxic proteins, in addition to not leave haemagglutinating activity in this material. The detoxification with NaOH provided greater degradation of soluble proteins and degradation of dry matter, favoring the provision of non-protein nitrogen, while its application on an industrial scale is in the dependence of studies on operational feasibility and cost.*

Keywords: biodiesel, ruminal degradation, calcium hydroxide, sodium hydroxide, sheep

### INTRODUÇÃO

Após a extração do óleo, o mais tradicional e importante subproduto da mamona é a torta, com características fibrosas, porém altamente proteica.

Em sua grande maioria, a torta de mamona é utilizada como fertilizante orgânico na adubação de solos, podendo ainda ser empregada como matéria-prima para a produção de aminoácidos, plásticos, em especial os biodegradáveis, colas,

Recebido em 10 de abril de 2019

Aceito em 7 de abril de 2020

E-mail: ricardo\_zoo@hotmail.com

inseticidas, entre outros produtos (Severino *et al.*, 2012). Devido ao alto teor de proteínas, a torta de mamona tem se mostrado atrativa à demanda por alimentos na nutrição animal. Porém, a principal barreira em sua utilização está relacionada a fatores antinutricionais, como *Ricinus communis* aglutinina II (RCA II ou ricina), ricinina e *Ricinus communis* aglutinina I (RCA I) (Dang e Van Damme, 2015).

Os resultados de destoxificação, apesar de parecerem satisfatórios, como observado por Diniz *et al.* (2011), precisam de métodos mais eficientes para identificar a presença da ricina. Dessa forma, devido à necessidade de disponibilizar fontes seguras de proteína alternativas para a alimentação animal, é indispensável a obtenção de um método que neutralize a ricina e possibilite a utilização da torta de mamona na nutrição animal, de forma economicamente viável.

Nos trabalhos como os de Kim *et al.* (2006) e Anandan *et al.* (2005), foram utilizados equipamentos caros, como máquinas extrusoras e autoclaves, que, em alguns casos, comprometem a viabilidade do sistema de produção. Recentemente, Borja *et al.* (2017) desenvolveram um processo de destoxificação misto, no qual o farelo de mamona passa por interações entre o tempo de autoclavagem e a quantidade de CaO. Os autores observaram que é possível reduzir o nível de CaO para 10g/kg quando associado ao tempo de autoclavagem de 30 minutos, culminando na destoxificação total do farelo de mamona. Por outro lado, Andrade *et al.* (2019) observaram que o uso de NaOH e CaO se mostraram promissores produtos químicos para degradação e inativação completa das lectinas presentes na torta de mamona. Porém, uma elevada quantidade de água foi utilizada no processo.

Nesse contexto, torna-se importante adotar tratamentos de destoxificação desse subproduto, objetivando permitir o seu uso na alimentação animal, como fonte proteica concentrada, a fim de substituir o farelo de soja na ração concentrada e agregar valor à torta de mamona (Araújo *et al.*, 2019a, 2019b). Desse modo, objetivou-se com esta pesquisa avaliar um processo de destoxificação de forma simples e eficaz da torta de mamona, permitindo, assim, o seu uso na alimentação animal. Aliado a essa premissa,

pretendeu-se avaliar o efeito dos diferentes tratamentos químicos sobre os parâmetros nutricionais desse subproduto.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Centro Tecnológico de Produção de Leite de Cabra da Embrapa Caprinos e Ovinos (3°44'57,42" sul e 40°20'43,50" oeste), na cidade de Sobral-CE, Brasil, no período compreendido entre janeiro e junho de 2015. A torta de mamona foi obtida na Indústria e Comércio de Óleos Vegetais Ltda. – Olveq, localizada no município de Quixadá-CE, a partir da extração mecânica (prensagem) do óleo presente na semente de mamona, utilizando-se temperaturas entre 90 e 100°C. O armazenamento foi realizado em sacos de rafia de polipropileno, sobre estrado de madeira, em galpão fechado, até o processo de destoxificação.

Foi avaliada a eficácia do uso de dois produtos químicos, hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) e hidróxido de sódio (NaOH), na destoxificação das lectinas da torta de mamona. Inicialmente, adicionaram-se à torta de mamona 60 e 90g de ambos os reagentes, em diferentes concentrações de água (1.000; 1.500; 2.000 e 2.500mL de água/kg de torta de mamona), sendo a mistura homogeneizada a cada 30 minutos, durante o período de oito horas. Após esse período, o material foi deixado em repouso *over night*. Em seguida, a mistura foi transferida para secar ao ar livre sobre lonas plásticas e foi mantida sob incidência de luz solar direta, até completa secagem, momento em que foi moída e acondicionada à temperatura ambiente. Após identificados os dois melhores reagentes nessas proporções estudadas, por meio das análises dos perfis eletroforéticos, densitometria e ensaios de hemaglutinação, o material foi avaliado em diferentes tempos de contato com os reagentes, logo amostras foram coletadas ao longo do tempo (uma; duas; três; quatro; cinco; seis; sete e 24 horas).

Para a obtenção das proteínas solúveis da torta de mamona submetida aos diferentes tratamentos, entre elas a ricina e a *Ricinus* aglutinina, procedeu-se a uma diluição da torta de mamona finamente moída, com solução de NaCl 0,15 M, na proporção de 1/10 (p/v). O material foi mantido em agitação durante o período de uma hora, centrifugado a 10000g a 4°C, por 30 minutos, e o

sobrenadante filtrado com lã de vidro, obtendo-se o extrato proteico. Uma alíquota de 10mL desse material foi congelada e liofilizada.

A SDS-PAGE foi realizada mediante géis de poliacrilamida com concentração de 4,9% em 125mM de tampão Tris-HCl, pH 6,8 e com géis de separação com 15,4% de poliacrilamida em 380mM de tampão Tris-HCl, pH 8,8, contendo 0,1% de SDS (Laemmli e Favre, 1973). As amostras liofilizadas (8mg/mL) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl, pH 6,8, na presença de 0,1% de SDS e 5% de 2-mercaptoetanol. Em seguida, foram aquecidas a 100°C, por três minutos, e volumes de 50µL foram depositados nos géis. A eletroforese foi realizada a 4°C, durante 150 minutos, a 500V, 60mA e 30W. Os padrões de massa molecular (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) foram miosina (200,0kDa), β-galactosidase (116,2kDa), fosforilase b (97,4kDa), albumina sérica bovina (66,2kDa), ovalbumina (45,0kDa), anidrase carbônica (31,0kDa), inibidor de tripsina (21,5kDa), lisozima (14,5kDa, mas com massa molecular aparente de 15,5kDa), e aprotinina (6,5kDa). Após a corrida, as proteínas foram coradas com 0,1% de azul de *Coomassie* R250, dissolvido em uma mistura de 50% de etanol e 2% de TCA, durante 120 minutos. A descoloração foi realizada com uma solução a 30% de etanol e 7,5% de ácido acético.

Analisaram-se os géis de eletroforese corados com o azul de *Coomassie*, por meio do *software* ImageJ (National Institutes of Health, USA). Foram mensuradas as áreas dos picos relativos às lectinas citotóxicas (ricina e *Ricinus* aglutinina) das tortas de mamona tratadas com os diferentes reagentes, as quais foram comparadas às áreas dos picos das lectinas obtidos nos perfis proteicos das tortas de mamona que não passaram por tratamento químico. A estimativa de destoxificação foi calculada dividindo-se as áreas dos picos das lectinas obtidas nas tortas tratadas pelas áreas das lectinas obtidas nas tortas não tratadas, multiplicando-se por 100, para obter os resultados em porcentagem.

Bioensaios foram desenvolvidos utilizando-se soluções contendo hemácias de coelho, seguindo metodologia adaptada de Lynn e Clevette-Radford (1986). Amostras dos extratos proteicos obtidos dos diferentes tratamentos químicos e da torta sem tratamento químico foram dialisadas em

membranas de celulose com porosidade de 12kDa, durante o período de 24 horas, na proporção de 1mL do extrato proteico para 50mL da solução de diálise. Procederam-se inicialmente a duas lavagens com água ultrapura, com intervalos de 10 horas (totalizando 20 horas) e uma lavagem com NaCl 0,15 M (durante quatro horas); em seguida, as amostras foram congeladas a -20°C para posteriores análises. Para realização das análises da presença de lectinas, utilizaram-se placas de microtitulação, onde se adicionaram a cada poço 50µL de solução contendo o extrato proteico. Como controle positivo (esperava-se hemaglutinar), foram utilizados 50µL dos extratos proteicos provenientes da torta de mamona sem tratamento químico, obtidos seguindo a mesma metodologia do material que passou por tratamento químico. Como controle negativo (esperava-se não hemaglutinar), utilizaram-se 50µL NaCl 0,15 M.

A diluição seriada foi realizada com 50µL dos extratos proteicos. Após realizada a diluição seriada, adicionaram-se em cada poço 50µL de solução de hemácias a 2% em solução salina 0,15 M. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, durante uma hora. Após esse período, realizou-se a leitura a olho nu, considerando-se positivas as amostras que apresentaram aglutinação das hemácias, expressas em UH/mL, as quais são obtidas por meio da metodologia adaptada de Lynn e Clevette-Radford (1986). Para confirmar a degradação das lectinas, amostras negativas foram dialisadas outra vez, utilizando-se 1mL dos extratos proteicos, sendo realizadas três trocas de 50mL de água ultrapura, durante 24 horas, à temperatura ambiente. Após diálise, as amostras foram congeladas e liofilizadas. O material liofilizado foi diluído em 100µL de solução salina (NaCl 0,15 M) e submetido a novo bioensaio, nas mesmas condições anteriores.

A degradabilidade ruminal da MS das TMD e suas respectivas taxas de degradação foram estimadas pela técnica *in situ*. Sacos de náilon (ANKOM-BAR DIAMOND, INC., Parma Idaho – USA) foram utilizados para incubação ruminal. As dimensões dos sacos foram de 10 x 20cm, com diâmetro de poros de 53 micra. Aproximadamente cinco gramas de amostras, moídas a 2mm, foram acondicionadas em cada saco, fechado e atado com elástico de borracha. Os sacos foram presos a uma barra cilíndrica de ferro (400g) suspensa

por um fio de náilon de 50cm de comprimento, amarrado à tampa da cânula de um ovino mestiço com peso corporal de aproximadamente 50kg, procedimento esse sugerido por Tomich e Sampaio (2004), em que apenas um animal é suficiente para realizar ensaios com incubação ruminal. O animal foi mantido confinado, recebendo feno de capim-tifton 85 e concentrado à base de milho e farelo de soja.

Os tempos de incubação empregados tiveram a duração de zero, seis, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Os sacos foram incubados todos numa mesma hora, sendo retirados nos tempos determinados. Após a remoção, foram lavados em água corrente, congelados e posteriormente lavados em máquina de lavar, em cinco ciclos de um minuto cada. Os sacos do tempo zero hora também foram lavados em máquina de lavar, em cinco ciclos de um minuto cada. Após serem lavados, os sacos foram submetidos à secagem em estufa de ventilação forçada, a 55°C, por 72 horas. A porcentagem de desaparecimento da MS, por tempo de incubação, foi calculada pela proporção de alimento que restou nos sacos após a incubação ruminal.

A degradabilidade efetiva da MS foi calculada por meio da equação descrita por Orskov e McDonald (1979), em que:  $\text{degradabilidade efetiva} = \alpha + \beta c / (c + k)$ , sendo:  $k$  = taxa estimada da passagem de sólidos no rúmen, em que  $\alpha$  = porção prontamente degradável no rúmen;  $\beta$  = fração insolúvel, mas potencialmente degradável;  $c$  = taxa constante de degradabilidade da fração  $\beta$ .

Para o ensaio de fracionamento de proteína, utilizou-se um delineamento inteiramente ao acaso, com três tratamentos (torta de mamona bruta, torta de mamona destoxificada por hidróxido de cálcio e torta de mamona destoxificada por hidróxido de sódio), com cinco repetições por tratamento. Para determinação do fracionamento da proteína, a fração A (NNP) foi determinada pela diferença entre o nitrogênio total e o nitrogênio insolúvel em ácido tricloroacético (TCA), os quais foram obtidos por meio do tratamento de aproximadamente 500mg da amostra com 50mL de água destilada, permanecendo ali por 30 minutos, ao qual, posteriormente, foram adicionados 10mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%, por 30 minutos.

O resíduo remanescente foi filtrado em papel-filtro (Whatman, nº 54), lavado com água, e,

então, determinou-se o nitrogênio residual. O nitrogênio insolúvel total foi determinado mediante tratamento de 500mg da amostra com tampão borato-fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  a  $12,2\text{g L}^{-1}$  +  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  a  $8,91\text{g L}^{-1}$  +  $100\text{mL.L}^{-1}$  de álcool butílico terciário) durante três horas, sendo determinado o nitrogênio residual. Pela diferença entre o nitrogênio total e o nitrogênio insolúvel total, foi obtido o nitrogênio solúvel total (NNP + proteína solúvel), do qual foi descontada a fração A para obtenção da fração B1.

A fração B3 foi calculada pela diferença entre o nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e o nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), os quais foram determinados por meio da fervura de 500mg da amostra com solução detergente neutra e ácida durante uma hora, respectivamente, sendo os resíduos também analisados para nitrogênio. A fração C foi considerada como sendo o nitrogênio insolúvel em detergente ácido, e a fração B2 foi determinada pela diferença entre o nitrogênio total e as frações A, B1, B3 e C (Licitra *et al.*, 1996).

Tanto na TMB quanto nas TMD foram determinados os teores de matéria seca (método nº 934.01), matéria orgânica (método nº 942.05), proteína bruta (método nº 954.01), extrato etéreo (método nº 920.39) de acordo com a AOAC (Official..., 2006). Para as análises de fibra em detergente neutro (FDN), as amostras foram tratadas com alfa-amilase termoestável, sem o uso de sulfito de sódio e corrigidas para cinzas residuais (Mertens, 2002). Assim como o ensaio de fracionamento, as análises químicas foram avaliadas utilizando-se um delineamento inteiramente ao acaso, com três tratamentos (torta de mamona bruta, torta de mamona destoxificada por hidróxido de cálcio e torta de mamona destoxificada por hidróxido de sódio), porém com quatro repetições por tratamento.

Inicialmente os dados de fracionamento da proteína e os da composição químico-bromatológica foram submetidos a testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homocedasticidade (Levene), e, atendidas as pressuposições, foram submetidos à análise de variância pelo teste F. As análises foram realizadas pelo seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu_i + \alpha_j + e_{ij}$$

em que:  $Y_{ijk}$  é a variável dependente correspondente à observação experimental;  $\mu$  é a média geral;  $\alpha_i$  é o efeito fixo das soluções alcalinas; e  $\epsilon_{ij}$  é o erro aleatório, assumindo uma distribuição normal. Para se avaliar o efeito das soluções alcalinas, procedeu-se à comparação de médias pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o procedimento GLM do programa computacional SAS, versão 9.4 (Statistical..., 2005).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar, no perfil eletroforético da torta de mamona diluída em 60 gramas de  $\text{Ca(OH)}_2$ , independentemente da quantidade de água, a maior intensidade das bandas de lectinas citotóxicas, localizadas na faixa de massa molecular próxima ao padrão molecular: PM: 31,0kDa, mostrando, assim, a presença da ricina, o que interfere na toxidez desses materiais (Fig. 1). O mesmo resultado pode ser observado na torta de mamona tratada com 90 gramas de  $\text{Ca(OH)}_2$  e adicionada de água na quantidade de até 1.500mL/kg de torta. Contudo, a partir da adição de 2.000mL de água por quilo de torta, pode-se verificar menor intensidade das bandas de lectinas citotóxicas, localizadas na faixa da massa molecular próxima ao padrão molecular.

A visualização de bandas de proteínas na região inerente às lectinas caracteriza uma possível presença dessas proteínas citotóxicas, sendo necessárias análises de atividade biológica, por meio de ligações a carboidratos. Portanto, ensaios de hemaglutinação com hemácias de coelho foram utilizados para avaliar a presença de atividade das *Ricinus communis* aglutininas. Pode-se observar que o uso da água potencializa a ação do  $\text{Ca(OH)}_2$ , haja vista que a utilização de um litro de água proporcionou a redução de 20UH/mL, e, à medida que o teor de água aumentou, a atividade hemaglutinante reduziu, não havendo a presença de atividade hemaglutinante com as maiores diluições (Fig. 2). Dessa forma, pode-se verificar que a diluição da TMB com 90 gramas de

$\text{Ca(OH)}_2$ , diluída tanto em 2.000mL quanto em 2.500mL de água, proporciona a destoxificação de 100% da TMB, acarretando a redução total da atividade hemaglutinante. Assim, não havendo capacidade de as lectinas se ligarem a carboidrato na membrana das células, a função citotóxica das lectinas tóxicas da torta de mamona torna-se ineficaz em células eucariontes (Olsnes e Kozlov, 2001).

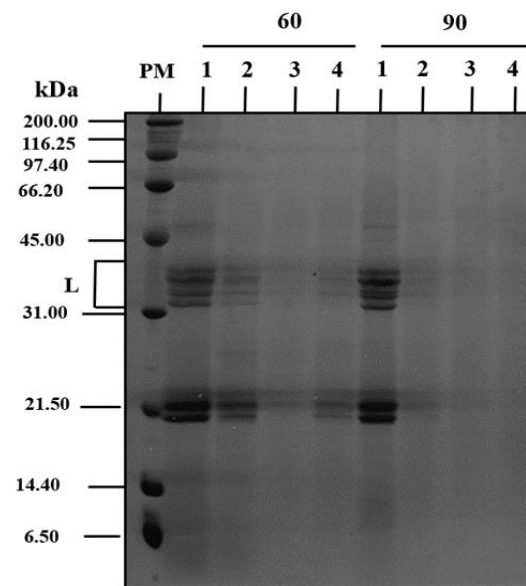


Figura 1. Caracterização eletroforética das proteínas da torta da mamona tratada com hidróxido de cálcio [ $\text{Ca(OH)}_2$ ] em diferentes concentrações (60 e 90g/kg de torta) e níveis de água (1: 1000mL/kg de torta, 2: 1500mL/kg de torta, 3: 2000mL/kg de torta, 4: 2500mL/kg de torta), PM: marcador de massa molecular (kDa), L: lectinas.

Em relação ao uso do NaOH como agente destoxicante da TMD, pode-se observar que, ao contrário do  $\text{Ca(OH)}_2$ , o uso de somente 60 gramas desse reagente mostrou-se bem eficiente na redução da lectinas citotóxicas (Fig. 3). Observou-se também que apenas 1.500mL de água proporcionou grande redução das bandas de lectinas.

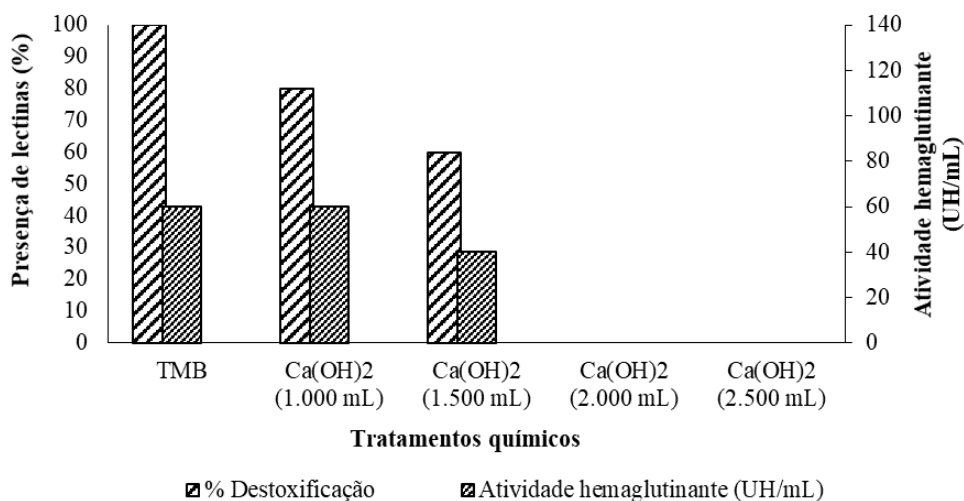


Figura 2. Presença de lectinas citotóxicas (%) e atividades hemaglutinantes (UH/mL) na torta de mamona tratada com 90 gramas de hidróxido de cálcio [Ca(OH)<sub>2</sub>], em diferentes concentrações de água, obtidas por meio da quantificação das lectinas por densitometria dos géis de eletroforese e ensaio de hemaglutinação com hemácias de coelho.

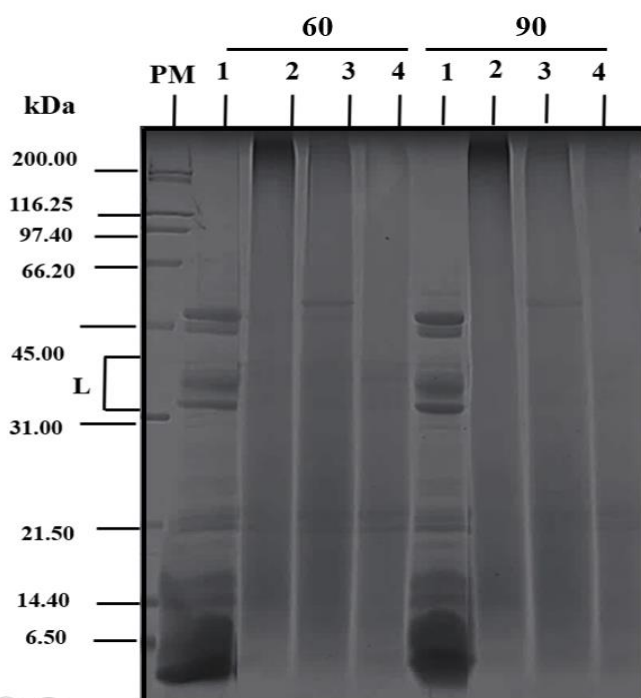


Figura 3. Caracterização eletroforética das proteínas da torta da mamona tratada com hidróxido de sódio (NaOH) em diferentes concentrações (60 e 90g/kg de torta) e níveis de água (1: 1000mL/kg de torta, 2: 500mL/kg de torta, 3: 2000mL/kg de torta, 4: 2500mL/kg de torta), PM: marcador de massa molecular (kDa), L: lectinas.

A quantificação da degradação total das lectinas, pela densitometria dos géis de eletroforese com o uso da TMD pelo NaOH, é mostrada na Fig. 4. Observa-se uma eficiência de 20% de degradação

no tratamento com a menor quantidade de água. É interessante verificar que, apesar de a adição de 1.500mL de água diminuir em 97% a presença das lectinas citotóxicas, a atividade hemaglutinante

ainda está presente nesse material (30UH/mL). Desse modo, pode-se inferir de forma direta que somente as concentrações com 2.000 e 2.500mL de água são eficazes na destoxificação da torta de

mamona, haja vista que, além de a atividade hemaglutinante estar ausente, a presença das lectinas diminuiu em 100%.

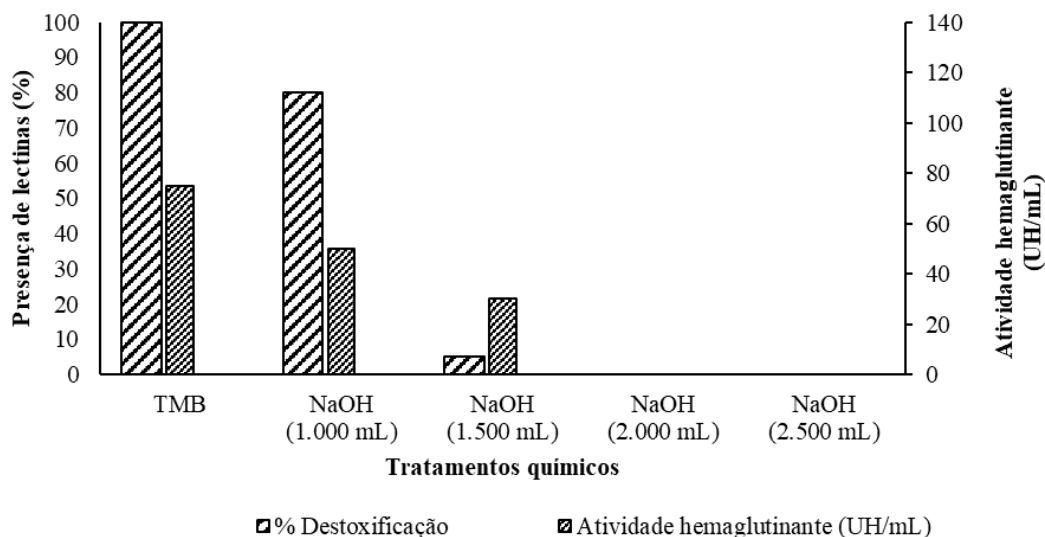


Figura 4. Presença de lectinas citotóxicas (%) e atividades hemaglutinantes (UH/mL) na torta de mamona tratada com 60 gramas de hidróxido de sódio (NaOH), em diferentes concentrações de água, obtidas por meio da quantificação das lectinas por densitometria dos géis de eletroforese e ensaio de hemaglutinação com hemácias de coelho.

Apesar dos resultados positivos com 90g de Ca(OH)<sub>2</sub> e 60g de NaOH diluídos em 2.000mL de água/kg de TMB, em que fica evidente que o material deve estar bem hidratado para facilitar a penetração dos produtos alcalinos na estrutura celular da torta, possibilitando a sua atuação mais completa no processo de hidrólise da ricina, ainda restava testar a hipótese de que um menor tempo de contato poderia ser utilizado para a destoxificação, haja vista que todas as análises, até então, consistiam de material coletado após 24 horas de contato. Assim, outro ensaio (Fig. 5) foi realizado para avaliar os tempos de contato das soluções com a TMB. Para tanto, foram coletadas amostras às uma; duas; três; quatro; cinco; seis; sete e 24 horas após a mistura.

Como demonstra a Fig. 5, ainda é perceptível a presença das duas cadeias que compõem a ricina no tratamento com Ca(OH)<sub>2</sub> após uma hora de contato. Pode-se verificar um efeito do tempo,

ocorrendo uma ligeira redução no tamanho das bandas das lectinas, a partir do momento em que esse material fica mais tempo exposto a ambos os reagentes alcalinos. Em relação ao efeito do NaOH, pode-se observar que as bandas desapareceram de forma significativa logo após uma hora de contato com o material.

Os resultados da densitometria de ambos os géis são mostrados na Fig. 6. Percebe-se que, após três horas de contato, os produtos alcalinos já hidrolisaram as lectinas presentes na TMB. Verifica-se também que, nos processos de destoxificação em que se utilizou o hidróxido de sódio, ocorreu uma elevada degradação das lectinas citotóxicas tratadas com essa matéria-prima, havendo a existência apenas de pequenos resquícios de proteínas na área dos géis relativas a elas, com uma intensidade menor quando comparadas às obtidas com o hidróxido de cálcio.

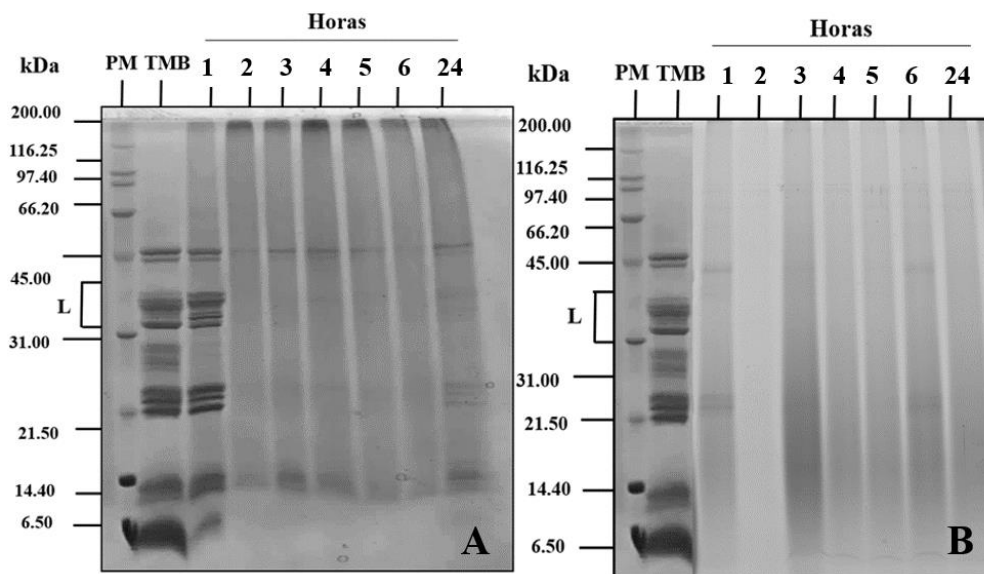


Figura 5. Caracterização eletroforética das lectinas citotóxicas presentes na torta de mamona tratada com hidróxido de cálcio (A) e hidróxido de sódio (B) em diferentes coletas no tempo (horas). PM: marcador de massa molecular (kDa); L: lectinas.

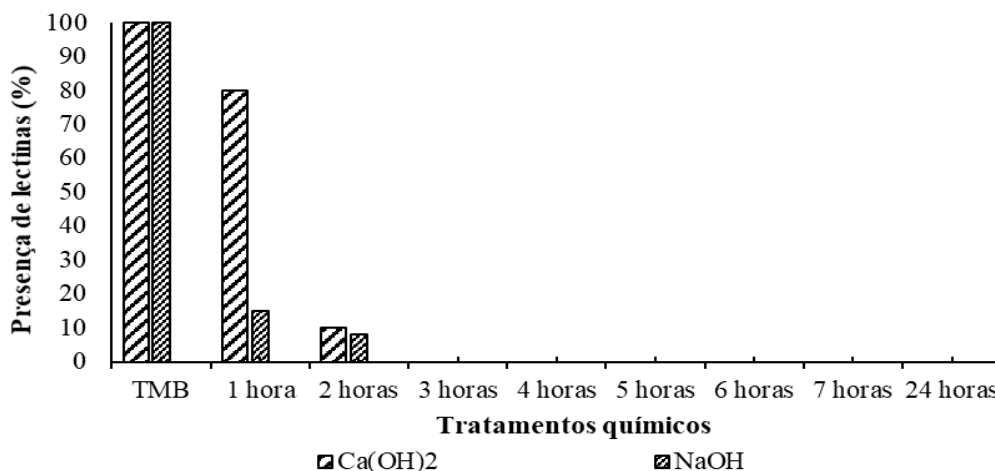


Figura 6. Presença das lectinas citotóxicas na torta de mamona tratada com hidróxido de cálcio [Ca(OH)<sub>2</sub>] e hidróxido de sódio (NaOH) nas proporções de 90 e 60g, respectivamente, para cada kg de torta diluída em 2.000mL de água, em diferentes coletas no tempo.

Os melhores resultados de destoxificação da torta de mamona apresentados pelos materiais alcalinos podem estar diretamente relacionados à natureza química deles, pois Anandan *et al.* (2005) relataram que a ricina é altamente susceptível a álcalis fortes. Apesar de determinados processos químicos não proporcionarem uma completa degradação das mesmas quando analisadas por eletroforese, as atividades biológicas foram afetadas, caracterizando a inativação delas, devido à desnaturação de sua estrutura tridimensional ocasionada pela sua exposição a

pH elevados. Em valores de pH extremos, ocorre elevada repulsão eletrostática intramolecular nas proteínas, causada principalmente pela elevada carga líquida na molécula, resultando, assim, em turgidez e desdobramento dela (Damodaran, 2006).

Os diferentes tratamentos alcalinos de destoxificação proporcionaram mudanças no perfil das diferentes frações nitrogenadas que compõem a proteína bruta dietética (Tab. 1). Observou-se efeito ( $P < 0,05$ ) das soluções



alcalinas sobre as frações A, B1 e C do perfil proteico das TMD. Houve aumento da fração A na TMD NaOH. Dessa maneira, pode-se inferir que o tratamento químico alcalino à base de NaOH proporciona maior degradação das proteínas solúveis e de degradação intermediária, favorecendo a disponibilização do NNP. Por outro lado, percebe-se também que os tratamentos alcalinos impostos à torta de mamona, em contrapartida, acarretam redução nos teores da

fração indisponível (C), o que representa uma proteína que não será aproveitada pelo animal, sendo maior na TMB. Dessa forma, pode-se dizer que a fração C corresponde às proteínas associadas à lignina, aos complexos tanino-proteína e aos produtos oriundos da reação de Maillard, é altamente resistente às enzimas microbianas e indigestível ao longo do trato gastrointestinal (Licitra *et al.*, 1996).

Tabela 1. Fracionamento da proteína bruta de diferentes tortas de mamona tratadas com soluções químicas alcalinas

Frações (% PB total)	Tortas			EPM <sup>1</sup>	P-valor
	TMB	TMD Ca(OH) <sub>2</sub>	TMD NaOH		
Fração A	21,30c	26,14b	29,00a	2,65	*
Fração B1	7,56a	5,87b	4,28b	0,98	*
Fração B2	54,15	52,67	53,45	3,65	0,564
Fração B3	0,89	0,96	1,25	0,06	0,768
Fração C	16,05a	14,36b	12,00c	0,17	*

<sup>1</sup> Erro-padrão da média. Médias seguidas de letras comuns, minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A fração solúvel ( $\alpha$ ) das tortas aumentou após o processo de destoxificação (Tab. 2). A TMD Ca(OH)<sub>2</sub> aumentou 10,06% da fração  $\alpha$ , já a TMD NaOH 22,53%. Esse resultado pode ser explicado pela redução no teor de fibra das tortas, proporcionando, assim, maior solubilidade da MS. Em relação à fração  $\beta$ , houve aumentos de 13,27 e 26,34%, na mesma ordem. A mesma

tendência foi observada para a taxa de degradação (c). As tortas apresentaram taxas de degradação abaixo do recomendado por Sampaio (1988), com exceção da TMD NaOH, para alimentos de boa qualidade, pois, quando se trabalha com alimentos de origem vegetal, esses apresentam taxa de degradação satisfatória entre 2 e 6% h<sup>-1</sup>.

Tabela 2. Parâmetros de degradação ruminal *in situ* ( $\alpha$ ,  $\beta$  e c) da MS e degradabilidade efetiva da MS nas taxas de passagem de 2, 5 e 8% h<sup>-1</sup> das tortas de mamona bruta e após a destoxificação

Torta	Parâmetros de degradação			A <sup>d</sup> (%)	R <sup>2</sup>	Degradação efetiva (%)		
	$\alpha$ (%)	$\beta$ (%)	c (% h <sup>-1</sup> )			2% h <sup>-1</sup>	5% h <sup>-1</sup>	8% h <sup>-1</sup>
TMB <sup>a</sup>	21,76	43,54	1,24	78,87	97,84	44,12	36,87	32,34
TMD <sup>b</sup>	23,95	49,32	1,63	82,27	97,72	45,09	37,44	33,13
TMD <sup>c</sup>	28,09	59,11	2,08	87,20	96,64	46,38	37,07	33,40

<sup>a</sup> Torta de mamona bruta.

<sup>b</sup> Torta de mamona destoxificada por hidróxido de cálcio.

<sup>c</sup> Torta de mamona destoxificada por hidróxido de sódio.

<sup>d</sup> Degradação potencial.

A degradabilidade efetiva (DE) aumentou após o processo de destoxificação. Esses aumentos se devem ao menor teor de fibra nas TMD por uma possível hidrólise alcalina durante o processo de destoxificação, pois os produtos alcalinos agem sobre a fração fibrosa da célula vegetal promovendo uma ruptura das pontes de hidrogênio, o que leva a uma expansão das moléculas de celulose, que se tornam mais

susceptíveis à ação das enzimas celulolíticas. A DE diminuiu à medida que aumentou a taxa de passagem; esse resultado é devido ao menor tempo em que o alimento permanece no rúmen, reduzindo, assim, o tempo em que os microrganismos ruminais possam atuar. Percebe-se um discreto aumento da degradabilidade da fração de MS da TMD NaOH quando comparada à TMD Ca(OH)<sub>2</sub> (Fig. 7).

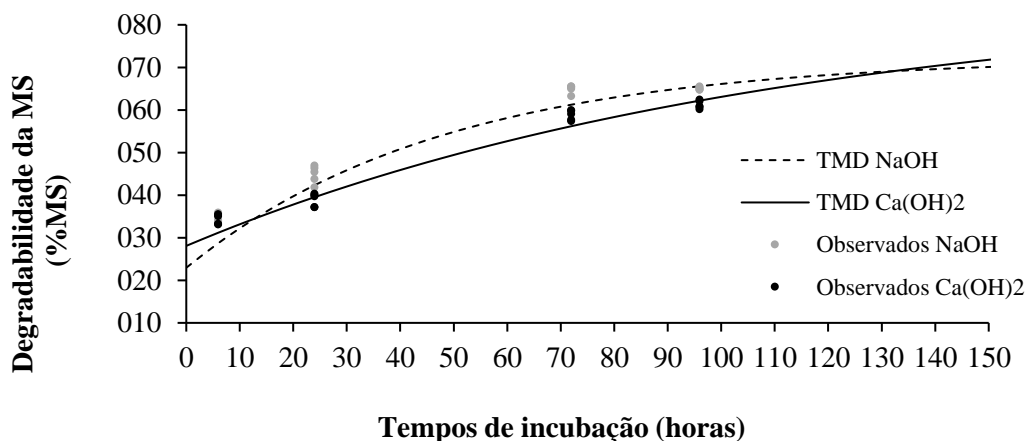


Figura 7. Degradabilidade da MS das tortas de mamona destoxificadas por hidróxido de cálcio [Ca(OH)<sub>2</sub>] e hidróxido de sódio (NaOH).

A maior degradação da MS da TMD NaOH, provavelmente, ocorreu devido à alta solubilidade do NaOH, pois essa base é formada por um metal alcalino, o que lhe confere maior solubilidade em água, dando-lhe maior contato com os carboidratos estruturais; já o Ca(OH)<sub>2</sub> é formado por um metal alcalinoterroso, o que o deixa menos solúvel. Vale ressaltar que o NaOH utilizado no processo de destoxificação apresentava pureza para análise (P.A.) de 98%, o que pode ter aumentado ainda mais seu poder de solubilização dos componentes fibrosos da torta de mamona, principalmente quando comparado aos NaOH comerciais que apresentam pureza de 50 a 73%. Com base nessas informações, percebe-se que a TMD NaOH apresenta maior potencial para utilização, pois melhora a qualidade do material tratado.

Contudo, outros fatores devem ser levados em consideração, pois o tratamento com hidróxido de sódio apresenta alguns inconvenientes, tais como: maior cuidado no manuseio; excesso de sódio na dieta, nas fezes e na urina; e problemas de contaminação ambiental. Esses incrementos na fração solúvel observados na TMD NaOH podem proporcionar um maior suprimento de compostos nitrogenados não proteicos para microrganismos que fermentam carboidratos estruturais e, conseqüentemente, incremento na disponibilidade proteica ao longo do trato gastrointestinal.

É interessante ressaltar que a torta de mamona bruta apresentou menor degradação da MS,

possivelmente pela qualidade da fibra presente na mamona. Apesar de não ter sido realizada análise de cutina neste experimento, Oliveira *et al.* (2010), que trabalharam com farelo de mamona na dieta de ovinos, encontraram um elevado teor de cutina na FDN do farelo de mamona. A cutina é a fração da lignina presente na epiderme dos tecidos das plantas, o que confere proteção superficial; com isso, apresenta-se como uma barreira ao ataque de microrganismos ruminais, reduzindo a degradação. A presença da cutina pode ser confirmada pela grande presença de casca de mamona na torta utilizada neste experimento (9,5%). O aumento no valor da degradabilidade da matéria seca na torta de mamona tratada com NaOH em comparação à TMD Ca(OH)<sub>2</sub> confirma a ideia da maior atuação dos agentes alcalinos na parede celular. Segundo Kategile *et al.* (1981), a solução aquosa de NaOH pode hidrolisar os constituintes da parede celular, melhorando, assim, o valor nutritivo de alimentos de baixa qualidade.

Houve efeito ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos químicos sobre os teores de MO, mM, EE e FDN (Tab. 3). Observou-se que o teor de MO de ambas as TMD foi menor do que o das TMB devido, provavelmente, ao aumento na quantidade de matéria mineral (MM) provocado pelos agentes alcalinos nas TMD. O aumento na mM pode ser explicado pela formação de sais de cálcio e sódio. O sódio do NaOH pode se unir a íons provenientes da própria TMB ou da água adicionada e formar o cloreto de sódio. Como o NaCl possui ponto de

ebulição de 1465°C (Lide, 2007), a sua presença na TMD faz com que a mM desse subproduto seja maior; além disso, a metodologia utilizada para a

quantificação da mM foi descrita pela AOAC (Official..., 2003), cuja temperatura máxima da mufla atinge 600°C.

Tabela 3. Composição químico-bromatológica da torta de mamona bruta (TMB) e após a destoxificação (TMD) por diferentes produtos alcalinos

Composição (g/kg de MS)	Tortas			EPM <sup>1</sup>	P-valor
	TMB	TMD Ca(OH) <sub>2</sub>	TMD NaOH		
MS (g/kg de MF)	89,05	90,42	90,48	8,76	0,765
MO	88,88a	86,77b	85,56b	7,76	*
MM	11,12b	13,23a	14,44a	1,09	*
PB	32,07	31,54	30,90	2,87	0,564
EE	6,27a	5,21b	4,75b	0,87	*
FDN	48,08a	45,34b	44,35b	3,25	*

<sup>1</sup> Erro-padrão da média. Médias seguidas de letras comuns, minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Observou-se redução do extrato etéreo após o processo de destoxificação. Possivelmente essa diminuição é atribuída ao efeito dos hidróxidos na saponificação da gordura. Percebe-se uma diminuição da fração fibrosa de ambas as TMD quando comparadas à TMB. Provavelmente a alta solubilidade do Ca(OH)<sub>2</sub> e do NaOH proporcionou maior solubilidade em água, o que ocasionou a hidrólise alcalina das frações fibrosas, tornando-as mais solúveis. A redução verificada nos teores de FDN pode ser atribuída ao efeito de ambos os reagentes alcalinos na desestruturação da parede celular, fato esse já bastante reportado na literatura, pois eles proporcionam desestruturação dos complexos ligno-celulósicos, o que promove a solubilização da hemicelulose (Al-Masri e Guenther, 1999) e a expansão da celulose, facilitando, assim, o ataque de microrganismos do rúmen à parede celular (Van Soest, 1994). Tal efeito possibilita o melhor aproveitamento dos nutrientes pelos animais, visto que grande parte do conteúdo celular pode estar ligado à parede celular e, conseqüentemente, menos disponível para a nutrição dos ruminantes.

### CONCLUSÃO

O uso de produtos químicos alcalinos como hidróxido de cálcio e hidróxido de sódio, nas concentrações de 90 e 60 gramas por quilo de torta de mamona bruta, ambos diluídos em 2.000mL de água, permite uma completa inativação das lectinas presentes na torta de mamona. Em relação ao tempo, recomenda-se que o material fique em contato por, no mínimo, três horas, podendo ser secado em seguida. Os tratamentos químicos influenciam diretamente no valor nutritivo e no

aproveitamento da proteína dietética das tortas de mamona destoxificadas, proporcionando alimentos com diferentes características nutricionais.

### AGRADECIMENTO

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

### REFERÊNCIAS

- AL-MASRI, M.R.; GUENTHER, K.D. Changes in digestibility and cell-wall constituents of some agricultural by-products and urea treatments. *Radiat. Physics Chem.*, v.55, p.324-329, 1999.
- ANANDAN, S.; ANIL KUMAR, G.K.; GHOSH, J.; RAMACHANDRA, K.S. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.120, p.10-12, 2005.
- ANDRADE, I.R.A.; CÂNDIDO, M.J.D.; POMPEU, R.C.F.F. *et al.* Inactivation of lectins from castor cake by alternative chemical compounds. *Toxicon*, v.160, p.47-54, 2019.
- ARAÚJO, R.A.; NEIVA, J.N.M.; ROGÉRIO, M.C.P. *et al.* Feeding behavior and physiological parameters of goats fed with detoxified castor cake at different stages of pregnancy. *Biol. Rhythm Res.*, v.1, p.1-13, 2019b.
- ARAÚJO, R.A.; NEIVA, J.N.M.; ROGÉRIO, M.C.P. *et al.* Ingestive behavior and physiological parameters of lactating goats fed diets containing detoxified castor cake. *Biol. Rhythm Res.*, v.50, p.1-11, 2019a.

- BORJA, M.S.; OLIVEIRA, R.L.; SILVA, T.M. *et al.* Effectiveness of calcium oxide and autoclaving for the detoxification of castor seed meal in finishing diets for lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* v.231, p.76-88, 2017.
- DAMODARAN, S. Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *J. of food Sci.* v. 70, p. 54-66, 2006.
- DANG, L.; VAN DAMME, E.J.S. Toxic proteins in plants. *Phytochemistry*, v.117, p.51-64, 2015.
- DINIZ, L.L.; VALADARES FILHOA, S.C.; OLIVEIRA, A.S. *et al.* Castor bean meal for cattle finishing: 1—Nutritional parameters. *Livest. Sci.*, v.135, p.153-167, 2011.
- KATEGILE, J.; URIO, N.A.; SUNDSTOL, F.; Mzihirwa, Y.G. Simplified method for alkali treatment of low-quality roughages for use by smallholders in developing countries. *Anim. Feed Sci. Technol.* v.6, p.133-143, 1981.
- KIM, S.K.; HANCOCK, D.K.; WANG, L.; COLE, K.D.; REDDY, P.T. Methods to characterize ricin for the development of referencematerials. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, v.111, p.313-324, 2006.
- LAEMMLI, U.K.; FAVRE, M. Aturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.*, v.80, p.575-599, 1973.
- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.57, p.347-358, 1996.
- LIDE, D.R. CRC handbook of chemistry and physics, Internet. Version 2007, 87.ed. Boca Raton: Taylor and Francis, 2007, 2388p.
- LYNN, K.R.; CLEVETTE-RADFORD, N.A. Lectins from latices of euphorbia and elaeophorbia species. *Phytochemistry*, v.25, p.1553-1557, 1986.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *J. AOAC Int.*, v.85, p.1217-1240, 2002.
- OFFICIAL methods of analysis. 17.ed. Gaithersburg: AOAC., 2003. 1094p.
- OLIVEIRA, A.S.; CAMPOS, J.M.S.; OLIVEIRA, M.R.C. *et al.* In vitro ruminal degradation of ricin and its effect on microbialgrowth. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.157, p.41-54, 2010.
- OLSNES, S.; KOZLOV, J.V. Ricin. *Toxicon*, v.39, p.1723-1728, 2001.
- ØRSKOV, E.R.; MCDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.*, v.92, p.499-503, 1979.
- SAMPAIO, I.B.M. *Experimental designs and modeling techniques in the study of roughage degradation in rumen andgrowth of ruminants.* 1988. 214f. Thesis (Doctorate in Zootechnics) - University of Reading, Reading, UK.
- SEVERINO, L.S.; AULD, D.L.; BALDANZI, M. *et al.* Review on the challenges for increased production of castor. *Agron. J.*, v.104, p.853-880, 2012.
- STATISTICAL analysis system. Version 9.4. Cary: SAS Institute, 2005.
- TOMICH, T.R.; SAMPAIO, I.B.M. A new strategy for the determination of forage degradability with an in situ technique through the use of one fistulated ruminant. *J. Agric. Sci.*, v.142, p.589-593, 2004.
- VAN SOEST, P.J. *Nutritional ecology of the ruminant.* 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994, p.476.