



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CAMPUS SOBRAL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**BÁRBARA JULIETE FREIRE PINTO**

**INATIVAÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA NA MAMONA (*Ricinus communis* L.)**  
**PROCESSADA INDUSTRIALMENTE APÓS TRATAMENTOS TÉRMICO E**  
**QUÍMICO**

**SOBRAL**

**2025**

BÁRBARA JULIETE FREIRE PINTO

INATIVAÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA NA MAMONA (*Ricinus communis* L.)  
PROCESSADA INDUSTRIALMENTE APÓS TRATAMENTOS TÉRMICO E QUÍMICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais e Sintéticos. Área temática: Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Hévila Oliveira Salles

Coorientadora: Profa. Dra. Lúcia Betânia da Silva Andrade

SOBRAL

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

P726i      Pinto, Bárbara Juliete Freire.

Inativação de inibidores de tripsina na mamona (*Ricinus communis* L.) processada industrialmente após tratamentos térmico e químico / Bárbara Juliete Freire Pinto. – 2025.

58 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, *Campus* de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2025.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientação: Profa. Dra. Hévila Oliveira Salles.

Coorientação: Profa. Dra. Lúcia Betânia da Silva Andrade.

1. Inibidor de tripsina. 2. Termorresistência. 3. Tratamento químico. 4. Torta de mamona. 5. Farelo de mamona. I. Título.

CDD 660.6

---

BÁRBARA JULIETE FREIRE PINTO

INATIVAÇÃO DE INIBIDOR DE TRIPSINA NA MAMONA (*Ricinus communis* L.)  
PROCESSADA INDUSTRIALMENTE APÓS TRATAMENTOS TÉRMICO E QUÍMICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais e Sintéticos. Área temática: Bioquímica.

Aprovada em: 26/02/2025.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Hévila Oliveira Salles (Orientadora)  
EMBRAPA Caprinos e Ovinos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Lúcia Betânia da Silva Andrade (Coorientadora)  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

---

Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Antônio Silvio do Egito  
EMBRAPA Caprinos e Ovinos

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Hévila Oliveira Salles, pela paciência e excelente orientação.

À Profa Dra. Lúcia Betânia da Silva Andrade, pela paciência e amabilidade.

Aos professores participantes da banca examinadora Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar e Prof. Dr. Antônio Silvio do Egito pelo tempo e valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica da Embrapa Caprinos e Ovinos por sempre estarem à disposição.

À minha família, por todo o apoio e incentivo.

O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro e manutenção da bolsa de auxílio fornecida pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP e com recurso do projeto universal financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 403721/2023-7.

## RESUMO

As sementes de mamona são detentoras de fatores antinutricionais e o processamento industrial para obtenção do óleo pode ou não inativar os inibidores de tripsina. A perda de atividade desses fatores aumentaria a segurança do resíduo gerado para indicação de uso na alimentação animal. O tamanho das partículas, a temperatura, o tempo de aquecimento, a pressão, a umidade do material e do ambiente, assim como o uso de compostos químicos podem contribuir para a eficiência dos protocolos de inativação de fatores antinutricionais de origem proteica. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo inativar os inibidores de tripsina presentes nas etapas do processamento industrial das sementes de mamona utilizando protocolos de tratamento térmico e químico e caracterizá-los parcialmente. Inicialmente, amostras das três últimas etapas do processamento industrial (ETAPA 3 (E3) torta de mamona, ETAPA 4 (E4) farelo de mamona com hexano, ETAPA 5 (E5) farelo de mamona dessolventizado) das sementes foram trituradas e obtidas farinhas com 0,5 mm de granulometria. Para o tratamento térmico das três últimas etapas, o calor úmido sob pressão (121°C, a 1,10 kg/cm<sup>2</sup>, por 20 min e 60 min) foi aplicado em amostras de farinhas secas ou previamente hidratadas com água na proporção de 1:1,5 (p/v). Para o tratamento químico foi adicionado CaO na proporção 1:0,09 (p/p) e água a 55°C na proporção 1:1,5 (p/v). Amostras da última etapa do processamento industrial foram também tratadas com calor seco (150°C, por 60, 120 e 180 min). Todas as farinhas, nas diferentes etapas de processamento industrial, tratadas ou não, foram submetidas à extração de proteínas utilizando água como solvente na proporção 1:3 (p/v). No tratamento químico, para retirar o CaO antes das extrações, as amostras foram dialisadas em membranas de 2 kDa e, posteriormente, o volume foi ajustado para a proporção de 1:10 (p/v). Após as diluições das farinhas, as extrações de proteínas foram semelhantes, ocorrendo sob agitação constante, por uma hora, a  $\pm$  25°C, seguida de centrifugação a 10.000 x g, por 30 min, a 4°C. As proteínas presentes nos extratos da última etapa do processamento industrial foram ainda fracionadas com o uso de membranas de 2 e 12 kDa e com sulfato de amônio nas faixas de 0-30%, 30-60% e 60-90%. Em todos os extratos e frações foi determinada a atividade específica de inibidor de tripsina (UI/mg de proteína). Apenas o tratamento químico com CaO foi capaz de inativar por completo os inibidores de tripsina do farelo de mamona. Através do fracionamento com sulfato de amônio, observou-se que na última etapa do processamento industrial há presença de mais de um inibidor de tripsina, ao observar atividade inibitória em todas as frações proteicas (0-30%; 30-60% e 60-90%). Em adição, esses inibidores são de baixa massa molecular, pois somente foi observada

atividade na fração entre 2 e 12 kDa. A alta resistência térmica dos inibidores de tripsina do farelo de mamona mostra um elevado potencial biotecnológico dessas moléculas, em relação às características de defesa vegetal, mas também, reforça a necessidade da adição do tratamento químico após o processamento industrial para tornar o farelo de mamona mais seguro para a alimentação animal, promovendo um reaproveitamento, agregando valor ao resíduo, ao mesmo tempo em que aponta para futuras pesquisas sobre a aplicação segura e eficiente na indústria alimentícia animal.

**Palavras-chave:** Inibidor de tripsina; Termorresistência; Tratamento químico; Torta de mamona; Farelo de mamona.

## ABSTRACT

Castor bean seeds contain antinutritional factors, and industrial processing to obtain the oil may or may not inactivate the trypsin inhibitors. The loss of activity of these factors would increase the safety of the residue generated for use in animal feed. Particle size, temperature, heating time, pressure, humidity of the material and the environment, as well as the use of chemical compounds may contribute to the efficiency of protocols for inactivating antinutritional factors of protein origin. In this context, the present study aimed to inactivate the trypsin inhibitors present in the industrial processing stages of castor bean seeds using thermal and chemical treatment protocols and to partially characterize them. Initially, samples from the last three stages of industrial processing (STEP 3 (E3) castor bean cake, STEP 4 (E4) castor bean meal with hexane, STEP 5 (E5) desolventized castor bean meal) of the seeds were crushed and flours with 0.5 mm particle size were obtained. For the heat treatment of the last three steps, moist heat under pressure ( $121^{\circ}\text{C}$ , at  $1.10\text{ kg/cm}^2$ , for 20 min and 60 min) was applied to samples of dry flours or flours previously hydrated with water in a ratio of 1:1.5 (w/v). For the chemical treatment, CaO was added in a ratio of 1:0.09 (w/w) and water at  $55^{\circ}\text{C}$  in a ratio of 1:1.5 (w/v). Samples from the last step of industrial processing were also treated with dry heat ( $150^{\circ}\text{C}$ , for 60, 120 and 180 min). All flours, in the different steps of industrial processing, treated or not, were subjected to protein extraction using water as solvent in a ratio of 1:3 (w/v). In the chemical treatment, to remove CaO before extraction, the samples were dialyzed in 2 kDa membranes and, subsequently, the volume was adjusted to a ratio of 1:10 (w/v). After diluting the flours, protein extractions were similar, occurring under constant agitation for one hour at  $\pm 25^{\circ}\text{C}$ , followed by centrifugation at  $10,000 \times g$  for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The proteins present in the extracts from the last stage of industrial processing were further fractionated using 2 and 12 kDa membranes and with ammonium sulfate in the ranges of 0-30%, 30-60% and 60-90%. The specific trypsin inhibitor activity (IU/mg of protein) was determined in all extracts and fractions. Only chemical treatment with CaO was able to completely inactivate the trypsin inhibitors in castor bean meal. Through fractionation with ammonium sulfate, it was observed that in the last stage of industrial processing there is the presence of more than one trypsin inhibitor, observing inhibitory activity in all protein fractions (0-30%; 30-60% and 60-90%). In addition, these inhibitors have low molecular weight, since activity was only observed in the fraction between 2 and 12 kDa. The high thermal resistance of the trypsin inhibitors from castor bean meal shows a high



biotechnological potential of these molecules, in relation to plant defense characteristics, but also reinforces the need for the addition of chemical treatment after industrial processing to make castor bean meal safer for animal feed, promoting reuse, adding value to the residue, while pointing to future research on safe and efficient application in the animal feed industry.

**Keywords:** Trypsin inhibitor; Thermal resistance; Chemical treatment; Castor bean cake; Castor bean meal.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Frutos da mamona (*Ricinus communis* L.)..... 15

**Figura 2** – Fluxograma do processamento industrial da semente da mamona..... 16

## ARTIGO

**Figura 1** – Atividade antitripsina específica (UI/mg) de extratos proteicos das três últimas etapas do processamento industrial sem (Controle) e com tratamento térmico sob pressão (TUP) por 20 e 60 min..... 35

**Figura 2** – Porcentagem (%) de atividade inibitória e concentração de proteína do extrato bruto e frações proteicas de farelo de mamona dessolventizado (Etapa 5) por fracionamento de membranas de diálise e fracionamento por precipitação com sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)..... 37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 –</b>	Albuminas 2S isoladas/purificadas da semente de mamona ( <i>R. communis</i> L.): massa molecular, ponto isoelétrico (pI), atividade bioquímica e atividade biológica.....	21
<b>Tabela 2 –</b>	Tratamentos realizados para inativação das proteínas tóxicas e antinutricionais da mamona ( <i>R. communis</i> L.).....	23

## ARTIGO

<b>Tabela 1 –</b>	Concentração de proteínas (mg/mL) e atividade antitripsina específica (UI/mg de proteína) nos extratos proteicos das três últimas etapas do processamento industrial das sementes de mamona, denominadas de controle etapa 3 (E3), etapa 4 (E4) e etapa 5 (E5).....	34
<b>Tabela 2 –</b>	Concentração de proteínas (mg/mL) e atividade antitripsina específica (UI/mg de proteína) nos extratos proteicos da última etapa do processamento industrial das sementes de mamona, etapa 5 (E5), após tratamento térmico seco (TS) a 150°C por 60, 120 e 180 minutos.....	36
<b>Tabela 3 –</b>	Concentração de proteínas (mg/mL) e atividade antitripsina específica (UI/mg de proteína) nos extratos proteicos das três últimas etapas do processamento industrial das sementes de mamona, etapa 3 (E3), etapa 4 (E4) e etapa 5 (E5) após tratamento com CaO 9,0% (p/p).....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Bário
BapNA	Cloridrato de N- $\alpha$ -Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
BBTIs	Inibidores do tipo Bowman Birk
CaO	Óxido de Cálcio
Ca(OH) <sub>2</sub>	Hidróxido de Cálcio
cm	Centímetro
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Classificação de enzimas
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
ExB	Extrato Bruto
FUNCAP	Fundação Cearense de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
ha	Hectares
H <sub>2</sub> O	Água
IP	Inibidores de Protease
kDa	Quilo Dalton
kgf	Quilograma-força
KTIs	Inibidores do tipo Kunitz
LTDA	Sociedade Empresarial Limitada
Milli-Q <sup>®</sup>	Água Ultrapura
$\mu$ L	Microlitro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de Amônio

nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
psi	Libra-força por polegada quadrada
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
RCA I	<i>Ricinus communis agglutinin I</i>
RCA II	<i>Ricinus communis agglutinin II</i>
RcTI	Inibidores de tripsina de <i>Ricinus communis</i> L.
Ric c 1	Inibidor de $\alpha$ - amilase 1
Ric c 3	Inibidor de $\alpha$ - amilase 3
Rc-2S-Alb	Inibidor de tripsina da família das Albuminas 2S
RIP	Proteínas Inativadoras de Ribossomos
RTA	Ricina Tóxica Subunidade A
RTB	Ricina Tóxica Subunidade B
Tris/HCl	Cloridrato de tris -(hidroximetil)- aminometano
UI	Unidade de Inibição
v/v	Volume /volume
TS	Tratamento térmico seco
TUP	Tratamento térmico úmido sob pressão

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Celsius
%	Porcentagem
$\alpha$	Alfa
$\pm$	Mais ou menos
$g$	Aceleração da gravidade
$\beta$	Beta
$\mu$	Micro
D	Dextrógira
®	Marca Registrada
>	Maior que
<	Menor que

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
2.1. Processamento industrial de biomassa da semente de mamona .....	15
2.2. Fatores antinutricionais .....	16
2.3 Proteínas tóxicas e antinutricionais da mamona .....	17
2.3.1 <i>Lectinas</i> .....	17
2.3.2 <i>Albuminas 2S</i> .....	18
2.3.2.1 <i>Inibidores de tripsina</i> .....	19
2.3.2.2 <i>Inibidores <math>\alpha</math> – amilase</i> .....	20
2.4 Inativação das proteínas tóxicas e antinutricionais.....	22
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>24</b>
<b>4 HIPÓTESES .....</b>	<b>25</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
5.1. Objetivo Geral .....	26
5.2. Objetivos Específicos.....	26
<b>6 ARTIGO .....</b>	<b>27</b>
INATIVAÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA NA MAMONA ( <i>RICINUS COMMUNIS L.</i> ) PROCESSADA INDUSTRIALMENTE APÓS TRATAMENTOS TÉRMICO E QUÍMICO.....	27
<b>7. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A mamona é um fruto obtido da mamoneira, que tem origem afro-asiática, e supostamente foi trazida para o Brasil por escravos no período colonial. É largamente cultivada nos trópicos e subtropicais, popularmente conhecida como rícino, carrapateira e palma-de-cristo. (Matos *et al.*, 2011). Pertence à família Euphorbiaceae e seu nome científico é *Ricinus communis* L. (Martius; Eichler; Urban, 1840-1906).

Da semente da mamona é extraído o óleo de rícino, que tem o ácido ricinoleico como um de seus principais componentes químicos, entre 89-92%. O ácido ricinoleico tem importante valor comercial sendo bastante utilizado pela indústria, em especial nos setores farmacêutico, oleoquímico, de cosméticos, medicamentos, polímeros biodegradáveis, lubrificantes, revestimentos, adesivos e na síntese de nanopartículas (Nitbani *et al.*, 2022).

No último levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção nacional de mamona da safra 2024/2025 contabilizou 64,2 mil hectares de área plantada, gerando uma colheita de 87,7 mil toneladas, mantendo o Brasil como o terceiro maior produtor de mamona do mundo. A maior produção da mamona no território brasileiro, atualmente, se encontra na região Nordeste, mais precisamente na Bahia (CONAB, 2025).

As plantas são fontes ricas de moléculas ativas que possuem um enorme interesse biotecnológico. A maioria dessas biomoléculas é componente de sistemas de defesa constitutivo ou induzido e pode ser encontrada em todas as partes vegetativas da planta, como: folhas, sementes, caules, flores e raízes (dos Santos; Franco, 2023; Kaur *et al.*, 2022).

Proteínas e peptídeos, que estão entre os principais componentes químicos relacionados à defesa vegetal, têm se destacado nas pesquisas científicas devido à sua versatilidade e potencial utilidade no ramo da biotecnologia (Ali *et al.*, 2018; Souza, 2020). Mas, ao mesmo tempo em que essas moléculas de defesa vegetal são benéficas para as plantas, podem tornar-se fatores tóxicos ou antinutricionais para os indivíduos que as usam como fonte alimentar, sejam eles os microrganismos patogênicos (Sánchez-Gómez *et al.*, 2024) ou organismos superiores, como os animais domésticos e o homem (Avilés-Gaxiola; Chuck-Hernández; Saldívar, 2018).

O desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos é objeto de estudo de projetos inovadores que buscam substituir materiais sintéticos por biodegradáveis ou para suprir materiais que estejam em escassez. Nessa linha, a mamona vem demonstrando seu valor em diferentes setores da indústria, não somente para geração de produtos derivados do óleo, mas também para agregação de valor ao seu subproduto, a torta (Silva *et al.*, 2015) ou o



farelo de mamona (Severino *et al.*, 2021).

Estudos demonstraram a presença de fatores tóxicos e antinutricionais na semente e no subproduto da mamona após a extração do óleo, em especial as lectinas citotóxicas e o alcalóide ricinina (Mondal; Bera; Das, 2019). Mais recentemente, Rocha *et al.* (2022) relataram um processo industrial de extração do óleo capaz de destoxificar o subproduto durante a etapa de dessolventização. No entanto, nesse subproduto não foi avaliada a atividade dos demais fatores antinutricionais, como os inibidores de tripsina, já identificados nas sementes (Salles *et al.*, 2014) e na torta de mamona (Silva *et al.*, 2015). Inibidores de tripsina podem afetar negativamente a digestão de proteínas ao longo do sistema digestório de animais superiores, podendo restringir ou até inviabilizar sua aplicação como ingrediente alimentar para ração animal (Lima *et al.*, 2014).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Processamento industrial de biomassa da semente de mamona

A biomassa de origem vegetal, gerada no campo como produto da atividade agrícola, permitiu a sobrevivência do homem em ambientes considerados inóspitos. Com a expansão da agricultura, a produção atingiu volumes significativos, gerando riquezas, mas também desafios ambientais que exigem o controle e o tratamento dos resíduos como forma de reduzir os impactos negativos ao meio ambiente. Segundo Vaz Júnior (2020), o processamento industrial da biomassa agrícola pode oportunizar o surgimento de várias cadeias de valor como a de novos materiais (polímeros, resinas, fibras), energia, biocombustíveis (etanol, biodiesel, biogás), insumos químicos (biofertilizantes, surfactantes, ésteres, ácidos orgânicos), alimentos e ração para animais.

Os frutos de mamona (Figura 1) colhidos no campo são levados para processamento pela indústria ricinoquímica, e, dependendo do processo industrial adotado para extração do óleo de rícino, pode-se obter como subproduto a torta ou o farelo de mamona. Quanto mais eficiente o processo de extração do subproduto (torta ou farelo), menor o teor de óleo residual (Rocha *et al.*, 2022).

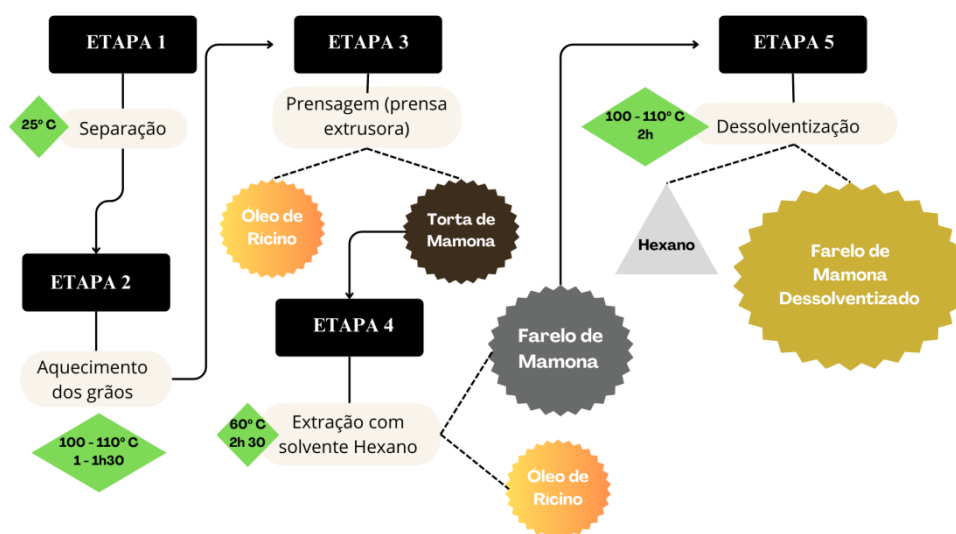
**Figura 1** – Frutos da mamona (*Ricinus communis* L.).



Fonte: Máira Milani. Embrapa (2005)

A torta de mamona possui em torno de  $10,96 \pm 1,93\%$  de óleo após extração, já no farelo de mamona a porcentagem cai para  $1,25 \pm 0,6\%$  (Rocha *et al.*, 2022). Essa diferença se deve ao processo industrial adotado pela indústria geradora do farelo, em que a extração do óleo ocorre em mais de uma etapa. Brevemente, o processo consiste em: o material é inicialmente separado por peneira onde galhos e areia são retirados (Etapa 1); os grãos seguem então para o aquecimento seco entre  $100-110^{\circ}\text{C}$ , por uma hora a uma hora e meia (Etapa 2); em seguida, é realizada a primeira extração de óleo, onde o material é prensado em prensa extrusora (Etapa 3) gerando um resíduo com as características da torta de mamona; esse resíduo segue então para nova extração de óleo, agora com o solvente hexano a  $60^{\circ}\text{C}$  por duas horas e meia (Etapa 4); e, por fim, é recuperado o solvente por aquecimento a  $100-110^{\circ}\text{C}$  por duas horas, na etapa de dessolventização, sendo o resíduo final o farelo de mamona dessolventizado (Etapa 5) (Pompeu *et al.*, 2020). Todo o processo está descrito na Figura 2.

**Figura 2** – Fluxograma do processamento industrial da semente da mamona.



Fonte: Adaptado de Pompeu *et al.* 2020.

## 2.2. Fatores antinutricionais

Os fatores antinutricionais estão presentes em leguminosas e grãos e dificultam a absorção dos nutrientes pelo organismo reduzindo o valor nutricional do alimento. Na literatura são estudados muitos desses fatores antinutricionais, como por exemplo, os compostos secundários taninos, fitatos, glicosídeos cianogênicos, oxalatos e alcalóides, mas

também os de natureza proteica como os inibidores de protease, as lectinas (Ram *et al.*, 2020), além de ureases e lipoxigenases (Kong; Li; Liu, 2022).

A ocorrência de fatores antinutricionais é natural e comum entre diversas espécies de vegetais, pois essas moléculas desempenham papéis fisiológicos importantes como defesa e armazenamento de nutrientes necessários para germinação de sementes (Ram *et al.*, 2020).

Para contornar os desafios de viabilizar o uso de diversos grãos para alimentação seja humana ou animal, vários métodos físicos, químicos ou biológicos são empregados com o intuito de eliminar ou reduzir os efeitos tóxicos e antinutricionais a níveis toleráveis (Andrade *et al.*, 2019; Fouda *et al.*, 2021).

O farelo de mamona, processado a partir das sementes produzidas pelos frutos da mamona, é rico em proteínas e outros nutrientes e o torna uma opção bastante atraente para a indústria de alimentação animal, além de permitir aumentar a rentabilidade e agregar valor ao subproduto para a indústria (Rocha *et al.*, 2022).

Em adição, Dubois *et al.* (2013) afirmam que o farelo de mamona não tem encontrado espaço como suplemento proteico, principalmente, porque a semente contém vários compostos tóxicos. O fato é que sementes de mamona se caracterizam por possuírem diversos fatores tóxicos e antinutricionais e alguns persistem mesmo após processamento industrial (Akande *et al.*, 2016).

## **2.3 Proteínas tóxicas e antinutricionais da mamona**

Os constituintes tóxicos da mamona, de natureza proteica, são as lectinas e um conjunto de albuminas 2S, alergênicas, muito ativas e resistentes aos processos térmicos de destoxificação (Severino; Milani; Beltrão, 2007).

### **2.3.1 Lectinas**

Lectinas são proteínas de origem não imune que possuem a habilidade de reconhecer e se ligar a carboidratos de maneira específica e reversível, sem alterar sua estrutura (Ram *et al.*, 2021), ou seja, são desprovidas de atividade enzimática sobre o carboidrato, sendo diferentes, por exemplo, das enzimas glicosil hidrolases e glicosil transferases (de Coninck; Van Damme, 2021). No entanto, exercem o efeito citotóxico por atividade enzimática (Sowa-Rogozinska *et al.*, 2019). Estão presentes na natureza de forma geral, mas particularmente abundantes em plantas, estando relacionada a uma infinidade de processos biológicos, como o desenvolvimento vegetal, defesa da planta a patógenos, resposta

a estresse e regulação da expressão gênica (de Coninck; Van Damme, 2021).

Na semente de mamona são encontradas duas lectinas, e com base em suas atividades biológicas são comumente referenciadas como aglutinina (*Ricinus communis agglutinin I* - RCA-I) e ricina (*Ricinus communis agglutinin II* - RCA-II) (Worbs *et al.*, 2015).

As lectinas da mamona são toxinas AB, ou seja, possuem subunidade A (RTA) com atividade enzimática e subunidade B de ligação a carboidratos (RTB), unidas por uma única ponte dissulfeto. Nas lectinas tóxicas da mamona, a RTA tem atividade de proteína inativadora de ribossomos (RIP) e a presença das duas subunidades AB caracterizam as lectinas da mamona como RIPs tipo II, ou seja, elas têm a capacidade de se ligarem às células, podendo ser endocitadas para exercerem sua atividade tóxica no citoplasma, causando apoptose, alteração da forma ou ruptura da membrana celular. Essas características as diferenciam das RIPs tipo I, que só possuem a atividade catalítica, não conseguindo atingir seu alvo de atividade. Através da atividade de RNA N-glicosidase as lectinas da mamona clivam o RNA ribossômico levando à inibição da síntese protéica e morte celular (Sowa-Rogozinska *et al.*, 2019; Tumer, 2020).

A RCA-I, ou aglutinina, apresenta especificidade para resíduos de  $\beta$ -galactose, é uma proteína heterotetramérica (duas subunidades RTA e duas RTB) com massa molecular aproximada de 120 kDa, por isso também conhecida como RCA<sub>120</sub>. Originalmente acreditava-se que ela não fosse tóxica, mas em estudos similares aos utilizados para determinar a toxicidade da RCA-II, a RCA-I também se mostrou tóxica, embora seja 300 vezes menos tóxica que a RCA-II (Worbs *et al.*, 2015). A RCA-II, ou ricina, com massa molecular de aproximadamente 60 kDa, é também conhecida como RCA<sub>60</sub> e apresenta apenas uma subunidade RTA e uma RTB, que tem especificidade a  $\beta$ -galactose, de forma similar à RCA-I, mas, diferente dessa, também reconhece N-acetil-galactosamina (Sowa-Rogozinska *et al.*, 2019; Worbs *et al.*, 2015).

### 2.3.2 Albuminas 2S

Os três grupos dominantes de alérgenos alimentares vegetais pertencem às superfamílias prolamina e cupina e à família 10 de proteínas relacionadas à patogênese (Breiteneder; Mills, 2005). A superfamília da prolamina compreende as albuminas 2S alergênicas, as proteínas de transferência de lipídios inespecíficas e os inibidores bifuncionais tripsina/ $\alpha$ -amilase de cereais (Nascimento *et al.*, 2011).

Com massa molecular entre 12 e 15 kDa (quilo Dalton), as albuminas 2S são

proteínas de reserva de dicotiledôneas, encontradas em sementes, frutos e pólen, são catiônicas, ricas em cisteína, em  $\alpha$ -hélices, e estáveis ao processamento térmico, pH e proteólise (Breiteneder; Mills, 2005; Souza, 2020). Ademais, são também considerados os principais fatores alergênicos da castanha do Pará, gergelim e mostarda, assim como da semente de mamona (Nascimento *et al.*, 2011).

Youle e Huang (1978), trabalhando com sementes de mamona, demonstraram pela primeira vez o papel fisiológico de estocagem de um grupo de albuminas, que representava 40% do total de proteínas isoladas dos corpos proteicos, com valor de sedimentação de 2S, massa molecular em torno de 12.000 Daltons, alto teor de glutamato/glutamina e de rápida degradação durante o estágio inicial de germinação. Essas pequenas proteínas são compostas por duas cadeias de polipeptídeos diferentes (Silva Júnior *et al.*, 1996), apresentando um padrão conservado de oito resíduos de cisteína, onde além das duas pontes dissulfeto intercadeias, existem duas outras intracadeias que tornam essas proteínas mais estáveis e compactas (Pantoja-Uceda *et al.*, 2002).

Em 2004, Chen *et al.* observaram que a proteína alergênica albumina 2S da semente de *R. communis* L. também continha domínio da família de inibidor bifuncional de tripsina/ $\alpha$ -amilase. Essas propriedades são importantes para defesa das sementes contra patógenos, mas por serem moléculas antinutricionais também podem afetar a qualidade do subproduto gerado pela indústria ricinoquímica.

### 2.3.2.1 Inibidores de tripsina

As proteases são enzimas que catalisam a proteólise por reação de hidrólise de ligações peptídicas e estão presentes em processos fisiológicos, como na digestão de alimentos. Existem seis classes de protease: as cisteína proteases, serina proteases, treonina proteases, proteases do ácido glutâmico, proteases do ácido aspártico e as metaloproteases (Gurumallesh *et al.*, 2019).

Quanto aos inibidores de protease (IP) de origem vegetal, são proteínas que ao se complexarem de forma específica às enzimas, são bloqueadas na hidrólise. Com base nas proteases que inibem, eles podem ser classificados em quatro famílias: de serina proteases, de cisteína proteases, de metaloproteases e de aspartato proteases (Ram *et al.*, 2020). Em geral são moléculas pequenas e apresentam estabilidade que ajudam na interação com a enzima. Os inibidores se ligam por pontes dissulfeto e pontes de hidrogênio ao sítio ativo da enzima alvo impedindo o acesso às moléculas do substrato e assim mantendo o processo inibitório estável

(Bateman; James 2011).

Os inibidores de tripsina são os mais abundantes nas sementes, são da família das serino proteases, e são classificados em duas famílias principais de acordo com o tamanho molecular, ou seja, inibidores do tipo Kunitz, que possuem um tamanho molecular cerca de 20 kDa e com duas pontes dissulfeto, e do tipo Bowman-Birk, com aproximadamente 8 kDa e com sete pontes dissulfeto (Ram *et al.*, 2020).

Silva *et al.* (2015) isolaram um inibidor de tripsina da torta de mamona e o chamaram de RcTI. O inibidor representou 0,1% do extrato bruto proteico, mostrou atividade inibitória específica de 26.622,2 UI/mg de proteína e na análise de eletroforese bidimensional revelou a presença de uma banda proteica de massa molecular de 14 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 5,2. Quanto à sua termorresistência, capacidade de resistir a altas temperaturas, o RcTI permaneceu estável mesmo após aquecimento a 100°C por 2 h, diminuindo após o tratamento apenas 7% de sua atividade inibitória inicial. RcTI também foi estável em uma faixa de pH (pH 6-7), apresentando perda de 20% da atividade inibitória apenas em pH alcalino (pH 8–11). Em adição, o RcTI apresentou 83% de similaridade com uma sequência interna de uma proteína de armazenamento de sementes rica em enxofre (Albumina 2S) de *R. communis* L.

Já em 2016, Souza *et al.* purificaram da torta de mamona uma proteína da família das albuminas 2S, com atividade de inibidor de tripsina, denominada de Rc-2S-Alb, com massa molecular de 75 kDa. Sendo o primeiro relato de uma albumina 2S que forma uma superestrutura de maior massa molecular.

Avilés-Gaxiola, Chuck-Hernández e Saldívar (2018) afirmam que os inibidores de tripsina de leguminosas podem ser inativados por processos químicos, físicos e biológicos, o que leva a discussão de possíveis métodos de inativação ou redução de atividade dos inibidores de tripsina em oleaginosas como a mamona.

### 2.3.2.2 Inibidores $\alpha$ – amilase

Alfa-amilases ( $\alpha$  – 1,4 –glucano – 4 – glucanohidrolase; EC 3.2.1.1) constituem uma família de hidrolases que clivam ligações  $\alpha$  – D – (1,4) – glucano em componentes de amido, glicogênio e vários carboidratos relacionados (Farooq *et al.*, 2021). Elas são amplamente distribuídas e desempenham um papel importante no metabolismo de carboidratos de microrganismos, animais e plantas. Como exemplo, elas estão envolvidas na digestão de carboidratos no trato digestivo de insetos e animais superiores (Nascimento *et al.* 2011).

Os inibidores proteicos de  $\alpha$ -amilase podem ser encontrados em cereais (Franco *et al.*, 2000), leguminosas (Shi *et al.*, 2017), tubérculos e entre outros organismos, podendo apresentar massa molecular até 50 kDa. Os inibidores de  $\alpha$ -amilases impedem de forma específica que as enzimas do sistema digestório exerçam sua função de digerir o amido, apresentando especificidade pela enzima alvo. Alguns inibidores, por exemplo, apresentam alta afinidade por  $\alpha$ -amilase de insetos e mamíferos (Franco *et al.*, 2002)

Nascimento *et al.* (2011) estudaram as proteínas Ric c 1 e Ric c 3, as principais isoformas de albuminas 2S das sementes de *R. communis* L., e observaram propriedades inibitórias destas albuminas sobre a  $\alpha$ -amilase salivar humana e  $\alpha$  – amilase larval dos insetos *Callosobruchus maculatus*, *Zabrotes subfasciatus* e *Tenebrio molitor*.

Vários estudos relatam a purificação de proteínas albumina 2S de sementes de mamona e mostram que estas proteínas ocupam massa molecular entre 11 e 75 kDa, pI em torno de 5, e atividade bioquímica de inibidor de tripsina e de  $\alpha$ -amilase (Tabela 1).

**Tabela 1** – Albuminas 2S isoladas/purificadas da semente de mamona (*R. communis* L.): massa molecular, ponto isoelétrico (pI), atividade bioquímica e atividade biológica.

Proteína	Massa Molecular, pI	Atividade Bioquímica	Atividade Biológica	Referências
-	12. 000 Da	-	-	Youle e Huang (1978)
Ric c 3	11. 239 Da, pI 4,9	-	-	Machado e Silva Júnior (1992)
-	11.140 Da	-	-	Silva Jr <i>et al.</i> (1996)
Ric c 1	11.200 Da	Inibidor de $\alpha$ – amilase	Inseticida ( <i>Callosobruchus maculatus</i> , <i>Zabrotes subfasciatus</i> , e <i>Tenebrio molitor</i> )	Nascimento <i>et al.</i> (2011)
Ric c 3	12.000 Da	Inibidor de $\alpha$ – amilase	Inseticida ( <i>Callosobruchus maculatus</i> , <i>Zabrotes subfasciatus</i> , e <i>Tenebrio molitor</i> )	Nascimento <i>et al.</i> (2011)
RcTI	14.000 Da, pI 5,2	Inibidor de Tripsina	Fungicida, Inseticida <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ; <i>Aedes aegypti</i> larvae	Silva <i>et al.</i> (2015)
Rc–2S–Alb	75.000 Da	Inibidor de Tripsina	Bactericida ( <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	Souza <i>et al.</i> (2016)

Fonte: Autoria própria.



## 2.4 Inativação das proteínas tóxicas e antinutricionais

A inativação ou redução dos fatores antinutricionais ocorre por processos físicos, químicos e biológicos, ou seja, durante o processamento dos alimentos são utilizadas algumas técnicas, como aquecimento dos grãos, adição de agentes químicos e processos enzimáticos (Kumar *et al.*, 2021). Devido à maioria das substâncias serem termolábeis, ou seja, perdem suas propriedades em determinada temperatura, a eliminação desses fatores termolábeis provoca a ruptura da parede celular, liberando a proteína para o meio extracelular. É importante salientar que, se o aquecimento for inadequado poderá afetar a qualidade da proteína, portanto é necessário chegar à melhor temperatura possível para que não ocorra sua degradação. Além disso, as técnicas podem ser utilizadas em conjunto para obtenção de um resultado mais satisfatório, e assim aumentando a biodisponibilidade dos nutrientes (Lima *et al.*, 2014).

Na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos após o uso de processos físicos, químicos e biológicos com o objetivo de inativar as lectinas tóxicas e as albuminas 2S das sementes de mamona, mas, com exceção do trabalho de Rocha e colaboradores (2022), os demais tratamentos foram realizados em escala laboratorial. Poder assegurar que processos em escala industrial possam inativar o maior número de compostos antinutricionais da mamona possibilitaria o uso mais seguro desse subproduto, seja durante seu manuseio na indústria, no preparo de rações ou no uso contínuo como alimento para animais mono ou poligástricos.

Fernandes *et al.* (2012), Andrade *et al.* (2019) e Araújo *et al.* (2020) conseguiram inativar os fatores tóxicos por meio de tratamentos químicos, e conforme descrito na Tabela 2, os melhores resultados obtidos foram com CaO, Ca(OH)<sub>2</sub> e NaOH, onde houve a inativação de lectinas citotóxicas. Rocha *et al.* (2022), embora tenha evidenciado a inativação das lectinas tóxicas da mamona durante o processo, os autores não avaliaram o subproduto quanto à atividade dos demais compostos antinutricionais, como os inibidores de tripsina.

É possível observar nas metodologias apresentadas na Tabela 2, que são necessárias elevadas temperaturas e tempo de aquecimento para inativar as lectinas tóxicas e albuminas 2S, sugerindo que ajustes no processo industrial quanto à temperatura e tempo de aquecimento possa favorecer a inativação do maior número de compostos antinutricionais da mamona. Também é mostrada a eficiência do tratamento químico com óxido de cálcio (CaO) na concentração de 8 a 9% na inativação das lectinas citotóxicas e das albuminas 2S, podendo também ser eficiente em inativar os inibidores de tripsina.

**Tabela 2** – Tratamentos realizados para inativação das proteínas tóxicas e antinutricionais da mamona (*R. communis* L.)

Proteína	Tratamento	Inativação		Referência
		Sim	Não	
Ricina/ Albumina 2S	205°C a seco	X		Gardner <i>et al.</i> (1960)
	cozimento úmido com 2% de NaOH e 10% de HCHO	X		
	cozimento úmido com 0,9% de HCl e 3% de HCHO	X		
	cozimento úmido com 2% de NaOH a 20 psi/1,40614 kgf/cm <sup>2</sup>	X		
	cozimento úmido com 1% de NaOH		X	
Ricina/ Albumina 2S	Autoclave a 15 psi/1,0546 kgf/cm <sup>2</sup> (121°C/1 h)	X		Jenkins (1963)
	Fervura /2 min	X		
Ricina	80°C/mais de 40 min		X	Okorie e Anugwa (1987)
	140°C/ 20 min	X		
Ricina	Autoclave a 15 psi/1,0546 kgf/cm <sup>2</sup> (121°C/1 h)	X		Anandan <i>et al.</i> (2005)
	CaO 4%	X		
Ricina	60-90°C/mais de 5 h		X	Jackson, Tolleson e Chirtel (2006)
Ricina/ Albumina 2S	Fermentação no estado sólido (SSF) com <i>Aspergillus niger</i>	X		Fernandes <i>et al.</i> (2012)
	4% Ca(OH) <sub>2</sub> ou CaO		X	
	8% Ca(OH) <sub>2</sub> ou CaO	X		
	4 ou 8% CaCO <sub>3</sub>		X	
RcTI	100°C/2 h		X	Silva <i>et al.</i> (2015)
Aglutinina/ Ricina	6 ou 9% NaOH; 9% CaO	X		Andrade <i>et al.</i> (2019)
	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ; CaHPO <sub>4</sub> ; Ca(OH) <sub>2</sub> ; CaCO <sub>3</sub> ; CaCO <sub>3</sub> /MgCO <sub>3</sub> ; CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O; KCl; NaCl		X	
Aglutinina/ Ricina	9% Ca(OH) <sub>2</sub> ou 6% NaOH	X		Araújo <i>et al.</i> (2020)
Ricina	Pré-umedecida 30% - Autoclave a 15 psi/1,0546 kgf/cm <sup>2</sup> (121°C/15 min)	X		Herrera <i>et al.</i> (2021)
Aglutinina/ Ricina	Processo industrial: 100-110°C/1 h + 60°C/ 2 h 30 min + 100-110°C/2 h	X		Rocha <i>et al.</i> (2022)

Fonte: Autoria própria.

### 3. JUSTIFICATIVA

A mamona (*Ricinus communis* L.) possui grande relevância econômica, principalmente pela remoção de seu óleo, amplamente utilizado nos setores farmacêutico, cosmético e industrial. Contudo, a torta e o farelo gerados como subprodutos apresentam fatores tóxicos e antinutricionais, como lectinas, alcalóides e inibidores de tripsina, que limitam sua aplicação na alimentação animal. A presença desses compostos impacta em níveis de digestibilidade das proteínas e pode inviabilizar o reaproveitamento desses resíduos, desperdiçando um recurso de potencial biotecnológico significativo. Apesar dos avanços em tratamentos químicos e térmicos para destoxificação de subprodutos, poucos estudos avaliaram a eficácia na inativação de inibidores de tripsina, importantes fatores antinutricionais presentes no farelo de mamona. Assim, torna-se essencial explorar métodos eficientes para reduzir ou eliminar a atividade desses inibidores, agregando valor aos subprodutos da mamona e tornando-os seguros para uso na alimentação animal, além de contribuir para a sustentabilidade e a economia.

#### **4. HIPÓTESES**

- Inibidores de tripsina estão ativos nas três últimas etapas do processamento industrial das sementes de mamona (torta e farelo) e sua atividade pode ser reduzida pelo tratamento térmico.
- O tratamento químico com óxido de cálcio (CaO) inativa os inibidores de tripsina presentes nas três últimas etapas do processamento industrial das sementes de mamona (torta e farelo).

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo Geral

Inativar os inibidores de tripsina presentes nas três últimas etapas do processamento industrial das sementes de mamona utilizando protocolos de tratamento térmico e químico e caracterizá-los quanto ao perfil de massa molecular e solubilidade em soluções salinas.

### 5.2. Objetivos Específicos

- Submeter amostras secas e hidratadas das farinhas finas das três últimas etapas do processamento industrial das sementes de mamona a tratamento térmico úmido sob pressão (1,10 kg/cm<sup>2</sup>) em autoclave, a 121°C por 20 e 60 min.
- Submeter amostras secas da farinha fina da última etapa do processamento industrial das sementes de mamona a tratamento térmico seco em estufa a 150°C, por 60, 120 e 180 min.
- Submeter amostras secas da farinha fina das três últimas etapas do processamento industrial das sementes de mamona a tratamento químico com CaO na proporção de 1:0,09 (p/p).
- Determinar a atividade específica dos inibidores de tripsina nos extratos proteicos obtidos das diferentes amostras de farinhas finas das etapas do processamento industrial das sementes de mamona, tratadas ou não.
- Caracterizar parcialmente os inibidores de tripsina no extrato proteico obtido da farinha fina da última etapa do processamento industrial das sementes de mamona quanto a sua solubilidade em sulfato de amônio e faixa de massa molecular com o intuito de mapear os inibidores.

**6 ARTIGO**

**INATIVAÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA NA MAMONA (*RICINUS COMMUNIS*  
L.) PROCESSADA INDUSTRIALMENTE APÓS TRATAMENTOS TÉRMICO E  
QUÍMICO**

INACTIVATION OF TRYPSIN INHIBITORS IN CASTOR BEAN (*Ricinus communis* L.)  
PROCESSED INDUSTRIALLY AFTER HEAT AND CHEMICAL TREATMENTS

## **Inativação de inibidores de tripsina na mamona (*Ricinus communis* L.) processada industrialmente após tratamentos térmico e químico**

Bárbara Juliete Freire Pinto<sup>1</sup>, Liana Maria Ferreira da Silva<sup>2</sup>, Maria Hyenda Alves Lopes<sup>3</sup>, Mariana Santos Mourão Lobo<sup>3</sup>, Luana Monte Prado<sup>1</sup>, Lúcia Betânia da Silva Andrade<sup>3</sup>, Hévila Oliveira Salles<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Ceará,

<sup>2</sup> Embrapa Caprinos e Ovinos,

<sup>3</sup> Universidade Estadual Vale do Acaraú.

### **1 INTRODUÇÃO**

A mamona é um fruto obtido da mamoneira, que tem origem afro-asiática, e supostamente foi trazida para o Brasil por escravos no período colonial. É largamente cultivada nos trópicos e subtropicais sendo facilmente encontrada no Brasil, onde é popularmente conhecida como rícino, carrapateira e palma-de-cristo (Matos *et al.*, 2011). Pertence à família Euphorbiaceae e seu nome científico é *Ricinus communis* L. (Martius; Eichler; Urban, 1840-1906).

O Brasil é o terceiro maior produtor de mamona do mundo (FAOSTAT, 2023) e, no último levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2025), a produção nacional de mamona da safra 2024/2025 contabilizou 64,2 mil hectares (ha) de área plantada, gerando uma colheita de 87,7 mil toneladas. Essa produção se concentra na região Nordeste do país, mais precisamente no Estado da Bahia (CONAB, 2025).

Da semente da mamona é extraído o óleo de rícino, que tem o ácido ricinoleico como um de seus principais componentes químicos, entre 89-92%, sendo bastante utilizado nos setores farmacêutico, oleoquímico, de cosméticos, medicamentos, polímeros biodegradáveis, lubrificantes, revestimentos, adesivos e na síntese de nanopartículas (Nitbani *et al.*, 2022). Com o crescimento da indústria ricinoquímica no país, cresce também a geração de resíduos da extração do óleo impulsionando as pesquisas para agregar valor ao subproduto, que por ser rico em proteína tem sido avaliado para uso na alimentação animal, seja o subproduto torta (Araújo *et al.*, 2020) ou o farelo de mamona (Rocha *et al.*, 2022).

No entanto, sabe-se da presença de fatores tóxicos e antinutricionais na semente e no subproduto da mamona, em especial as lectinas citotóxicas e o alcalóide ricinina (Mondal; Bera; Das, 2019). Fernandes *et al.* (2012), Andrade *et al.* (2019) e Araújo *et al.* (2020) sugeriram tratamentos com compostos químicos para inativar os fatores tóxicos presentes. Mais recentemente, Rocha *et al.* (2022) relataram um processo industrial de extração do óleo capaz de destoxificar o subproduto durante a etapa de dessolventização.

Mas muito embora os estudos de Rocha *et al.* (2022) tenham mostrado bons resultados no uso do farelo de mamona na alimentação de pequenos ruminantes, não lograram êxito na alimentação de aves, animais monogástricos, mesmo após os ensaios bioquímicos terem demonstrado inativação das lectinas citotóxicas durante o processamento industrial. Esses achados levam a cogitar a presença ativa de fatores antinutricionais neste subproduto. A atividade de inibidores de tripsina já foi identificada nas sementes (Salles *et al.*, 2014) e na torta de mamona (Silva *et al.*, 2015), e sabe-se que alimentos ricos em inibidores de tripsina podem afetar negativamente a digestão de proteínas ao longo do sistema digestório de animais superiores, podendo restringir ou até inviabilizar sua aplicação como ingrediente alimentar para ração animal (Lima *et al.*, 2014).

Partindo da hipótese que inibidores de tripsina estão ativos no farelo de mamona industrialmente processado e que sua atividade possa ser reduzida ou até mesmo inativada após tratamento térmico ou químico, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de inibidores de tripsina da mamona nas três últimas etapas do processamento industrial, torta de mamona (E3), farelo de mamona com solvente hexano (E4) e farelo de mamona dessolventizado (E5), bem como testar protocolos de tratamento térmico e químico para inativá-los.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção e preparo da amostra**

As amostras coletadas ao longo das três últimas etapas do processo industrial de extração do óleo de rícino foram cedidas pela Indústria Azevedo Óleos LTDA, localizada em Itupeva, São Paulo, Brasil.

Como já descrito no trabalho de Rocha *et al.* (2022) o processo industrial, utilizado pela Azevedo Óleos LTDA, consiste em cinco etapas, sendo as três últimas etapas, respectivamente, a etapa 3, onde, após aquecimento a 95°C por uma hora é realizada a



primeira extração de óleo através da passagem do material por prensa extrusora, gerando um resíduo com as características da torta de mamona (E3); a etapa 4, onde ocorre nova extração de óleo, agora com o solvente hexano a 60°C (E4); e, por fim, a etapa 5 onde é recuperado o solvente por aquecimento a 125°C por 50 minutos, sendo o resíduo final o farelo de mamona dessolventizado (E5).

Após coleta e transporte, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de Bioquímica da Embrapa Caprinos e Ovinos, em Sobral – Ceará onde foram acondicionadas sob refrigeração a – 4°C. As amostras referentes ao processamento industrial (E3, E4 e E5) foram moídas em moinhos de corte, passadas em peneira com malha de 0,5 mm de diâmetro (ABNT 32), gerando uma farinha fina, e novamente mantidas sob refrigeração a – 4°C até tratamentos.

## **2.2 Tratamentos Térmicos**

### ***2.2.1 Tratamento térmico úmido sob pressão (TUP)***

As farinhas finas, previamente moídas e peneiradas descritas no tópico anterior, provenientes das etapas E3, E4 e E5, na granulometria de 0,5 mm, farinhas secas (apenas moídas e peneiradas) ou hidratadas com água na proporção de 1:1,5 (p/v), foram submetidas a tratamento térmico úmido sob pressão (TUP) em autoclave vertical (121°C, a 1,10 kgf/cm<sup>2</sup>) por 20 ou 60 min (Jenkins 1963; Anandan *et al.*, 2005). Ao término, as amostras foram para estufa de secagem a 55°C, por 72 horas. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

### ***2.2.2 Tratamento térmico seco (TS)***

Para o tratamento térmico seco (TS) somente foram utilizadas as amostras do farelo de mamona dessolventizado (E5) na granulometria de 0,5 mm, recebendo calor térmico seco a 150°C, em estufa de secagem e esterilização (FANEM – MODELO 315 SE), durante três tempos: 60; 120 e 180 minutos (FIGURA 2).

Ao fim dos tratamentos térmicos, úmido sob pressão ou seco, ao atingirem a temperatura ambiente, as farinhas tratadas termicamente e o grupo controle (farinhas não tratadas) foram armazenados a -26°C até a extração de proteínas. Todos os tratamentos e o grupo controle foram realizados em triplicata.

## 2.3 Tratamento químico

Para o tratamento químico foi utilizado óxido de cálcio (CaO) a 9,0% (p/p) em relação às farinhas E3, E4 e E5, previamente moídas, conforme metodologia utilizada por Andrade *et al.* (2019), porém com a mistura na proporção de 1:1,5 (p/v), farinha:água.

Descrevendo brevemente, foram pesadas 10 g da farinha referente às amostras E3, E4 e E5, com granulometria de 0,5 mm, e adicionado 0,9 g de CaO. Em seguida, acrescentados 15 mL de água Milli-Q<sup>®</sup> previamente aquecida a 55°C e homogeneizado. A farinha tratada quimicamente foi submetida à secagem em estufa a 55°C por 72 h, depois macerada em almofariz para retornar à granulometria inicial. O tratado foi realizado em triplicata e armazenado a -26°C até a extração de proteínas.

## 2.4 Extração de proteínas

As farinhas das três etapas do processo industrial, tratadas termicamente ou não (grupo controle), foram submetidas à extração de proteínas em água, na proporção de 1:3 (p/v), sob agitação constante por 1 h, à temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ). Em seguida, centrifugadas a 10.000 x g por 30 min, a 4°C. O sobrenadante obtido foi filtrado em papel qualitativo e o filtrado, chamado de extrato bruto, foi armazenado a  $-26^\circ\text{C}$  até as análises bioquímicas.

As farinhas tratadas quimicamente foram inicialmente transferidas para membrana de diálise com *cut off* de 2 kDa, acrescentado água Milli-Q<sup>®</sup> a 55°C na proporção 1:3 (p/v) e dialisadas contra água a 55°C até o pH baixar de 14 para 7,5. Quando atingido o pH 7,5, o material foi transferido para tubos de centrífuga de 15 mL, o volume foi ajustado para 10 mL para permitir a proporção de extração 1:10 (p/v) e o material ficou sob agitação constante por 1 h, à temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ). Após centrifugação a 10.000 x g por 30 min, a 4°C, o sobrenadante obtido foi filtrado, chamado de extrato bruto, e armazenado a  $-26^\circ\text{C}$  até as análises bioquímicas.

## 2.5 Fracionamento por membranas

Para realizar o fracionamento por membranas, 20 mL de extrato bruto (ExB) do farelo de mamona dessolventizado (E5) (FIGURA 2), foram transferidos para membrana com *cut off* de 2 kDa e submetidos à diálise. A diálise consistiu em quatro trocas de água Milli-Q<sup>®</sup>, com intervalos de quatro horas entre cada troca, utilizando 200 mL de água Milli-Q<sup>®</sup> por

etapa. Em seguida, o conteúdo externo à membrana, contendo as moléculas menores que 2 kDa ( $x < 2$ ), foi concentrado por liofilização. Já o conteúdo interno à membrana, com moléculas maiores que 2 kDa foi transferido para uma membrana de *cut off* de 12 kDa, e novamente submetido à diálise com quatro trocas de 200 mL de água Milli-Q<sup>®</sup>. O conteúdo externo à membrana de 12 kDa, contendo as moléculas entre 2 e 12 kDa ( $2 < x < 12$ ) foi concentrado por liofilização. Ao final, o volume obtido dentro da membrana de 12 kDa continha as moléculas maiores que 12 kDa ( $12 < x$ ). As frações foram armazenadas a  $-26^{\circ}\text{C}$  até as análises bioquímicas.

## 2.6 Fracionamento com Sulfato de Amônio

Para o fracionamento com sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) foram utilizados 50 mL de extrato bruto (ExB) do farelo de mamona dessolventizado (E5) (FIGURA 2), sendo adicionados 8,8 g de sulfato de amônio para precipitar as proteínas na faixa de 0-30% de saturação. A mistura foi incubada e deixada em repouso *overnight* a  $8^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte, foi centrifugada a  $10.000 \times g$  por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O precipitado obtido correspondeu à fração de 0 – 30% e o sobrenadante foi utilizado para preparar a fração de 30 – 60%. Ao sobrenadante (46 mL) da primeira centrifugação foram acrescidos 9,11 g de sulfato de amônio, seguindo o mesmo procedimento de incubação e centrifugação. Em seguida, ao sobrenadante da fração de 30 – 60% (49 mL), foram adicionados 11,12 g de sulfato de amônio para obter a fração de 60 – 90%, repetindo os mesmos passos de incubação e centrifugação utilizados nas frações anteriores. As frações obtidas foram exaustivamente dialisadas contra água Milli-Q<sup>®</sup> em membrana de *cut off* de 2 kDa, até a retirada total do sulfato de amônio. Para atestar a ausência de sulfato de amônio, uma alíquota da água da diálise foi adicionada a uma solução a 0,1 M de cloreto de bário diidratado ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) na proporção de 1:1 (v/v). Na presença de sulfato amônio é formado sulfato de bário que deixa a solução turva, a ausência de turbidez indicou ausência de sulfato de amônio na água da diálise e, indiretamente, na fração dialisada. As frações foram armazenadas a  $-26^{\circ}\text{C}$  até as análises bioquímicas.

## 2.7 Quantificação de Proteínas

Os extratos e frações armazenados a  $-26^{\circ}\text{C}$  foram retirados da refrigeração e descongelados à temperatura ambiente para quantificar a concentração de proteína solúvel pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão, e leitura a

595 nm em espectrofotômetro (BIOCHROM – MODELO LIBRA S12).

## **2.8 Ensaio de Atividade Antitripsina**

O ensaio de atividade antitripsina nas amostras de extratos brutos foi conduzido conforme metodologia de Kakade *et al.* (1970) com algumas adaptações, usando Cloridrato de N- $\alpha$ -Benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BApNA) como substrato, para os volumes de enzima e de amostras vegetais. Inicialmente, foram realizados testes para determinar volume correspondente a  $\frac{1}{2}$  da velocidade máxima da enzima tripsina, que ficou em torno de 50  $\mu$ L. Em seguida, foi realizado o ensaio de inibição da enzima utilizando 50  $\mu$ L da solução de tripsina (0,1 mg/mL em HCl 1 mM), incubando por 15 minutos a 37°C, juntamente com o volume de 700  $\mu$ L de tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,5 com CaCl<sub>2</sub> 20 mM e 50  $\mu$ L dos diferentes extratos brutos e frações. A reação foi iniciada com a adição de 500  $\mu$ L de uma solução com 1,25 mM de BApNA previamente dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), respeitando a solubilidade do BApNA de 50 mg/mL de DMSO. Após 15 minutos a 37°C, foram adicionados 200  $\mu$ L de ácido acético 30% a fim de parar a reação. Para ter um monitoramento dos dados foram preparados tubos controle da enzima tripsina, feitos na ausência dos extratos vegetais, e tubos controles do substrato (brancos), onde o substrato foi acrescentado após a reação ter sido encerrada. A leitura das absorbâncias foi imediatamente realizada em espectrofotômetro a 410 nm.

## **2.9 Análise estatística**

Utilizando o software IBM SPSS Statistics 21, os dados foram submetidos à Análise de Variância, e quando o efeito dos tratamentos foi significativo ( $p < 0,05$ ), as médias foram comparadas pelo Teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ). Para todas as medidas feitas com repetições, o intervalo de  $\pm$  erro padrão foi informado após as médias.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Atividade antitripsina específica (UI/mg de proteína) ao longo das três últimas etapas do processamento industrial das sementes de mamona**

Na Tabela 1 é apresentada a concentração de proteínas (mg/mL) e a atividade antitripsina específica (UI/mg de proteína) presentes nos extratos proteicos das três últimas etapas do processamento industrial das sementes de mamona, denominadas de controle etapa

3 (E3), controle etapa 4 (E4) e controle etapa 5 (E5), ou seja, as farinhas que não sofreram tratamento algum, apenas o processamento da indústria. Observa-se uma redução na quantidade de proteína extraída por mililitro de extrato proteico na última etapa (E5), ao mesmo tempo em que a atividade específica de inibição da tripsina é maior ( $p < 0,05$ ) em relação às outras etapas. Duas informações importantes são colocadas em evidência: a primeira é que o processo industrial de extração do óleo de rícino não inativa os inibidores de tripsina presentes nas sementes de mamona; e a segunda é que, além de não inativar, o processo industrial potencializou essa atividade, possivelmente por desnaturar outras proteínas ao longo dele. Assim, o processo melhorou a extração dos inibidores e os tornou mais evidentes dentre as demais proteínas solúveis do farelo de mamona dessolventizado (E5).

**Tabela 1** - Concentração de proteínas (mg/mL) e atividade antitripsina específica (UI/mg de proteína) nos extratos proteicos das três últimas etapas do processamento industrial (E3, E4 e E5) das sementes de mamona.

Extratos proteicos	Concentração de proteína (mg/mL)	Atividade antitripsina específica (UI/mg de proteína)
Controle E3	2,49±0,16 <sup>a</sup>	218,48±11,71 <sup>a</sup>
Controle E4	7,12±0,18 <sup>b</sup>	133,31±4,63 <sup>b</sup>
Controle E5	1,73±0,02 <sup>c</sup>	416,12±22,72 <sup>c</sup>

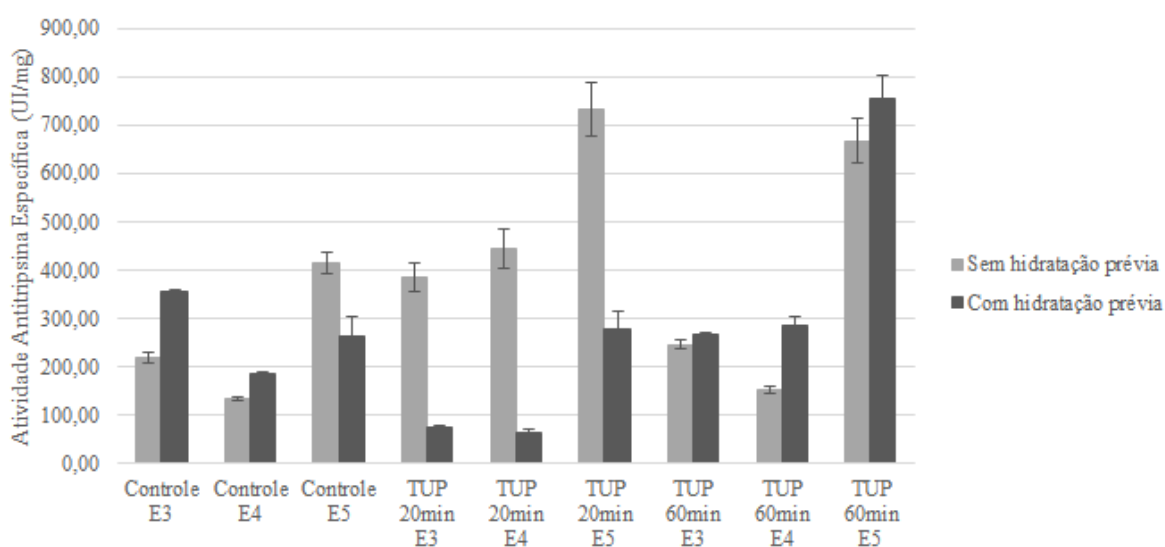
<sup>a,b,c</sup> Média±erro padrão seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste t de *Student*.

### 3.2 Concentração de proteínas e atividade específica após tratamento térmico úmido sob pressão (TUP) em amostras das três últimas etapas do processamento industrial das sementes de mamona secas ou hidratadas

Pode-se observar na Figura 1 que submeter as amostras secas ao tratamento térmico úmido sob pressão (TUP), independente do tempo de aquecimento, 20 ou 60 minutos, potencializou a atividade dos inibidores de tripsina, especialmente nas amostras da etapa 5. Ainda na Figura 1, observa-se que os menores valores de atividade específica dos inibidores de tripsina na E5 foram obtidos após realizar a hidratação das amostras e submetê-las ao TUP por 20 minutos. Mas, mesmo reduzindo a atividade dos inibidores, esse tratamento não foi capaz de inativá-los. Embora a estratégia adotada com o tratamento TUP nas amostras não seja capaz de inativar os inibidores, ela mostra um caminho promissor para purificar os

inibidores de tripsina da mamona, em especial a partir do subproduto gerado na última etapa do processamento industrial, ou seja, a partir do farelo de mamona dessolventizado (E5), pois são nessas amostras que se observa a maior atividade específica dos inibidores de tripsina.

**Figura 1** – Atividade antitripsina específica (UI/mg) de extratos proteicos das três últimas etapas do processamento industrial sem (Controle) e com tratamento térmico sob pressão (TUP) por 20 e 60 min.



<sup>1</sup>Legenda: Atividade antitripsina específica (UI/mg de proteína) de extratos proteicos de amostras de farelo de mamona não hidratadas (■) ou hidratadas previamente (■) das três últimas etapas do processamento industrial das sementes de mamona, etapa 3 (E3), etapa 4 (E4) e etapa 5 (E5), antes (Controle) e após tratamento térmico úmido sob pressão (TUP) por 20 ou 60 min. Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.3. Tratamento térmico seco (TS) do farelo de mamona dessolventizado proveniente da última etapa do processamento industrial (E5) das sementes de mamona.

O uso do tratamento térmico seco (TS) teve como objetivo verificar se o aumento da temperatura, associado ao aumento do tempo do tratamento, poderia interferir negativamente na atividade dos inibidores de tripsina presentes e ativos na última etapa do processamento industrial das sementes de mamona (E5). Conforme os resultados apresentados na Tabela 3, a estratégia além de ter sido ineficiente em inativar os inibidores, potencializou sua atividade. Isso pode ser constatado quando a atividade específica da etapa 5 tratada termicamente a seco a 150°C, por 180 min, foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que o

controle E5 sem tratamento térmico, bem como em relação aos grupos com os menores tempos de tratamento (TS60min E5 e TS120min E5). Em adição, quando comparado ao grupo controle E5, esse aumento da atividade específica no TS180 min E5 foi acompanhado de uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na concentração de proteínas solúveis extraídas (Tabela 2).

**Tabela 2** – Concentração de proteínas (mg/mL) e atividade antitripsina específica (UI/mg de proteína) nos extratos proteicos da última etapa do processamento industrial das sementes de mamona, (E5), após tratamento térmico seco (TS) a 150°C por 60, 120 e 180 minutos.

Extratos proteicos	Concentração de proteína (mg/mL)	Atividade antitripsina específica (UI/mg de proteína)
Controle E5	2,31±0,32 <sup>a</sup>	83,19±36,42 <sup>a</sup>
TS 60min E5	1,15±0,05 <sup>b</sup>	142,61±14,98 <sup>a</sup>
TS 120min E5	1,21±0,07 <sup>b</sup>	194,29±17,31 <sup>a</sup>
TS 180min E5	1,02±0,01 <sup>b</sup>	265,43± 8,41 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Médias±erro padrão seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste t de *Student*. Fonte: Autoria própria.

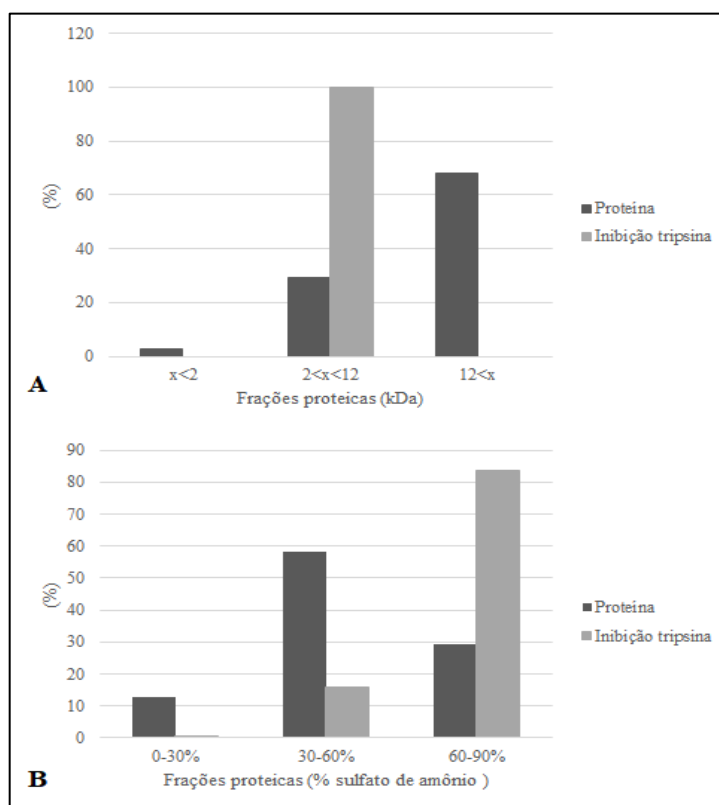
### 3.4. Caracterização bioquímica dos inibidores de tripsina presentes no farelo de mamona dessolventizado proveniente da última etapa (E5) do processamento industrial das sementes de mamona.

Diante do potencial biotecnológico dos inibidores de tripsina da etapa 5 como moléculas termorresistentes, buscou-se maior conhecimento sobre o perfil de massa molecular e de solubilidade dessas moléculas. Na Figura 2 é apresentado esse perfil, onde se evidencia que são moléculas de baixa massa molecular, entre 2 e 12 kDa (Figura 2A). Em adição, os inibidores de tripsina presentes no farelo de mamona dessolventizado são tratados no plural, pois os resultados também mostraram a presença de várias moléculas com atividade inibitória de tripsina, sendo detectada atividade antitripsina nas três faixas de saturação com sulfato de amônio (Figura 2B), ou seja, há moléculas com diferentes sequências de aminoácidos presentes no material. Moléculas com elevada porcentagem de aminoácidos polares, que precipitaram com pouca concentração de sal (0-30% e 30-60%) e outras formadas com maior porcentagem de aminoácidos hidrofóbicos, precisando de maior quantidade de sal (60-90%) para saírem de solução e precipitarem.

Ainda na Figura 2A e B, é possível observar que as frações com maior porcentagem de atividade inibitória não são as frações com maior porcentagem de proteína. O

fato revela que, mesmo o processo industrial favorecendo a concentração dos inibidores de tripsina, muitas moléculas sem atividade inibitória ainda estão presentes no material, necessitando de protocolos futuros para purificação e isolamento desses.

**Figura 2** – Porcentagem (%) de Atividade Inibitória e Concentração de Proteína do extrato bruto e frações proteicas de farelo de mamona dessolventizado (Etapa 5) por fracionamento de membranas de diálise e fracionamento por precipitação com sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).



Legenda: Porcentagem (%) de proteína e da inibição de tripsina distribuída entre as frações proteicas de farelo de mamona dessolventizado (E5 do processamento industrial): A - Fracionamento com membranas de diálises gerando frações menores de 2 kDa ( $x < 2$ ); entre 2 e 12 kDa ( $2 < x < 12$ ); e maiores que 12 kDa ( $12 < x$ ). B - Fracionamento com diferentes concentrações de sulfato de amônio gerando frações proteicas com precipitação entre 0-30%; 30-60%; e 60-90% de sulfato de amônio. Fonte: Autoria própria.

### 3.5. Tratamento químico com óxido de cálcio (CaO) do farelo de mamona dessolventizado proveniente das três últimas etapas do processamento industrial das sementes de mamona.

O tratamento químico com óxido de cálcio (CaO) foi a única estratégia capaz de zerar a atividade antitripsina no subproduto industrial (Tabela 3).



**Tabela 3** – Concentração de proteínas (mg/mL) e atividade antitripsina específica (UI/mg de proteína) nos extratos proteicos das três últimas etapas do processamento industrial das sementes de mamona, etapa 3 (E3), etapa 4 (E4) e etapa 5 (E5) após tratamento com CaO 9,0% (p/p).

Extratos proteicos	Concentração de proteína (mg/mL)	Atividade antitripsina específica (UI/mg de proteína)
CaO E3	1,64±0,24 <sup>a</sup>	NR*
CaO E4	3,29±0,02 <sup>b</sup>	NR
CaO E5	2,14±0,12 <sup>a</sup>	NR

<sup>a,b</sup>Médias±erro padrão seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, são estatisticamente diferentes (p<0,05) pelo teste t de *Student*.

\*NR: Não reagiu

#### 4. DISCUSSÃO

Disponibilizar ingredientes alternativos seguros para uso na alimentação animal é etapa prioritária para reduzir os custos de produção sem afetar a qualidade nutricional dos alimentos produzidos e das dietas formuladas (Pompeu *et al.*, 2020).

O presente estudo buscou investigar a presença e inativação de inibidores de tripsina ao longo das últimas etapas do processamento industrial das sementes de mamona, uma vez que essas moléculas constituem fatores antinutricionais com impacto significativo na utilização do farelo de mamona como suplemento proteico para animais.

Dentre os principais compostos antinutricionais de origem proteica presentes nas sementes de mamona estão as albuminas 2S, que são proteínas solúveis em água, onde estão incluídos os inibidores bifuncionais de tripsina e de  $\alpha$ -amilase (Souza, 2020), justificando o uso do solvente água na extração de proteínas com atividade inibitória de tripsina no presente trabalho.

A busca por outras moléculas ativas com atividade antinutricional ou tóxica no farelo de mamona dessolventizado, além das lectinas citotóxicas, foi respaldada por resultados de nosso grupo em que mesmo atestando a inativação das lectinas citotóxicas na última etapa do processamento industrial das sementes de mamona, animais monogástricos arraçados com dieta rica nesse subproduto desenvolveram sintomatologia de intoxicação e morte, (Rocha *et al.*, 2022).

O processo industrial que gerou o subproduto utilizado no trabalho de Rocha *et al.* (2022), e no presente trabalho, adota temperaturas elevadas (95 e 125°C) por um longo período (60 e 50 min, respectivamente), sendo capaz de inativar as lectinas citotóxicas que

são termolábeis a partir de temperaturas maiores que 121°C sob pressão por 60 min (Jenkins, 1963; Anandan *et al.*, 2005). No entanto, Silva *et al.* (2015) relataram atividade de inibidores de tripsina termorresistentes na torta mamona após 100°C/2 h).

Sendo a torta um subproduto equivalente à etapa 3 do processamento industrial para obtenção do farelo de mamona dessolventizado (Etapa 5), o presente trabalho buscou mapear a atividade dos inibidores de tripsina ao longo das últimas três etapas, etapa 3, 4 e 5, da mesma forma que Rocha *et al.* (2022) mapearam para atividade das lectinas citotóxicas.

No trabalho de Rocha *et al.* (2022) as lectinas citotóxicas foram inativadas apenas após a dessolventização do farelo de mamona, gerando um subproduto da etapa 5 destoxificado. O presente trabalho, no entanto, mostra que esse processamento industrial foi incapaz de inativar os inibidores de tripsina, e que além de se manterem ativos ao longo de todo o processo, sua atividade foi potencializada pelo mesmo processo (Tabela 1). Esse achado reforçou a termorresistência dessas moléculas como observado por Silva *et al.* (2015).

Há trabalhos que sugerem o calor úmido como alternativa para inativar compostos antinutricionais em sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), podendo aumentar a eficiência se essas forem previamente umedecidas (Carvalho *et al.*, 2023). Herrera *et al.* (2021) também aumentaram a eficiência de inativação ao elevarem a umidade da torta de mamona para 30% pela adição de água destilada (p/p) seguida de tratamento em autoclave a 121°C por 15 min e 15 psi/1,0546 kgf/cm<sup>2</sup>. O uso dessa estratégia para o farelo de mamona reforçou que os inibidores de tripsina presentes no farelo de mamona dessolventizado são altamente termorresistentes, pois mesmo após 60 minutos em calor úmido sob pressão (121°C/1,1 kgf/cm<sup>2</sup>), e independente das amostras terem sido previamente hidratadas (150% de umidade) ou não, todas as amostras apresentaram atividade antitripsina específica (Figura 1).

A ineficiência do tratamento térmico úmido sob pressão trouxe o questionamento se seria possível inativar os inibidores aumentando a temperatura a seco para 150°C, bem acima da utilizada pelo processo industrial (125°C), associado ao aumento do tempo de exposição para até 180 minutos. No entanto, não se logrou êxito com esse protocolo, a atividade antitripsina específica foi potencializada (Tabela 2).

Embora as estratégias térmicas adotadas no presente trabalho tenham sido ineficientes em inativar os inibidores, elas criaram uma oportunidade e poderão guiar o desenvolvimento de protocolos para purificação de inibidores de tripsina do farelo de mamona dessolventizado. Silva *et al.* (2015) utilizaram o aquecimento do extrato proteico a 100°C por 30 minutos como estratégia para purificar um inibidor de 14 kDa da torta de

mamona, com atividade biológica para controlar a germinação do fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* e o desenvolvimento de larvas do inseto *Aedes aegypti*.

Há ainda a possibilidade de serem novas moléculas, ou melhor, moléculas ainda não caracterizadas, pois, pelo nosso conhecimento, não encontramos relato na literatura da presença de inibidores de tripsina termorresistentes no farelo de mamona dessolventizado, e os resultados aqui apresentados sugerirem inibidores ativos com massa molecular diferente dos inibidores de *R. communis* já caracterizados na literatura, um de 14 kDa, o RcTI (Silva *et al.*, 2015), e outro de 75 kDa, o Rc-2S-Alb (Souza *et al.*, 2016). Possivelmente, esses inibidores de 14 e 75 kDa foram desnaturados ao longo do processamento, já que não foi detectada atividade na fração acima de 12 kDa na última etapa (E5) do processamento industrial (Figura 2A).

O uso de processo químico para inativação das lectinas citotóxicas já havia sido relatado na literatura (Fernandes *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2019; Araújo *et al.*, 2020), assim como para inativar inibidores de  $\alpha$ -amilase (Fernandes *et al.*, 2012). Mas, pela primeira vez, é mostrado que o processo químico com o uso de óxido de cálcio a 9% também é eficiente para inativar os inibidores de tripsina termorresistentes presentes no farelo de mamona dessolventizado.

A adoção pela indústria da tecnologia do tratamento químico com CaO desenvolvida até então por Andrade *et al.* (2019), estava limitada pelo elevado volume de água necessário para inativar as lectinas citotóxicas, 1:3 (p/v). Araújo *et al.* (2020) utilizando hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) conseguiram êxito reduzindo a proporção de água para 1:2 (p/v). No protocolo descrito no presente trabalho reduziu-se para 1:1,5 (p/v) a relação quantidade de farelo, com volume de água, otimizando-se ainda mais o processo. Com essa relação Araújo *et al.* (2020) não obtiveram sucesso em inativar lectinas citotóxicas na torta de mamona.

Essa otimização com a redução de volume pode ter sido possível devido à granulometria de 0,5 mm utilizada para o farelo de mamona dessolventizado nos ensaios, proporcionando maior superfície de contato entre a solução com CaO e as partículas do material tratado, repercutindo diretamente em sua ação na desnaturação das proteínas do farelo de mamona. No trabalho de Andrade *et al.* (2019) e de Araújo *et al.* (2020) não é destacada a granulometria da torta de mamona utilizada, pressupondo ter sido utilizada a granulometria da torta de mamona *in natura* fornecida pela indústria, que não chega a diâmetros menores que 5 mm, ou seja, material com grânulos 10 vezes superior à utilizada nos ensaios aqui reportados.

Outro ponto a ser destacado é com relação à solubilidade do CaO em água, ela é dependente da temperatura, da concentração e do diâmetro das partículas, sendo baixa à temperatura ambiente (25°C), atingindo valores máximos de solubilidade na temperatura ao redor de 74°C, e quando está na concentração próxima de 175 g/L e diâmetro médio das partículas de 0,144 mm (Silva *et al.*, 2008). No presente trabalho o CaO foi adicionado ao farelo e em seguida adicionada a água, ficando na concentração de CaO final de 60 g/L, bem abaixo do limite para solubilidade. Em adição, a água utilizada foi previamente aquecida a 55°C, o que deve ter facilitado a solubilização do CaO e sua maior interação com as partículas vegetais, contribuindo para eficiência do protocolo com um reduzido volume de água.

Souza *et al.* (2018) reportaram as mudanças observadas na proteína tóxica ricina desnaturada após tratamentos com solução com CaO 0,6%. Os autores destacaram que a solução aquosa de CaO tinha um pH maior que 12, e esse pH alcalino afetou a estrutura terciária da ricina, causando deaminação nos resíduos de asparagina, glutamina, serina e glicina, e provocando a clivagem de ligações peptídicas, preferencialmente, nos resíduos de asparagina, gerando peptídeos com diferentes massas moleculares. Essas alterações, portanto, desnaturaram e degradaram a ricina eliminando sua atividade citotóxica. Ação semelhante pode ter ocorrido com os inibidores de tripsina do farelo de mamona dessolventizado. Em 2012, Fernandes *et al.* haviam reportado a eficiência do CaO na inativação, não somente da ricina, mas também de inibidores de alfa-amilase, o que colabora para eficácia do óxido de cálcio em desnaturar proteínas.

Vale ressaltar, no entanto, que o material utilizado para inativar os inibidores de tripsina, ou seja, o farelo de mamona dessolventizado pela indústria, já não possuía atividade hemaglutinante das lectinas citotóxica como reportado por Rocha *et al.* (2022). Dessa forma, pode-se atestar que essa quantidade de água é eficiente para inativar os inibidores de tripsina, porém, pode não ser efetiva em inativar materiais ainda com lectinas citotóxicas ativas.

Realizar a caracterização dos inibidores de tripsina no farelo de mamona dessolventizado possibilitou avançar nos testes com o tratamento químico com óxido de cálcio. Isso porque o óxido de cálcio na concentração utilizada (0,9%, p/p) alcalinizou o material, atingindo o pH 14 quando solubilizado para a extração de proteína na proporção 1:10 (p/v). Esse pH inviabiliza o ensaio de atividade pois inativa a enzima tripsina, necessitando que as amostras sejam dialisadas antes do ensaio de atividade, objetivando retirar o óxido de cálcio e baixar o pH para próximo de 7,5. Na avaliação da massa molecular das proteínas com atividade antitripsina específica foi possível atestar atividade apenas na faixa de massa molecular entre 2 e 12 kDa (Figura 2A). De posse dessas informações pôde-se,

de forma assertiva, escolher a membrana de 2 kDa para realizar a diálise das amostras de farelo de mamona dessolventizado tratado com CaO, sem perder os inibidores presentes nas amostras, caso tivesse sido escolhida, erradamente, a membrana de 12 kDa, sem saber dessa informação.

Analizando a solubilidade dos inibidores de tripsina nas frações com diferentes concentrações de sulfato de amônio, observa-se que uma grande porcentagem dos inibidores presentes no farelo de mamona dessolventizado, mais de 80%, pode ser extraída com soluções salinas, já que é nas frações 30-60% e 60-90% de sulfato de amônio que se concentram as moléculas com atividade antitripsina (Figura 2B).

Outra característica dos inibidores de tripsina do farelo de mamona dessolventizado pode ser observada após tratamento químico com CaO, uma vez que esses inibidores não resistem ao tratamento alcalino extremo (pH 14), sendo desnaturados de forma irreversível, pois, após a diálise com água e retorno ao pH 7,5, os inibidores não recuperaram sua atividade. Silva *et al.* (2015) observaram que o RcTI foi estável em uma ampla faixa de pH (pH 2-6), com perda de 20% da atividade inibitória em pH alcalino (pH 8–11), mas não avançaram para extremos de pH maiores que 12.

## 5. CONCLUSÃO

O trabalho evidenciou pela primeira vez a presença de elevada atividade de inibidores de tripsina ao longo das etapas do processamento industrial das sementes de mamona, e no subproduto final, o farelo de mamona dessolventizado.

Os tratamentos térmicos utilizados, embora tenham sido ineficientes em inativar os inibidores de tripsina, contribuíram para caracterizar os inibidores de tripsina presentes no subproduto industrial farelo de mamona dessolventizado. Hoje se sabe que são moléculas altamente termorresistentes, o que os tornam, por um lado, vilões como fatores antinutricionais, e por outro, moléculas com um elevado potencial biotecnológico, para, por exemplo, serem utilizados no desenvolvimento de produtos de uso no controle de pragas e patógenos.

A caracterização dos inibidores, conduzida após a ineficiência dos protocolos térmicos, revelou a presença de mais de um inibidor de tripsina ativo na última etapa do processamento industrial das sementes de mamona. Os inibidores identificados foram classificados como proteínas de baixa massa molecular, o que é consistente com outros estudos sobre inibidores de protease em oleaginosas. A baixa massa molecular possivelmente

contribui para a maior estabilidade estrutural e funcional desses compostos, mesmo em condições extremas de processamento.

O uso de técnicas como fracionamento com membranas e com sulfato de amônio foi essencial para compreender o tamanho e o comportamento dos inibidores de tripsina, fornecendo informações cruciais para o desenvolvimento de estratégias eficazes de inativação.

Não foi encontrado na literatura um tratamento químico que fizesse uso do óxido de cálcio, semelhante ao sugerido, para inativação dos inibidores de tripsina presentes na torta ou farelo de mamona dessolventizado, sendo ele o único tratamento, dentre os demais avaliados na pesquisa, com 100% de eficiência na inativação. Essa abordagem representa um avanço significativo em relação aos métodos térmicos, mostrando-se promissora para a neutralização dos fatores antinutricionais das sementes de mamona, e abrindo novas perspectivas para o uso do subproduto.

## REFERÊNCIAS

- ANANDAN, S., KUMAR, G.K.A., GHOSH, J., RAMACHANDRA, K.S. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal Feed Science and Technology**, v. 120, p. 159–168, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.10.002>. Acesso em: 15 jan. 2025.
- ANDRADE, I. R. A.; CÂNDIDO, M. J. D.; POMPEU, R. C. F. F.; FEITOSA, T. S.; BOMFIM, M. A. D.; SALLES, H. O.; EGITO, A. S. do. Inactivation of lectins from castor cake by alternative chemical compounds. **Toxicon**, v. 160, p. 47–54, 2019. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.02.003. Acesso em: 13 mar. 2024.
- ARAÚJO, R.A.; NEIVA, J.N.M.; ROGÉRIO, M.C.P.; CÂNDIDO, M.J.D.; EGITO, A.S.; PEREIRA, P.L.; LUCAS, R.C.; POMPEU, R.C.F.F. Destoxificação e perfil nutricional da torta de mamona destoxificada por diferentes soluções alcalinas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.72, n.5, p.1947-1958, 2020. DOI 10.1590/1678-4162-11418. Acesso em; 22 jan. 2025.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. Disponível em: DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3. Acesso em: 15 mar. 2024.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, Brasília, DF, v.12 – Safra 2024/25, n.7 - Sétimo levantamento, p. 1-128, abril 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/conab/pt-br/atuacao/informacoes-agropecuarias/safras/safra-de-graos/boletim-da-safra-de-graos/7o-levantamento-safra-2024-25/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 24 abr. 2025.

CARVALHO, L.M.; LUZ, M.S.; FREIRE, L.S.; ROCHA, M.M. Influência do tratamento térmico frente aos compostos antinutricionais em feijão-caupi. **Revista de Nutrição e Vigilância em Saúde**, v.10, n. 1, e. 10227, 2023. ISSN: 2357- 9617. Disponível em: DOI 10.59171/nutrivisa-2023v10e10227. Acesso em: 17 jan. 2025.

FAOSTAT. Statistics of Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fao.org**, 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> Acesso em: 15 mar. 2025.

FERNANDES, K.V.; DEUS-DE-OLIVEIRA, N.; GODOY, M.G.; GUIMARÃES, Z.A.S.; NASCIMENTO, V.V.; DE MELO, E.J.T.; FREIRE, D.M.G.; DANSA-PETRETSKI, M.; MACHADO, O.L.T. Simultaneous allergen inactivation and detoxification of castor bean cake by treatment with calcium compounds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 1002-1010, 2012. DOI: 10.1590/S0100-879X2012007500132. Acesso em: 15 abr. 2024.

HERRERA, M.D., JIMÉNEZ-OCAMPO, R., ROSALES-SERNA, R., RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, J.A., RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, J.A., SANTOS-DE LA CRUZ, J.L., CRUZ-BRAVO, R.K., ALVARADO- AGUILAR, P., GAMBOA-GÓMEZ, C.I., GAMBOA-GÓMEZ, C.I., GUERRERO-ROMERO, F. A simple thermal-detoxified method for castor bean (*Ricinus communis* L.) cake, and its potential nutraceutical properties. **Industrial Crops Products**. v. 174, e. 114151, 2021. ISSN 0926-6690. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114151> Acesso em: 16 jan. 2025.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 376–381, 1974. Acesso em: 28 fev. 2024.

LIMA, C. B.; COSTA, F. G. P.; LUDKE, J. V.; LIMA JÚNIOR, D. M.; MARIZ, T. M. A.; PEREIRA, A. A.; SILVA, G. M.; ALMEIDA, A. C. A. Fatores antinutricionais e

processamento do grão de soja para alimentação animal. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 10, n. 4, p. 24–33, 2014. ISSN 1808-6845. DOI 10.30969/acsa.v10i4.452. Disponível em: <http://www.cstr.ufcg.edu.br/acsa/> Acesso em: 17 jan. 2025.

MATOS, F. J. A.; LORENZI, H.; SANTOS, L. F. L.; MATOS, M. E. O.; SILVA, M. G. V.; SOUSA, M. P. Plantas tóxicas: estudos de fitotoxicologia química de plantas brasileiras. São Paulo, Instituto Plantarum de Estudos de Flora. 2011. 247 p. ISBN 85-86714-37-5

MARTIUS, C. F. P. VON; EICHLER, A. W.; URBAN, I. (Eds.). Flora brasiliensis. A Obra. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. v. 11, Part 2, p. 420-422, tab. 60. 1840-1906. Livro eletrônico. Disponível em: <https://florabrasiliensis.cria.org.br/taxonCard?id=FB9681>. Acesso em: 28 fev. 2025.

NITBANI, F. O.; TJITDA, P. J. P.; WOGO, H. E.; DETHA, A. I. R. Preparation of ricinoleic acid from castor oil: A review. **Journal of Oleo Science**, v. 71, n. 6, p. 781–793, 2022. DOI:10.5650/jos.ess21226. Acesso em: 28 mar. 2024.

ROCHA, A. C.; ALVES, F. G. S.; SALLES, H. O.; POMPEU, R. C. F. F.; LUDKE, J. V.; SEVERINO, L. S.; CÂNDIDO, M. J. D. The industrial process of solvent extraction of castor oil reduces the toxicity of the meal. **Industrial Crops and Products**. v. 181, n. 114800, p. 114800, 2022. DOI:10.1016/j.indcrop.2022.114800. Acesso em: 28 fev. 2024.

SALLES, H. O.; BRAGA, A. C. L.; NASCIMENTO, M. T. S. C.; SOUSA, A. M. P.; LIMA, A. R.; VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; EGITO, A. S.; ANDRADE, L. B. S. Lectin, hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 136-143, 2014. DOI:10.1590/S1984-29612014050. Acesso em: 28 fev. 2024.

SHI, L.; MU, K.; ARNTFIELD, S. D.; NICKERSON, M. T. Changes in levels of enzyme inhibitors during soaking and cooking for pulses available in Canada. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 4, p. 1014–1022, 2017. DOI: 10.1007/s13197-017-2519-6. Acesso em: 16 abr. 2024.

SILVA, A.C.; HENRIQUE, H.M.; AVELAR, C.E.B.; DAMASCENO, J.J.R.; HORI, C.E. Study and Optimization of Reaction of Hydration of Calcium Oxide to Produce Slaked Lime Suspension. **Materials Science Forum (Online)**, v. 591-593, p. 816-820, 2008. DOI . Acesso



em: 23 jan. 2025.

SILVA, R. G. G.; VASCONCELOS, I. M.; FILHO, A. J. U. B.; CARVALHO, A. F. U.; SOUZA, T. M.; GONDIM, D. M. F.; VARELA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. T. A. Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 48–55, 2015. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.02.058. Acesso em: 28 mar. 2024.

SOUZA, L. C. M.; CARVALHO, L. P.; ARAÚJO, J. S.; MELO, E. J. T.; MACHADO, O. L. T. Cell toxicity by ricin and elucidation of mechanism of Ricin inactivation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.113, p. 821–828, 2018. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.024. Acesso em: 17 jan. 2025.

SOUZA, Pedro. F. N. The forgotten 2S albumin proteins: Importance, structure, and biotechnological application in agriculture and human health. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 4638–4649, 2020. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.09.049. Acesso em: 28 mar. 2024.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

Os achados deste estudo demonstram que, mesmo após o processamento industrial, as sementes de mamona ainda contêm inibidores de tripsina com atividade funcional. Tais compostos apresentam elevada estabilidade térmica e baixa massa molecular, dificultando a inativação por métodos convencionais. No entanto, o tratamento químico com CaO mostrou-se uma estratégia eficaz, destacando-se como uma solução viável para a neutralização desses fatores antinutricionais, com potencial para melhorar a qualidade e a segurança dos produtos derivados das sementes de mamona para uso na alimentação animal. Futuras investigações podem explorar a aplicabilidade desta abordagem em larga escala e avaliar os impactos sobre outros componentes bioativos presentes no material industrial.

## REFERÊNCIAS

- AKANDE, T. O.; ODUNSI, A. A.; AKINFALA, E. O. A review of nutritional and toxicological implications of castor bean (*Ricinus communis* L.) meal in animal feeding systems. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 100, n. 2, p. 201–210, 2016. DOI:10.1111/jpn.12360. Acesso em: 22 mar. 2024.
- ALI, S.; GANAI, B. A.; KAMILI, A. N.; BHAT, A. A.; MIR, Z. A.; BHAT, J. A.; TYAGI, A.; ISLAM, S. T.; MUSHTAQ, M.; YADAV, P.; RAWAT, S.; GROVER, A. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. **Microbiological Research**, v. 212–213, p. 29–37, 2018. DOI:10.1016/j.micres.2018.04.008. Acesso em: 30 mar. 2024.
- ANANDAN, S., KUMAR, G.K.A., GHOSH, J., RAMACHANDRA, K.S., 2005. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal Feed Science Technology** 120, 159–168. doi:10.1016/j.anifeedsci.2004.10.002 Acesso em: 18 jan. 2025.
- ANDRADE, I. R. A.; CÂNDIDO, M. J. D.; POMPEU, R. C. F. F.; FEITOSA, T. S.; BOMFIM, M. A. D.; SALLES, H. O.; EGITO, A. S. do. Inactivation of lectins from castor cake by alternative chemical compounds. **Toxicon**, v. 160, p. 47–54, 2019. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.02.003. Acesso em: 13 mar. 2024.
- AVILÉS-GAXIOLA, S.; CHUCK-HERNÁNDEZ, C.; SERNA SALDÍVAR, S. O. Inactivation Methods of Trypsin Inhibitor in Legumes: A Review: Inactivation of trypsin inhibitors **Journal of Food Science**, v. 83, n. 1, p. 17–29, 2018. DOI:10.1111/1750-3841.13985. Acesso em: 13 mar. 2024.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. Disponível em: DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3. Acesso em: 15 mar. 2024.
- BREITENEDER, H.; MILLS, E. N. C. Plant food allergens - Structural and functional aspects of allergenicity. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 6, p. 395–399, 2005. DOI:10.1016/j.biotechadv.2005.05.004. Acesso em: 28 mar. 2024.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, Brasília, DF, v.12 – Safra 2024/25, n.7 - Sétimo levantamento, p. 1-128, abril 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/conab/pt-br/atuacao/informacoes-agropecuarias/safras/safra-de-graos/boletim-da-safra-de-graos/7o-levantamento-safra-2024-25/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 24 abr. 2025.

CHEN, G. Q.; HE, X.; LIAO, L. P.; MCKEON, T. A. 2S albumin gene expression in castor plant (*Ricinus communis* L.). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 9, p. 867–872, 2004. DOI 10.1007/s11746-004-0993-5. Acesso em: 17 mar. 2024.

DA SILVA, J. G., JR, MACHADO, O. L., IZUMI, C., PADOVAN, J. C., CHAIT, B. T., MIRZA, U. A., & GREENE, L. J. Amino acid sequence of a new 2S albumin from *Ricinus communis* which is part of a 29-kDa precursor protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 336, n.1, p.10–18, 1996. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0526>. Acesso em: 17 fev. 2025.

DE CONINCK, T.; VAN DAMME, E. J. M. Review: The multiple roles of plant lectins. **Plant Science**, v. 313, p. 111096, 2021. DOI: 10.1016/j.plantsci.2021.111096. Acesso em: 12 mar. 2024.

DOS SANTOS, C.; FRANCO, O. L. Pathogenesis-related proteins (PRs) with enzyme activity activating plant defense responses. **Plants**, v. 12, n. 11, p. 2226, 2023. DOI 10.3390/plants12112226. Acesso em: 28 mar. 2024.

DUBOIS, J.-L.; PICCIRILLI, A.; MAGNE, J.; HE, X. Detoxification of castor meal through reactive seed crushing. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 194–199, 2013. DOI 10.1016/j.indcrop.2012.07.012. Acesso em: 8 mar. 2024.

FAROOQ, M. A.; ALI, S.; HASSAN, A.; TAHIR, H. M.; MUMTAZ, S.; MUMTAZ, S. Biosynthesis and industrial applications of  $\alpha$ -amylase: a review. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 1281–1292, 2021. DOI:10.1007/s00203-020-02128-y. Acesso em: 16 abr. 2024.

FERNANDES, K.V.; DEUS-DE-OLIVEIRA, N.; GODOY, M.G.; GUIMARÃES, Z.A.S.; NASCIMENTO, V.V.; DE MELO, E.J.T.; FREIRE, D.M.G.; DANSÁ-PETRETSKI, M.; MACHADO, O.L.T. Simultaneous allergen inactivation and detoxification of castor bean cake by treatment with calcium compounds. **Brazilian Journal of Medical and Biological**

**Research**, v. 45, p. 1002-1010, 2012. DOI: 10.1590/S0100-879X2012007500132. Acesso em: 15 abr. 2024.

FOUDA, T.; ELKHOLY, M.; ELMETWALLI, A. H.; SALEH, D. Effect of infra-red and ultraviolet radiation on sterilization and trypsin inhibitor deactivation of cowpea seeds.

**Scientific Papers Series Management, Economic, Engineering in Agriculture and Rural Development**, v. 21, n. 3, p. 379-386, 2021. ISSN 2284-7995, E-ISSN 2285-3952. Acesso em: 15 abr. 2024.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; BLOCH, C., Jr; SILVA, C. P.; GROSSI DE SÁ, M. F. Activity of wheat alpha-amylase inhibitors towards bruchid alpha-amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 8, p. 2166–2173, 2000. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01199.x. Acesso em: 15 jan. 2025.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases: Structure, function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 397–412, 2002. DOI 10.1046/j.0014-2956.2001.02656.x. Acesso em: 28 mar. 2024.

GARDNER, H. K., JR.; D'AQUIN, E. L.; KOLTUN, S. P.; MCCOURTNEY, E. J.; VIX, H. L. E.; GASTROCK, E. A. Detoxification and deallergenization of castor beans. **Journal American Oil Chem Society**, v. 37, p. 142-148, 1960, DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02644933>. Acesso em: 15 abr. 2024.

GURUMALLESH, P.; ALAGU, K.; RAMAKRISHNAN, B.; MUTHUSAMY, S. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254–267, 2019b. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081>. Acesso em: 16 abr. 2024.

JACKSON, Lauren S.; TOLLESON, William H.; CHIRTEL, Stuart J. Thermal inactivation of ricin using infant formula as a food matrix. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 54, n. 19, p. 7300–7304, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf061199n> Acesso em: 30 jan. 2025.

JENKINS, F. P. Allergenic and toxic components of castor bean meal: Review of the literature and studies of the inactivation of these components. **Journal of the Science of Food and**

**Agriculture**, v. 14, p. 773-780, 1963. DOI: 10.1002/jsfa.2740141101. Acesso em 15 abr. 2024.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 376–381, 1974. Acesso em: 28 fev. 2024.

KAUR, S.; SAMOTA, M. K.; CHOUDHARY, M.; CHOUDHARY, M.; PANDEY, A. K.; SHARMA, A.; THAKUR, J. How do plants defend themselves against pathogens- Biochemical mechanisms and genetic interventions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 28, n. 2, p. 485–504, 2022. DOI:10.1007/s12298-022-01146-y. Acesso em: 28 mar. 2024.

KONG, X.; LI, Y.; LIU, X. A review of thermosensitive antinutritional factors in plant-based foods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 83, n. 9, 2022. DOI:10.1111/jfbc.14199. Acesso em: 02 abr. 2024.

LIMA, C. B.; COSTA, F. G. P.; LUDKE, J. V.; LIMA JÚNIOR, D. M.; MARIZ, T. M. A.; PEREIRA, A. A.; SILVA, G. M.; ALMEIDA, A. C. A. Fatores antinutricionais e processamento do grão de soja para alimentação animal. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 10, n. 4, p. 24–33, 2014. ISSN 1808-6845. DOI 10.30969/acsa.v10i4.452. Disponível em: <http://www.cstr.ufcg.edu.br/acsa/> Acesso em: 17 jan. 2025.

MACHADO, O. L.; SILVA JÚNIOR, J. G. An allergenic 2S storage protein from *Ricinus communis* seeds which is a part of the 2S albumin precursor predicted by c-DNA data. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, p. 567-82, 1992. PMID: 1342233. Acesso em: 10 abr. 2024.

MARTIUS, C. F. P. VON; EICHLER, A. W.; URBAN, I. (Eds.). Flora brasiliensis. A Obra. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. v. 11, Part 2, p. 420-422, tab. 60. 1840-1906. Livro eletrônico. Disponível em: <https://florabrasiliensis.cria.org.br/taxonCard?id=FB9681>. Acesso em: 28 fev. 2025.

MATOS, F. J. A.; LORENZI, H.; SANTOS, L. F. L.; MATOS, M. E. O.; SILVA, M. G. V.; SOUSA, M. P. Plantas tóxicas: estudos de fitotoxicologia química de plantas brasileiras. São Paulo, Instituto Plantarum de Estudos de Flora. 2011. 247 p. ISBN 85-86714-37-5

MILANI, Máira. Embrapa. 2005. *il.*

[https://www.embrapa.br/documents/58057223/67208067/Exemplos%2Bde%2Bdiferentes%2Bcoloracoes%2Bnos%2Bfrutos%2Bde%2Bmamoneira%2Bverde\\_000h0fjb3xy02wx7ha07d3364tqpl3sc.jpg/8588e1da-0220-fc94-a33c-36a34e9b1577?t=1640011290097](https://www.embrapa.br/documents/58057223/67208067/Exemplos%2Bde%2Bdiferentes%2Bcoloracoes%2Bnos%2Bfrutos%2Bde%2Bmamoneira%2Bverde_000h0fjb3xy02wx7ha07d3364tqpl3sc.jpg/8588e1da-0220-fc94-a33c-36a34e9b1577?t=1640011290097)

MONDAL, B.; BERA, M.; DAS, S. K. Castor bean cake: A paradox of toxicity and nutrient source in farm animals and aquaculture. **Indian Journal of Animal Health**, v. 58, n. 02, p. 157-170, 2019. DOI:10.36062/ijah.58.2.2019.157-170. Acesso em: 8 abr. 2024.

NASCIMENTO, V.V.; CASTRO, H. C.; ABREU, P. A.; OLIVEIRA, A. E. A.; FERNANDEZ, J. H.; ARAUJO, J. S.; MACHADO, O. L. T.; *In Silico* Structural Characteristics and  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Properties of Ric c 1 and Ric c 3, Allergenic 2S Albumins from *Ricinus communis* Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 4814–4821, 2011. DOI: dx.doi.org/10.1021/jf104638b Disponível em: pubs.acs.org/JAFC. Acesso em: 16 abr. 2024.

NITBANI, F. O.; TJITDA, P. J. P.; WOGO, H. E.; DETHA, A. I. R. Preparation of ricinoleic acid from castor oil: A review. **Journal of Oleo Science**, v. 71, n. 6, p. 781–793, 2022. DOI:10.5650/jos.ess21226. Acesso em: 28 mar. 2024.

OKORIE, A. U.; ANUGWA, F. O. I. The feeding value of roasted castor bean (*Ricinus communis*) to growing chicks. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 37, p. 97-102, 1987. DOI:10.1007/BF01092044. Acesso em 15 Abr. 2024.

PANTOJA-UCEDA, D.; BRUIX, M.; SANTORO, J.; RICO, M.; MONSALVE, R.; VILLALBA, M. Solution structure of allergenic 2 S albumins. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 919–924, 2002. DOI: 10.1042/bst0300919. Acesso em: 15 abr. 2024.

RAM, S.; NARWAL, S.; GUPTA, O. P.; PANDEY, V.; SINGH, G. P. Anti-nutritional factors and bioavailability: approaches, challenges, and opportunities. **Wheat and Barley Grain Biofortification**, p. 101–128. 2020. DOI:10.1016/B978-0-12-818444-8.00004-3. Acesso em: 28 mar. 2024.

ROCHA, A. C.; ALVES, F. G. S.; SALLES, H. O.; POMPEU, R. C. F. F.; LUDKE, J. V.; SEVERINO, L. S.; CÂNDIDO, M. J. D. The industrial process of solvent extraction of castor

oil reduces the toxicity of the meal. **Industrial Crops and Products**, v. 181, n. 114800, p. 114800, 2022. DOI:10.1016/j.indcrop.2022.114800. Acesso em: 28 fev. 2024.

SALLES, H. O.; BRAGA, A. C. L.; NASCIMENTO, M. T. S. C.; SOUSA, A. M. P.; LIMA, A. R.; VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; EGITO, A. S.; ANDRADE, L. B. S. Lectin, hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 136-143, 2014. DOI:10.1590/S1984-29612014050. Acesso em: 28 fev. 2024.

SÁNCHEZ-GÓMEZ, T.; SANTAMARÍA, O.; MARTÍN-GARCÍA, J.; POVEDA, J. Seed extracts as an effective strategy in the control of plant pathogens: Scalable industry bioactive compounds for sustainable agriculture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 60, p. 103332, 2024. ISSN 1878-8181. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103332>. Acesso em: 15 mar. 2025.

SEVERINO, L. S.; MILANI, M.; BELTRÃO, N. E. M. Mamona: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 248 p. il. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/101777/1/500perguntasmamona.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2024.

SEVERINO, L.S.; MENDES, B.S.S.; SABOYA, R.C.C.; BARROS, L.A.; MARINHO, D.R.F. Nutrient content of solvent-extracted castor meal separated in granulometric fractions by dry sieving and applied as organic fertilizer. **Industrial Crops & Products**, v. 161, 113178, 2021. DOI 10.1016/j.indcrop.2020.113178. Acesso em: 17 jan. 2025.

SHI, L.; MU, K.; ARNTFIELD, S. D.; NICKERSON, M. T. Changes in levels of enzyme inhibitors during soaking and cooking for pulses available in Canada. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 4, p. 1014–1022, 2017. DOI: 10.1007/s13197-017-2519-6. Acesso em: 16 abr. 2024.

SILVA, R. G. G.; VASCONCELOS, I. M.; FILHO, A. J. U. B.; CARVALHO, A. F. U.; SOUZA, T. M.; GONDIM, D. M. F.; VARELA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. T. A. Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae. **Industrial**



**Crops and Products**, v. 70, p. 48–55, 2015. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.02.058. Acesso em: 28 mar. 2024.

SOUZA, P. F. N.; VASCONCELOS, I. M.; SILVA, F. D. A.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; ALENCAR, L. M. R.; ABREU, A. S. G.; SOUSA, J. S.; OLIVEIRA, J. T. A. A 2S albumin from the seed cake of *Ricinus communis* inhibits trypsin and has strong antibacterial activity against human pathogenic bacteria. **Journal of Natural Products**. v. 79, n. 10, p. 2423–2431, 2016. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01096. Acesso em: 16 abr. 2024.

SOUZA, Pedro. F. N. The forgotten 2S albumin proteins: Importance, structure, and biotechnological application in agriculture and human health. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 4638–4649, 2020.

DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.09.049. Acesso em: 28 mar. 2024.

SOWA-ROGOZIŃSKA, N.; SOMINKA, H.; NOWAKOWSKA-GOŁACKA, J.; SANDVIG, K.; SŁOMIŃSKA-WOJEWÓDZKA, M. Intracellular transport and cytotoxicity of the protein toxin ricin. **Toxins**, v. 11, n. 6, p. 350, 2019. DOI: 10.3390/toxins11060350. Acesso em: 2 abr. 2024.

TUMER, N. E. Introduction to the toxins special issue “ricin toxins”. **Toxins**, v. 12, n. 1, p. 13, 2019. DOI: 10.3390/toxins12010013. Acesso em: 28 mar. 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. Biblioteca Universitária. **Guia de normalização de trabalhos acadêmicos da Universidade Federal do Ceará**. Fortaleza, 2013. Acesso em: 16 abr. 2024.

VAZ JÚNIOR, Silvio. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: uma abordagem sustentável. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Agroenergia/ Documentos, 31. Brasília - DF, 2020. ISSN 2177-4439. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1126255>. Acesso em: 10 abr. 2024.

WORBS, S.; SKIBA, M.; SÖDERSTRÖM, M.; RAPINOJA, M.-L.; ZELENY, R.; RUSSMANN, H.; SCHIMMEL, H.; VANNINEN, P.; FREDRIKSSON, S.-Å.; DORNER, B. G. Characterization of ricin and *R. communis agglutinin* reference materials. **Toxins**, v. 7, n. 12, p. 4906–4934, 2015. DOI:10.3390/toxins7124856. Acesso em: 15 mar. 2024.

YOULE, R. J.; HUANG, A. H. Albumin storage proteins in the protein bodies of castor bean. **Plant physiology**, v. 61, n. 1, p. 13–16, 1978. DOI: 10.1104/pp.61.1.13. Acesso em: 15 abr. 2024.