REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102012011460-7

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102012011460-7

(22) Data do Depósito: 15/05/2012

(43) Data da Publicação do Pedido: 15/04/2014

(51) Classificação Internacional: A23J 1/14; A23K 10/37; A23K 50/10.

(54) Título: PROCESSO PARA DESTOXIFICAÇÃO DE TORTAS E FARELOS DE OLEAGINOSAS PARA USO NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, EMPREGANDO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÍONS DE FERRO

(73) Titular: FAPEMIG - FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. CGC/CPF: 21949888000183. Endereço: Rua. Raul Pompéia, 101, 9° andar, São Pedro, Belo Horizonte, MG, BRASIL(BR), 30330-080; UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Endereço: Campos Universitário - Caixa Postal 37, Lavras, MG, BRASIL (BR), 37200-000

(72) Inventor: MÁRIO CÉSAR GUERREIRO; ALINE GOMES DIAS PINTO MONTEIRO; RAIMUNDO VICENTE DE SOUZA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 15/05/2012, observadas as condições legais

Expedida em: 14/05/2019

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

“PROCESSO PARA DESTOXIFICAÇÃO DE TORTAS E FARELOS DE OLEAGINOSAS PARA USO NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, EMPREGANDO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÍONS DE FERRO”

Observa-se atualmente a crescente procura pelo desenvolvimento de processos de detoxicação das tortas tóxicas oriundas da extração de óleo para a produção do biodiesel, além de outros produtos. Porém, o processo de produção do Biodiesel gera um grande volume de resíduos (torta, farelo e casca) que, com a expansão da cadeia produtiva, necessitará de uma destinação correta e preferencialmente sustentável, além de poderem constituir outras importantes fontes de renda.

A possibilidade de utilizar biomassas oriundas dos coprodutos agroindustriais para produzir novos materiais tem chamado à atenção de muitos pesquisadores e indústrias. Isso porque esses resíduos são matérias-primas renováveis, de baixo custo e sua utilização possibilita o aumento da renda do produtor sem aumentar o custo com a produção e área plantada. Desta forma, além de agregar valor a um resíduo, promove-se a redução do seu impacto ambiental (Nascimento et al, 2008).

Estudos têm mostrado que a torta de pinhão manso (*Jatropha curcas L*.) e de mamona (*Ricinnus communis*) são ricas em proteína bruta, no entanto não podem ser utilizadas diretamente na alimentação animal devido a presença de componentes altamente tóxicos, ésteres de forbol e ricina presentes nas respectivas tortas. Portanto, se tratados (detoxicados), esses coprodutos poderiam ser utilizados como complementos na alimentação de animais, funcionando como fonte de energia e protéica para os ruminantes, monogástricos e aves (Evangelista et al, 2007). A detoxicação das tortas se tornam extremamente importantes à medida que o Brasil ainda não é auto-suficiente na produção de ração animal e importa o produto de países vizinhos, como a Argentina (Yoshida et al 2010). As tortas detoxicadas se tornariam um alimento alternativo, de baixo custo e com alto valor nutricional.

Já existem diversos métodos para promover a detoxicação das tortas de pinhão manso e mamona, processos que utilizam agentes físicos e agentes químicos, porém, com etapas que envolvem a utilização alta de calor (fervura) e pressão (autoclave) (Rakshit et al, 2008; Aregheore et al, 2003).

Uma alternativa é a utilização dos processos Oxidativos Avançados (POA) que se baseiam na oxidação de compostos orgânicos complexos em moléculas de menor complexidade, podendo converter a matéria orgânica em CO_2 e H_2O. Esse processo ocorre através da geração do radical hidroxila (•OH), sendo este altamente oxidante e possui baixa seletividade, possibilitando a oxidação de inúmeros compostos orgânicos. A geração desses radicais é muito importante para a eficiência dos Processos Oxidativos Avançados. Quanto mais eficientemente estes radicais forem gerados, maior será o poder oxidativo (Maciel et al, 2004).

Muitos métodos já estão disponíveis para geração de radicais livres •OH. Utilizando oxidantes fortes (como O_3 e H_2O_2), com ou sem radiação ultravioleta (UV) e semicondutores (como TiO_2 e ZnO) (Munter, 2001).

A presente invenção se trata de um método que utiliza a reação de Fenton, que é baseada num sistema homogêneo utilizando H_2O_2, como o agente oxidante, na presença de íons de Ferro.

O reagente de Fenton, clássico, é uma mistura de H_2O_2 e íons Fe(II). O radical hidroxila gerado reage os compostos orgânicos presentes na solução. O ferro(II) atua como catalisador e a reação entre o peróxido é mais rápida quando comparado com o ferro(III). Porém, o ferro (III) é mais vantajoso para a reação, considerando que neste estado de oxidação o ferro é mais abundante (Goodel et al, 1997). A decomposição de peróxido por ferro(III) gera a espécie reduzida ferro(II), que também reage com o peróxido e o radical hidroperoxila. O íon Fe^{+3} também pode ser reduzido por esse radical, gerando OH.

A patente **US2011281017A1 (Methods for detoxifying oil seed crops)** descreve um método de detoxicação, ou seja, de extração de ésteres de forbol do núcleo da semente, utilizando vários solventes, como o acetato de etila e metanol, e posteriormente separando a mistura solvente/óleo resultante

a partir do núcleo tratado para deixar uma massa de semente substancialmente livre de ésteres de forbol.

Outra patente que pode ser citada é **WO2010092143A1 (Methods for detoxifying plants contituents)**, trata de um método para detoxicação de constituintes da planta de pinhão manso, um material isento de ésteres de forbol para a produção de alimento. Onde a detoxicação foi realizada com álcali (hidróxido de sódio) e álcool de cadeia curta (metanol), resultando na remoção de substâncias tóxicas ésteres de forbol.

Já a patente **JP2010209177A (Method for producing purified jatropha oil),** consiste em um método de detoxicação baseado na remoção dos ésteres de forbol através processo alcalino.

Na literatura científica são encontrados diversos trabalhos que descrevem diferentes processos de detoxicação. Aregheore e colaboradores **(Journal of the Science and Food Agriculture, v. 77, p. 349-352, 1998)** realizaram processos de detoxicação utilizando Calor úmido (121^{o}C por 30min) e metanol (95%); Hidróxido de sódio 4% e metanol (95%); Hidróxido de sódio 4% e água. Como todos os tratamentos apresentaram redução no teor de ésteres de forbol, foi realizado o teste *in vivo,* com a substituição da ração dos ratos pelas tortas detoxicadas em 16 %. Todos os animais perderam peso, porém o tratamento utilizando calor úmido e metanol foi o menos prejudicial. Este estudo mostrou que houve redução dos componentes tóxicos, mas o teste *in vivo,* comprovou a ineficiência do processo de detoxicação, além do alto custo que inviabilizou o processo.

Martinez-Herrera e colaboradores **(Food Chemistry, v. 96, p. 80-89, 2006),** utilizaram bicarbonato de sódio com aquecimento (121ºC) por 25min, o tratamento apresentou redução de 75% dos ésteres de forbol; Etanol 90% por 2 horas, onde a redução foi de 96%; Etanol (90%) por 2 horas seguida de Bicarbonato mais aquecimento (121ºC) por 25min, onde ocorreu a redução de 98% e por fim Bicarbonato de sódio com Irradiação gama, sendo este o tratamento menos eficiente com redução de apenas 17%. Apesar da redução ter sido bastante significativa o alto custo inviabilizou os tratamentos.

Em trabalhos mais recentes, Kumar e colaboradores **(Fish Physiology and Biochemistry, Vol. 36, N. 4, p. 1159-117, 2010)** realizaram o processo de detoxicação em diversas etapas, onde inicialmente a semente foi descascada, desengordurada com éter de petróleo em soxhlet, sofreu tratamento com diversos solventes e posteriormente autoclavagem 121ºC por 15 minutos. A parte *in vivo* deste experimento foi realizado utilizando carpas, substituindo de 38% da ração. Nenhum animal morreu e o crescimento das carpas foi tão eficiente quanto à raça a base de soja. Porém o processo por ter sido desenvolvido em varias etapas, também se tornou sua produção inviável economicamente.

Em adição, muitas das técnicas que foram desenvolvidas e que obtiveram sucesso no objetivo de detoxicação da torta, requerem processos de alto custo e/ou técnicas que necessitam de execução de várias etapas, demandando muito tempo em sua execução para remoção de ésteres de forbol.

As diferenciações importantes com relação às patentes citadas está na utilização de Ferro(II) ou Ferro(III) precursores de catalisadores homogêneos quando coordenados com PDC (ácido 2,6-piridinodicarboxílico) e H_2O_2 como agente oxidante. Sistema catalítico de fácil preparo (*in situ)* e de baixo custo.

Diante do exposto, a presente invenção tem por objetivo eliminar os problemas acima relatados.

O processo de detoxicação da torta de pinhão manso proposta na tecnologia aqui apresentada tem a inovadora metodologia de tornar um resíduo

tóxico em um potencial produto complementar para fabricação de ração destinado a animais ruminantes, através de processos oxidativos avançados, mais especificamente com reações do tipo Fenton. Utilizando os resíduos da extração de óleo para produção de biocombustíveis, reduzindo significativamente os passivos ambientais oriundos das usinas de biodiesel e agregando valor a cadeia produtiva do biodiesel a partir dessa oleaginosa. Além de contribuir para a redução da importação de ração, ofertando grandes quantidades a baixo custo. Esse movimento também tornaria possível a integração dos setores de biocombustível e agroindustrial.

O processo descrito na presente invenção consiste na modificação das moléculas de ésteres de forbol e de ricina, comumente encontradas nas tortas de pinhão manso e mamona, respectivamente, através de reação de Fenton com H_2O_2 e PDC (ácido 2,6-piridinodicarboxílico)/Nitrato de ferro (III); H_2O_2 e $FeSO_4.7H_2O$, produzindo radicais hidroxilas capazes de modificar drasticamente as moléculas dos ésteres e da proteína ricina, e consequentemente inativar suas ações tóxicas.

As diferenciações importantes com relação aos inventos existentes está na utilização de catalisador homogêneo e dos reagentes H_2O_2, PDC /Nitrato de ferro (III) e $FeSO_4.7H_2O$.

O processo de detoxicação proposto se baseia na aplicação de reações de oxidação tipo Fenton, com o intuito de reduzir ao máximo o teor de ésteres de forbol na torta de pinhão manso e o teor de ricina na torta de mamona.

É pesada 10 g de torta e colocada em um erlenmeyer, depois adicionado o catalisador, diluídos em água e por fim o peróxido de hidrogênio é adicionado aos poucos. São realizados dois tratamentos de detoxicação, no tratamento 1 (pinhão manso 1) utiliza-se 1000 µL de PDC ($0,01 mol.L^{-1}$), 1000 µL de nitrato de ferro (III) ($0,005 mol.L^{-1}$), 15 mL de H_2O e 10 mL de H_2O_2. No tratamento 2 (pinhão manso 2) utiliza-se somente 1000 µL de $FeSO_4.7H_2O$ ($0,005 mol.L^{-1}$), 15 mL de H_2O e 10 mL de H_2O_2 ($0,08 mol.L^{-1}$). O sistema reacional é mantido por 2 horas, sob agitação, em temperatura que pode variar entre 22-26ºC, o material é então lavado com água deionizada, para retirada

dos componentes tóxicos hidroxilados, e seco em estufa a 40 °C por 36 horas. Esse processo é realizado para cada uma das tortas.

.

As tortas são submetidas a análises de matéria seca, proteína, extrato etéreo e fibra bruta antes e depois da detoxicação para verificação da manutenção qualidade nutricional da torta após a detoxicação.

A determinação dos ésteres de forbol é realizada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, seguindo a metodologia desenvolvida por Makkar et al, 1997. Utiliza-se um detector DAD (280 nm), uma coluna de fase reversa C18 Shim-pack CLC-SIL 250X4,6 mm, com uma pré-coluna da mesma fase CLC-G-SIL 10X4,0 mm. São utilizados como fase móvel os solventes*:* (A) 1,75 mL ácido o-fosfórico (85%) em 1L de água destilada (filtrados), (B) Acetonitrila e (C) Tetrahidrofurano (para limpeza da coluna por 15 minutos). A composição da fase móvel varia em gradiente, onde inicialmente utiliza-se 60% do solvente (A) e 40% de (B), decrescendo para 50% de (A) e 50% de (B), nos próximos 10 minutos, posteriormente, para 25% de (A) e 75% de (B), nos próximos 30 minutos. Aumentando para 100% de (B), nos próximos 15 minutos. A vazão é de 1,3 mL/min, à temperatura ambiente e o comprimento de onda avaliado de 280 nm. É utilizado phorbol-12-myristate 13-acetate (sigma) como padrão externo.

Os picos cromatográficos referentes aos ésteres de forbol foram identificados por meio dos espectros de absorção no UV. De acordo com o cromatograma foi possível observar os 4 picos dos ésteres de forbol presentes no pinhão manso, confirmados pelo espectro de UV.

Comparando os espectros de UV da torta de pinhão Manso 2 e da torta sem tratamento não é possível observar 3 dos 4 ésteres de forbol presentes no pinhão manso antes da detoxicação. Ou seja, o processo de detoxicação modifica os ésteres de forbol degradando essas moléculas.

Os resultados mostram variação no teor deste componente tóxico entre as amostras analisadas e de acordo com o tratamento aplicado, onde a torta de

Pinhão Manso 1 apresenta maior teor de ésteres (0,28 mg/g) e a torta de Pinhão Manso 2 o menor (0,23 mg/g).

Segundo Martinez-Herrera (2006) e Makkar (1997), as tortas podem ser consideradas como não tóxicas quando estiver presentes uma concentração máxima de 0,5 mg/g de éster de Forbol . Diante disso, as duas tortas podem ser consideradas não tóxicas.

O processo de detoxicação das tortas ocorreu pela atuação do radical hidroxila (OH•) que pode atuar como eletrófilo ou nucleófilo atacando moléculas orgânicas pela abstração de hidrogênio ou atacando os carbonos de duplas ligações, hidroxilando-as, inclusive em posições substituídas causando reações do tipo desmetoxilação, desalquilação e descarboxilação (Aguiar et al, 2007). Partindo desse pressuposto, as moléculas dos ésteres de forbol podem ter sido atacadas em diversas posições de sua estrutura, principalmente nos carbonos contendo as duplas ligações, nos ciclopropil e no grupo carboalcoxil formando outros radicais, considerando estes os principais grupos funcionais passíveis de ataque. Contudo, é possível observar a reação de Fenton proporcionou a degradação dos ésteres.

A presença de ricina na torta de mamona, é conferida através da técnica de eletroforese capilar com dodecilsulfato de sódio em gel de poliacrilamida (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE).

A torta de mamona não tratada apresenta coloração azul muito intensa na região de 60-65 kDa indicando uma grande quantidade dessa proteína. A torta tratada (detoxicada) não apresenta coloração azul.

Com o teste de eletroforese é possível observar que o teor de ricina na amostra detoxicada pelo processo proposto neste projeto, é reduzido com o tratamento, quando comparada com a torta de mamona não tratada.

A molécula de ricina presente nas amostras tratadas não é totalmente degradada. Isso porque, através da eletroforese também é possível observar que a ligação de dissulfeto não é clivada, uma vez que as duas subunidades dessa proteína, a cadeia A e B não são identificadas na análise na região de 30 – 36 kDa.

Os resultados mostram que o tratamento proposto pode ser utilizado para a destruição total desta proteína.

As tortas detoxicadas são avaliadas quanto à matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo e fibra bruta comparando com resultados obtidos na torta sem tratamento para verificações da influência do tratamento na qualidade nutricional das mesmas.

Análises da composição nutricional da torta de pinhão manso tratada e não tratada revelaram valores de matéria seca (MS) variando de 92,54 a 92,56% para todos os tratamentos. Os valores de proteína bruta (PB) para o pinhão manso 1, pinhão manso 2 e a torta sem tratamento são de 8,94%, 16,19% e 21,00%, respectivamente. O extrato etéreo (EE) é de 11,05% para pinhão manso 1, 7,90% para pinhão manso 2 e 17,96% para a torta sem tratamento. A fibra bruta (FB) apresenta valores de 29,41%, 26,27% e 20,31% para pinhão manso 1, pinhão manso 2 e a torta sem tratamento, respectivamente.

Já as análises da torta de mamona tratada e não tratada revelaram valores de matéria seca (MS) variando de 91,70 a 93,06% para os tratamentos. Os valores de proteína bruta (PB) para a torta de mamona tratada e a sem tratamento foram de 19,63% e 22,44%, respectivamente. O extrato etéreo (EE) é de 2,95% para a torta tratada e 6,04% para a sem tratamento. A fibra bruta (FB) apresenta valores de 18,06% e 9,43% para a torta de mamona tratada e a torta sem tratamento, respectivamente.

A concentração de matéria seca das tortas indica um teor muito baixo de umidade em seu conteúdo e, com isso não haveria a necessidade de submeter à torta por algum processo de secagem após a extração do óleo. Segundo Valadares et al., 2002 e Park, 1997 analisando as tortas de algodão, girassol e soja, constataram que estas possuem em média 90% de MS. Os valores obtidos são próximos aos de outras tortas de diferentes oleaginosas.

Segundo Church, 1988 e Jardim, 1976, a quantidade mínima de proteína indicada para a dieta de animais ruminantes é de 7%, uma vez que esta

quantidade está associada a uma melhor fermentação microbiana no rúmen dos animais.

O conteúdo protéico das tortas de pinhão manso e mamona sem tratamento são relativamente altos, já as tortas tratadas apresentam teores mais baixos após terem recebido os respectivos tratamentos, porém, essas quantidades ainda sugerem sua utilização como fonte de proteína para os animais, uma vez que a quantidade sugerida em rações para ruminante é de 7%.

O teor de gordura (EE) também varia com os tratamentos de detoxicação aplicados em relação ao material sem tratamento o que pode ser um benefício para os ruminantes, considerando que a inclusão de grande quantidade de óleo na ração pode diminuir a conservação da mesma (Grainger, 2008).

A FB é a porção da matéria seca insolúvel em ácidos e álcali. Possui em sua constituição principalmente celulose, hemicelulose e lignina, todos considerados carboidratos de difícil digestão. A fibra bruta para ruminantes é considerada fonte de energia tendo como produtos finais ácidos graxos e gases.

O teor de fibra bruta para ambas as tortas não tratadas é relativamente baixo (aproximadamente 20%). Já as tortas tratadas, apesar de terem apresentado um teor mais elevado, podem ser utilizadas na alimentação animal considerando esse elemento nutricional.

Os resultados encontrados confirmam a eficiência do processo de detoxicação proposto, com redução de 85 a 95% dos ésteres de forbol presentes na torta de pinhão manso e de 100% da ricina presentes na torta de mamona. Mesmo tendo ocorrido à redução do teor de alguns componentes nutricionais, as tortas tratadas pelo processo proposto são promissoras na utilização na alimentação de ruminantes, principalmente como fonte protéica.

REIVINDICAÇÕES

1**. "PROCESSO PARA DESTOXIFICAÇÃO DE TORTAS E FARELOS DE OLEAGINOSAS PARA USO NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, EMPREGANDO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÍONS DE FERRO**" **caracterizado por** compreender

a) Para o primeiro processo de modificação de ésteres de forbol e de ricina, comumente encontradas nas tortas de pinhão manso e mamona, respectivamente, 10 g de torta foram colocadas um erlenmeyer, depois é adicionado o catalisador, uma combinação 1000 µL de PDC (ácido 2,6-piridinodicarboxílico) 0,01 $mol.L^{-1}$ e 1000 µL de nitrato de ferro (III) 0,005 $mol.L^{-1}$; em seguida a mistura é diluída em 15 mL de água, e por fim 10 mL de peróxido de hidrogênio 0,08$mol.L^{-1}$ é adicionado aos poucos;

b) Para o segundo tratamento empregou-se o mesmo procedimento descrito em a) modificando-se o catalisador, que trata-se de 1000 µL de $FeSO_4.7H_2O$ 0,005 $mol.L^{-1}$.

c) o sistema reacional, para os processos descritos em a) e b), é mantido por 2 h, sob agitação, em temperatura que pode variar entre 22-26ºC, após esse tempo o material é lavado com água deionizada, para retirada dos componentes tóxicos hidroxilados, e seco em estufa a 40 °C por 36 h.

2. "**PROCESSO PARA DESTOXIFICAÇÃO DE TORTAS E FARELOS DE OLEAGINOSAS PARA USO NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, EMPREGANDO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÍONS DE FERRO**" de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** utilização de resíduos da extração de óleo para produção de biocombustíveis a partir de oleaginosas como a mamona e o pinhão manso.