UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

OBTENÇÃO DE ISOLADOS PROTÉICOS A PARTIR DE FARELO DESENGORDURADO DE MAMONA (Ricinus communis).

Pablo Francisco Pólit Corral
Engenheiro Químico

Orientador
Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos.

- 1975 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À MEUS PAIS

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Valdemiro C. Sgarbieri, pela orientação e amizade brindada durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Organização dos Estados Americanos.

Ao "Instituto de Investigaciones Tecnológicas" da "Escuela Politécnica Nacional", Quito, Ecuador.

Ao pessoal docente, técnico e de serviço do departamento de Bioquímica da Faculdade de Tecnologia de Alimentos.

Ao pessoal docente e administrativo da Faculdade de Tecnologia de Alimentos, que de uma ou outra maneira colaboraram na realização do trabalho.

À Nair Odete de Campos, pela sua colaboração na tradução e redação do trabalho.

ÍNDICE GERAL

	Página
Índice de Quadros e Figuras	iii
Resumo	vi
Summary	viii
Introdução	1
Revisão Bibliográfica	4
1. Extração do óleo	4
2. Uso do farelo de mamona como adubo	5
3. Fatores tóxicos contidos na mamona	5
4. Fatores alergênicos	8
5. Desintoxicação e daselerginização dos farelos de mamona	11
6. Uso do farelo de mamona como ração animal	12
Material e Métodos	16
1. Material	16
2. Métodos	19
1. Análises Físicas e Químicas gerais	19
2. Extração do óleo para a obtenção dos farelos	22
3. Efeito de alguns fatores na extração das proteínas	24
4. Obtenção dos isolados protéicos	26
5. Ensaios biológicos	27
Resultados e Discussão	32
1. Composição da matéria prima	32
2. Composição dos farelos desengordurados	32
3. Estudo da influência de alguns fatores na extração das proteínas	35
4. Obtenção dos isolados protéicos	52
5. Obtenção do extrato crú	62
6. Análise dos isolados protéicos, do extrato crú e da caseína empregada nos ensaios biológicos	62

Página

7. Determinação dos aminoácidos nos isolados proteícos 64
8. Análise dos alergênicos 67
9. Determinação do valor biológico 68

Conclusões 72

Bibliografia 73

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO Nº		Página
1.	Área plantada e produção de mamona (Ricinus communis).	1
2.	Algumas propriedades de diferentes frações da ricina.	7
3.	Composição centesimal das dietas utilizadas nos ensaios biológicos.	28
4.	Composição da mistura salina.	29
5.	Composição da mistura vitamínica utilizada nas dietas para os ensaios biológicos.	30
6.	Composição das sementes de mamona variedade "Guarani".	32
7.	Composição dos farelos de mamona, após extração do óleo.	33
8.	Análise granulométrica dos farelos.	35
9.	Extração das proteínas dos farelos a diversos valores de pH.	37
10.	Extração das proteínas com soluções de NaOH de diversas concentrações.	40
11.	Extração das proteínas com diferentes soluções salinas a várias concentrações.	44
12.	Efeito combinado de soluções salinas e meio alcalino na extração das proteínas.	48
13.	Extração das proteínas dos farelos empregando-se como solventes NaOH a pH 11 e NaOH 0,5%.	57
14.	Porcentagens de extração e de recuperação na obtenção dos isolados protéicos a partir dos farelos, empregando-se como solventes	

QUADRO Nº PÁGINA

NaOH à pH 11 e NaOH 0,5%. 61

15. Composição dos isolados protéicos, do extrato crú e da caseína empregada nos ensaios biológicos. 63

16. Composição em aminoácidos das proteínas contidas nos isolados protéicos. 66

17. Resultados dos ensaios biológicos. 69

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA Nº PÁGINA

1. Esquema do aparelho usado para o tratamento térmico das sementes 18

2. Curva padrão para a dosagem das proteínas pelo método do biureto. 21

3. Perfis de umidade e temperatura durante a cocção antes da extração com hexana. 34

4. Extração das proteínas dos farelos a diversos valores de pH. 39

5. Extração das proteínas dos farelos com soluções de NaOH. 42

6. Extração das proteínas com diferentes soluções salinas a várias concentrações 46

7. Efeito combinado de soluções salinas e meio alcalino na extração das proteínas. 49

8. Extração das proteínas em função do tempo de contato e da temperatura. 51

FIGURA Nº PÁGINA

9. Diagrama de fluxo do processo utilizado na obtenção dos isolados protéicos. 56

10. Extração das proteínas dos farelos empregando-se como solventes NaOH à pH 11 e NaOH 0,5% 58

11. Determinação do pH de menor solubilidade das proteínas nos extratos do farelo hexana obtidos com NaOH pH 11 e NaOH 0,5% 59

RESUMO

A finalidade deste estudo foi a obtenção de um isolado protéico aplicável em alimentação animal a partir do farelo de sengordurado de mamona (Ricinus communis).

Efetuou-se o estudo de alguns fatores visando máxima recuperação das proteínas a partir do farelo de mamona desengordurado, a determinação da composição em aminoácidos das mesmas e o seu valor biológico.

Prepararam-se no laboratório os farelos por dois processos diferentes: a) por trituração das sementes e extração com éter etílico (farelo éter); b) por trituração das sementes seguida de cocção a 100°C com umidade controlada, suspensão em hexana quente e filtração (farelo hexana).

As proteínas foram extraídas pela suspensão do farelo em um solvente aquoso, agitação, seguida de eliminação dos sólidos insolúveis por centrifugação.

Mudando o pH do solvente aquoso verificou-se que , partindo de pH 2, a extração das proteínas aumentou até atingir um máximo em pH 3,8, decresceu em seguida até um valor mínimo em pH 5,8, aumentando rápida e significativamente em pH alcalino.A extração em pH alcalino com soluções contendo NaOH 0,5% foi praticamente máxima.

A adição de sais aumentou a extratibilidade das proteínas em relação à conseguida com água, alcançando-se máxima extração com NaCl 1,5M, $CaCl_2$ 1,25M, Na_3PO_4 1,5M e Na_2SO_4 0,7M. A eficiência da extração foi maior para o NaCl, decrescendo para os demais sais na mesma ordem citada, sendo, porém, que a adição de sais não aumentou a extração das proteínas quando usado um pH maior ou igual a 11.

A temperatura de mais alta extração foi 45°C,e o tempo para se atingir o equilíbrio na concentração do extrato (má-

xima solubilização) foi de 10 minutos quando usada uma relação farelo-solvente 1:5 p/v.

As proteínas extraídas em soluções alcalinas (pH 11 e NaOH 0,5%) apresentaram máxima precipitação em pH 5,8 e 4,5 respectivamente.

Os níveis de extração e recuperação das proteínas obtidas a partir dos dois farelos, feita a precipitação no "pI" ,seguida de ebulição por 5 minutos, filtração e secagem foram: a) farelo éter extraído a pH 11, 85,98% extração e 63,8% recuperação; b) farelo éter extraído com NaOH 0,5%, 88,66% extração e 72,26% recuperação; c) farelo hexana extraído a pH 11, 58,18% extração e 38,72% recuperação; d) farelo hexana extraído com NaOH 0,5%, 74,74% extração e 57,85% recuperação.

A determinação dos aminoácidos das proteínas dos isolados evidenciou que, com o emprego de tratamentos mais enérgicos (maior tratamento térmico e maior alcalinidade do solvente), se produz uma destruição parcial de alguns deles, sendo crítica a situação sobretudo com a lisina e sulfurados que já se encontram em quantidades limitantes mesmo no isolado éter pH 11.

Os testes de alimentação com ratos, mostraram que os isolados protéicos foram não tóxicos e o NPU das proteínas neles contidas de 36% (semelhante ao do glutem de trigo). No caso do isolado éter pH 11, o NPU foi de 45,95% (semelhante ao do levedo seco ou farelo de amendoim). O isolado hexana pH 11 enriquecido com L-lisina e DL-metionina elevou o NPU a 49,22% (semelhante ao do farelo de copra, mas inferior ao da soja ou algodão).

SUMMARY

The purpose of this study was to obtain a protein isolate from deffated castor bean pomance for use as animal foodstuff.

Maximum extraction and recovery of the proteins from the castor bean pomance was studied. The amino acid composition were determined on the proteins of all isolates and the nutritive value estimated by biolocal assays.

Two tipes of castor pomance were prepared: a) by crushing the seeds and extracting the oil with ethyl eter, and b) crushing the seeds and cooking the resulting paste at 100°C under controlled humidity, following the extraction of oil with hot hexane by suspention, agitation and filtration.

Increasing pH of the aqueous solvent starting with pH 2 resulted in increased extraction reaching a maximum at pH 3.8, decreasing to a minimum at pH 5.8 and then, increasing rapidly and significantly in alkaline pH. Extraction with 0.5% NaOH solutions was practically maximum.

The addition of salts increased the protein extractability in relation to aqueous extraction. Maximum extraction was reached with 1.5M NaCl, 1.25M $CaCl_2$, 1.5M Na_3PO_4, and 0.7M Na_2SO_4, the efficiency decreasing in the same order. Salt addition did not increase the extraction when used at pH 11 or higher.

Using alkaline solvents, better extractions were obtained at 45°C. With a pomance-solvent ratio 1:5 w/v 10 minutes were needed to reach maximum extraction.

The proteins extracted with alkaline solutions (pH 11 and 0.5% NaOH) had a "pI" of 5.8 and 4.5 respectively.

Different isolates were obtained by extracting the two pomances with alkaline solutions following precipitation

of the proteins in the "pI", boiling the extracts for 5 minutes, filtrating and drying the isolated proteins.

The extent of extraction and recoveries were as follows: a) eter pomance extracted with NaOH at pH 11, 85.98% extraction and 63.8% recovery; b) eter pomance extracted with 0.5% NaOH , 88.66% and 72.26% ; c) hexane pomance extracted with NaOH at pH 11, 58.18% and 38.72% ; d) hexane pomance extracted with 0.5% NaOH, 74.74% and 57.85%, respectively.

Determination of amino acid composition of the isolates revealed that increasing the heat treatment and solvent alkalinity increased the destruction of certain amino acids. This was critical for lysine and the sulfur-containing amino acids which are limiting essential amino acids in castor bean proteins.

Feeding tests with rats showed absence of toxicity in the isolates proving the efficiency of the heat treatment.

The averange NPU of the proteins was 36% (similar to wheat gluten). The NPU of the isolate obtained from the eter pomance extracted at pH 11 was 45.95% (similar to dryed yeast or groundnut meal). The addition of 3% L-lysine and 1.54% DL-methionine to the isolate obtained from the hexane pomance extracted at pH 11, raised the NPU to 49.22% (similar to copra meal but inferior to that of soya or cottonseed meal).

INTRODUÇÃO

A mamona (Ricinus communis) denominada nos países de lingua espanhola como "Higuerilla", é uma oleaginosa conhecida há muito tempo, acreditando-se ser originária da Índia. Encontra-se largamente distribuída nas zonas tropicais e em zonas próximas a elas como uma planta perene e é cultivada nas zonas temperadas como cultura anual (4).

Os dados referentes à área plantada e produção tomados do "Anuário F.A.O." (8) são apresentados no Quadro 3.

QUADRO 3. - ÁREA PLANTADA E PRODUÇÃO DE MAMONA (Ricinus communis). (Ano 1973)

País ou região	Área 1000 Ha.	Produção 1000 Ton.
África	108	64
Norte e Centro América	23	15
América do Sul	444	441
Brasil	400	395
Equador §	22	20
Ásia	681	289
Europa	19	10
URSS	216	80
Mundial	1491	899

Fonte: "F.A.O. Anuario de Producción 1973", pág. 133.

§ Uma comunicação pessoal recebida da Secretaria da Produção do Equador dá uma estimativa de produção para o ano de 1975 de 50.000 Ton.

A semente de mamona fornece 50% de óleo com um conteúdo de ácido ricinolêico de 93% (42) o que confere ao mesmo características muito especiais como: a) solubilidade em álcool; b) pouca solubilidade em éter de petróleo; c) solúvel somente em hexana quente; d) alta viscosidade e reatividade química.

A fim de ressaltar a importância da mamona e as possibilidade de expansão do seu cultivo, apresenta-se em seguida uma breve descrição de algumas das aplicações do óleo (42) a saber: a) é empregado na fabricação de resinas alquídicas; b) em couros artificiais, misturas adesivas e plastificantes; c) na produção de intermediários da síntese de perfumes e sabores; d) como óleo secante substituindo os de tungue e linhaça; e) como coadjuvante no processo de desagregação da borracha durante a sua refinação; f) como sinergista de inseticidas; g) como óleo lubrificante, sobretudo se transformado em ácido sebácico e dioctil sebaçato que é o único utilizado em motores a jato; h) na fabricação do "Nylon 610"; i) em perfumaria, detergentes sintéticos e como agente umectante; j) na fabricação de ceras; k) em medicina, etc...

Na produção do óleo de mamona obtém-se, como subproduto, o farelo desengordurado numa quantidade praticamente igual à do óleo, sendo que este contém 32-36% de proteína.

Pelas suas propriedades tóxicas que serão relatadas no próximo capítulo, o farelo tem sido usado quase somente como adubo, em regiões de solos em que é aconselhável a liberação lenta de nitrogênio, e ainda assim o seu uso é restrito (9).

Isso torna o preço do farelo de mamona bem menor que o de outros farelos de oleaginosas que são utilizados na fabricação de rações animais (42).

Em vista dos fatos anteriormente anotados, pode-se afirmar que o estudo visando a desintoxicação do farelo ou das proteínas nele contidas é de muito interêsse uma vez rejeitada a possibilidade de se obter variedades não tóxicas (4,6). Isto viria valorizar este subproduto fazendo o cultivo e industriali

zação da mamona mais rentável, permitindo o aproveitamento, para rações animais, de 150.000 toneladas anuais de proteína, nesta época em que o mundo sofre a falta deste nutriente indispensável.

Encontra-se na literatura um grande número de estudos para a desintoxicação dos farelos de mamona. O presente trabalho visa o estudo da obtenção de um isolado protéico não tóxico a partir de farelos não desintoxicados, e a determinação do valor biológico das proteínas nele contidas.

O estudo de todas as variáveis envolvidas na industrialização da mamona, abrangendo desde o acondicionamento das sementes antes da extração do óleo, a retirada do mesmo, a desolventização do farelo, a extração das proteínas, a clarificação dos extratos e a recuperação dos isolados protéicos, bem como a estimativa da viabilidade econômica da sua obtenção, implicaria em um tempo e trabalho muito além das nossas possibilidades e fugiria dos limites de uma tese de mestrado.

Restringiu-se, portanto, o trabalho ao estudo de alguns aspectos considerados mais importantes tendo sempre em vista a possibilidade de ampliação de escala de um processo de laboratório para um industrial, ficando, porém, aberto o campo para que, baseando-se nos resultados aqui obtidos, se proceda a continuação da pesquisa de outros pontos que apareçam como necessários para completar o trabalho.

Deve-se notar que, mesmo fora do contexto deste estudo, permanece aberta a possibilidade para o uso das proteínas da mamona para outros fins industriais: em fibras de tecelagem , na fabricação de tintas ou colas etc. (4,15), liberando destes usos outras proteínas de alta qualidade alimentícia como a soja e a caseína.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo, sem ser uma revisão completa de todos os trabalhos publicados sobre o problema em estudo, proporcionará uma visão de conjunto dos principais problemas nele envolvidos e apresentará, além do mais, um resumo sobre os diversos métodos propostos por alguns pesquisadores para a obtenção de farelos desintoxicados e a possibilidade da sua utilização em rações animais, servindo de ponto de partida para fins de comparação com os resultados obtidos no presente trabalho.

1. Extração do óleo.

O óleo de mamona é obtido na indústria por prensagem das sementes, por prensagem e posterior extração com solventes, ou ainda por extração direta com solventes.

No primeiro caso, pode-se diferenciar os processos de dupla prensagem e a extração usando-se prensa "Expeler".

Usando-se prensa hidráulica, a primeira prensagem, processada a 65°C, produz um óleo grau 1 e um resíduo contendo 20% de óleo, e a segunda, processada à 93°C, libera um óleo grau 3 de menor qualidade e um resíduo com 7% de óleo (4).

No caso de usar-se prensa tipo "Expeler", devem ser utilizadas tempraturas maiores, de até 120°C, produzindo óleo de menor qualidade e um resíduo contendo 12% de óleo, sendo aconselhável a extração posterior com solvente, devendo-se notar que este tipo de prensa sofre um desgaste excessivo quando processa mamona e as sementes requerem um acondicionamento prévio maior que no caso do uso de prensa hidráulica (14).

Quando usado o sistema misto de prensagem e extração por solvente, após a prensagem a 60-70°C e a obtenção de um óleo grau 1, submete-se o resíduo que contém 15% de óleo a extra

ção por algumas horas com hexana ou heptana a 90°C produzindo-se um óleo grau 3 e um farelo com 1% de óleo residual (4).

O processo desenvolvido por D'Aquin e colaboradores (7) segundo o qual se recupera o óleo por extração direta com hexana num processo de filtração-extração, produz um óleo grau 1 e um farelo com um conteúdo de óleo residual de 1%. Para a aplicação deste processo, as sementes de mamona devem sofrer um tratamento prévio que implica na moagem e laminação das mesmas e um tratamento posterior de cocção a temperatura e umidade controladas. A extração propriamente dita é realizada com hexana a uma temperatura próxima ao seu ponto de ebulição, numa relação sólido-solvente 1:2 p/p e com um tempo de contato de 45 minutos.

2. Uso do farelo de mamona como adubo.

O farelo de mamona é utilizado como adubo seja em aplicação direta ou na preparação de adubos mistos, devendo-se o seu valor ao seu conteúdo de nitrogênio orgânico (6%), de fósforo (1,83% P_2O_5) e de potássio (1,09% K_2O) (42), bem como de outros oligo-elementos necessários para o crescimento das plantas (4), permitindo atingir os valores de NPK recomendados para vários tipos de cultura de forma prática e econômica sobretudo em áreas onde se precisa uma liberação lenta de nitrogênio (9).

3. Fatores tóxicos contidos na mamona.

3.1. Ricina. - Segundo Liener (19), aparentemente foi Dixon em 1887 o primeiro a reconhecer e isolar a proteína tóxica contida na mamona e o nome de Ricina foi dado por Stillmark em 1889 que, pela característica da fração proteica por ele isolada de aglutinar os glóbulos vermelhos, a classificou como uma "fitohemaglutinina".

Em 1905, Osborne, Mendel e Harris (28), num trabalho considerado como clássico e citado sempre que se fala da ricina, isolaram por extração com NaCl 10%, recuperação da fração solúvel após diálise contra água, e, posterior fracionamento por precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ uma fração protéica (ricina) , que constitue 1,5% do farelo desengordurado. É uma albumina de elevado peso molecular, altamente tóxica e com ação hemaglutinante.

Outros pesquisadores isolaram a ricina empregando variações do sistema de Osborne e colaboradores, encontrando que a mesma é tóxica, hemaglutinante e proteolítica e concluindo que as três propriedades fisiológicas eram intrínsecas da mesma proteína (5)

Pesquisas posteriores demonstraram porém que cada uma das propriedades acima mencionadas deve-se a uma fração protéica diferente (10). Dependendo do sistema de purificação, reportam-se diferentes pesos moleculares, graus de toxicidade e atividades fisiológicas, demonstrando a complexidade da fração protéica denominada genericamente ricina. Um resumo destas descobertas é apresentado no Quadro 2.

QUADRO 2. - ALGUMAS PROPRIEDADES DE DIFERENTES FRAÇÕES DA RICINA.

Fração	Peso Molecular	Atividade Fisiológica		
		Proteolítica.	Hemaglutinante	Toxicidade TU ng N*
Ricina B_1	85.000	?	+	0,40
Ricina cristalina	36.000	?	+	0,25
Ricina TB	70.000	+	+	0,25
Ricina C_1	31.000 66.000	-	-	0,3
Ricina D	60.000	-	-	0,02

*TU (toxic unit) equivale à quantidade em nanogramas de nitrogênio protéico necessária para matar um rato de 20 g em 24 horas.

A ação tóxica da ricina difere da dos venenos de cobras ou de bactérias na relativa facilidade em que pode ser absorvida pela parede intestinal (42). Ainda que a toxicidade seja diminuida quando administrada pela via oral (5), os sintomas são iguais aos apresentados no caso de administração intravenosa.

Uma dose oral de 150 a 200mg de ricina por quilogramo de animal é considerada letal para mamíferos (42). Para o homem, a ingestão de seis sementes tem provado ser fatal (5).

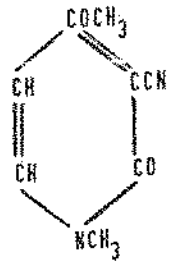
Cabe notar que a ricina é resistente a ação das enzimas proteolíticas precisando longos tempos de incubação para ser desintoxicada.(5).

Embora apresente uma toxicidade tão elevada e esteja

presente em apreciável quantidade no farelo desengordurado, esta proteína não apresenta um problema de difícil solução desde que a mesma é termolábil. Ainda que o calor seco não destrua completamente a toxicidade da proteína, esta coagula quando aquecida em solução aquosa a 60 ou 70°C e perde a toxicidade quando a solução é aquecida a ebulição (5).

Alguns autores afirmam que a desolventização dos farelos extraídos por solvente promove a desintoxicação total da ricina (19,25), enquanto outros reportam que os mesmos apresentam sem exceção alta toxicidade, devendo-se aplicar um tratamento mais enérgico para torná-los inócuos (16).

3.2. Ricinina. Na mamona, tem sido encontrado um alcalóide denominado ricinina com a seguinte fórmula estrutural:



Ricinina

É solúvel em água e álcool e muito pouco solúvel em éter e benzeno. A quantidade contida na planta aumenta constantemente com o crescimento da mesma (4).

Este alcalóide pode ser considerado medianamente tóxico. A quantidade contida na semente, sendo pequena, é diminuida mais ainda durante o processamento. Um farelo obtido em laboratório, por extração etérea, contém 0,1% de ricinina, enquanto que um farelo comercial contém 0,02% (40).

4. Fatores alergênicos.

A fim de se evitar possível confusão causada por má interpretação dos termos, vamos apresentar as definições de Mansmann (20) para os principais têrmos empregados.

Antígeno é uma substância quìmicamente definívvel que, por ser estranha ao animal, induz a síntese de um ou mais componentes imunes específicos, e tem a capacidade de reagir " in vivo" ou "in vitro" com o seu componente imune homólogo.

Antigenicidade é a capacidade inerente de um antígeno de estimular em um animal a produção de um componente específico de um ou mais mecanismos de imunidade.

Alergênico é um antígeno que induz em certos indivíduos um anticorpo denominado "reagina" e tem a capacidade de participar numa reação alérgica numa subsequente exposição.

Alergenicidade é a capacidade inerente a um alergênico de produzir a formação de reagina em animais ou seres humanos sensíveis.

Anticorpos clássicos também denominados imunoglubulinas G , são anticorpos que precipitam ao reagir especìficamente com o seu antígeno. São termoresistentes (estáveis quando submetidos a 56°C por 4 horas) e incapazes de sensibilizar a pele humana.

Anticorpos reagina são encontrados na fração imunoglobulina A de indivíduos sensíveis e são responsáveis pelas reações imediatas de inflamação da pele. São denominados anticorpos sensibilizantes da pele. São destruidos pelo aquecimento a 56°C durante 0,5 a 4 horas.

Alergia atópica é a reação alérgica que produz sintomas após alguns minutos de exposição em pessoas sensíveis (36).

Alergia anafilática é uma reação alergênica que se produz após minutos ou segundos de exposição com sintomas violentos e as vezes fatais (36).

A atividade alergênica da mamona é conhecida desde muito tempo (42) sendo porém Spies e seus colaboradores (34) os que mais estudaram os princípios de sua alergenicidade.

Eles isolaram uma fração glicoprotéica não tóxica a altamente alergênica correspondente a 1,8% do farelo de mamona desengordurado. Estes produtos se caraterizam por ser solúveis em água, solúveis em álcool 25% mas insolúveis em 75% de álcool, não precipitáveis por acetato básico de chumbo, estáveis em água fervente e dializáveis.

A estabilidade térmica dos alergênicos depende das condições em que se encontram, resistindo 1 hora a ebulição em água, e precisando para ser inativos nesse tempo de 150°C se aquecidos a pH 5,9. A pH 12, ou maior, necessitam de 32 minutos a 100°C e de 8 minutos a 120°C (36).

Os pesos moleculares da maioria dos alergênicos se encontram entre 25.000 e 40.000 (36) sendo que os da mamona estão mais próximos do nível inferior (34).

Isolado o alergênico e separados os carboidratos das frações de proteína esta conserva a alergenicidade sendo, porém, diminuida 11 vezes a sua capacidade de sensibilização (35).

Tem sido reportado que, ainda em soluções de $1:10^6$, estes compostos são capazes de produzir reações cutâneas positivas em pessoas sensíveis e que, com 10^{-10}g pode-se induzir anafilaxia cutânea passiva (34). O farelo desengordurado tem causado distúrbios em pesquisadores (16) e pessoas que trabalham ou moram perto de usinas de beneficiamento tendo sido constatados ainda casos de alergia anafilática (42).

Quando o alergênico obtido pelo processo de Spies e colaboradores (34) é submetido à cromatografia em DEAE-celulose e à eletroforese, consegue-se fracioná-lo em 6 ou mais componentes, todos eles alergênicos, mostrando assim a sua complexa composição (17,18).

No que se refere ao conteúdo de alergênicos da mamona, os dados reportados variam dependendo do sistema de análise empregado. Enquanto que Waller e Negi (40) reportam conteúdos de 1% para farelo obtido em laboratório e de 0,5% para farelo comercial,

Coulson e colaboradores (6), analizando-os por outro método, reportam que farelos desengordurados e decorticados contém de 6,1 a 9% dependendo da variedade da mamona, e farelos comerciais contém de 0,09 a 4,2%. Baseados nos dados analíticos publicados os autores citados concordam que a faixa de variabilidade encontrada não estimula o estudo para a obtenção de variedades não alergênicas.

5. Desintoxicação e desalerginização dos farelos de mamona.

Ainda que Breese Jones (5) reporta que não conhece trabalhos visando a desintoxicação do farelo de mamona pelo calor, existem outros autores que descrevem alguns intentos feitos neste sentido em datas anteriores (42).

Dentre os tipos de tratamentos térmicos citados como capazes de promoverem a desintoxicação do farelo de mamona incluem-se: a) ebulição do farelo por 2 horas; b) aquecimento a 140°C por 90 minutos; c) tratamento do farelo com calor e posterior secagem sob vácuo; d) extração do farelo com soluções alcalinas e autoclavagem posterior do resíduo; e) tratamento térmico seguido por subsequente extração com vários solventes (16).

Kodras e colaboradores (16), em 1947, apontam que é necessária uma revisão dos mesmos e concluem que, autoclavando farelos secos a 125°C durante 15 minutos, consegue-se desintoxicação, sendo que estes autores não consideram a desalerginização do mesmo.

Em 1960, Gardner e colaboradores (11), apresentam um extenso trabalho visando a desintoxicação e desalerginização dos farelos de mamona, aplicando diversos tratamentos durante o acondicionamento das sementes antes da extração do óleo por solventes, ou após a mesma. Estes incluem tratamentos térmicos com ou sem a adição de álcalis, ácidos, formaldeido, hipoclorito de sódio, uréia e permanganato de potássio; uma fermentação ae-

róbica e ainda digestão com tripsina. Dentre todos estes tratamentos, os autores apontam como mais efetivos os seguintes : a) aquecimento a seco do farelo desengordurado a 205°C durante 125 minutos; b) cocção da semente moída úmida com HCl 0,9% e HCHO 3%; d) cocção da semente moída úmida a 20psig com NaOH 2%; e) cocção a úmido com NaOH 1%:

No mesmo ano de 1960, a Sociedade Algodoeira do Nordeste Brasileiro (SANBRA) (32) apresenta ao mercado um produto denominado "LEX Protéico" que é um farelo de mamona desintoxicado por calor mas não desalerginizado.

Em artigos publicados entre 1968 e 1972, Mottola e colaboradores (23,25,25,26,27)apresentam uma série de estudos feitos a nível de usina piloto visando a desintoxicação e sobretudo a desalerginização do farelo de mamona. Os tratamentos propostos como mais eficientes são : a) tratamento com vapor a 10 psig durante 60 minutos de uma mistura farelo-água 2:1 p/v; b) tratamento a 80°C durante 45 minutos de uma mistura farelo-NH_4OH 6M 4:1 p/v; c) tratamento a 120°C durante 15 minutos de uma mistura farelo-$Ca(OH)_2$ 4% 1:2 p/v.

Estes autores analizam também o efeito dos distintos tratamentos sobre os aminoácidos essenciais encontrando que todos eles afetam em maior ou menor grau à cistina, serina, treonina, metionina e lisina.

Vilhjalmsdottir e Fisher (41), entre os métodos por eles testados, encontram que o melhor processo para remover os fatores depressivos de crescimento do farelo de mamona desintoxicado é a extração com água quente. Eles usaram como matéria prima um farelo de mamona extraído por prensagem e solvente e tratado, após a extração, durante 4 horas com vapor a 5,4Kg/cm^2. Tal farelo foi extraído por percolação com água fervente numa relação sólido-líquido 1:5 p/v.

6. Uso do farelo de mamona como ração animal.

Ainda que desintoxicado com relação à ricina e total ou parcialmente desalerginizado, deve-se conhecer qual o efeito que podem ter sobre os animais a ricinina, o óleo residual e a fração alergênica não destruída, bem como o valor biológico das proteínas nele contidas.

Contrário à idéia de que ainda o escasso óleo residual contido no farelo poderia causar problemas fisiológicos (4, 5), tem sido demonstrado que o ácido ricinolêico não tem ação purgativa quando ele é misturado com alimentos. A adição de 5% do mesmo em rações não tem apresentado efeitos adversos em galinhas (9), sendo de interesse notar que óleo de mamona tem sido consumido por seres humanos ao ser usado como adulterante de óleos comestíveis na Índia (37).

Dado que a ricinina, como foi dito, é só medianamente tóxica e está contida no farelo em quantidades muito pequenas, não é considerada nociva (11), desde que este seja usado em níveis moderados (24).

Kodras e colaboradores (16) reportam que nas suas pesquisas de alimentação usando animais, com farelo de mamona desintoxicado, nenhum deles apresentou evidência de intoxicação atribuível à ricinina.

Segundo Fuller e colaboradores (9), pesquisas realizadas nas Universidade de Kyushu e da Califórnia (Davis), mostram que a inclusão de ricinina em doses elevadas, retarda o crescimento de frangos. Em experiências feitas com farelos, a eficiência das rações não foi afetada dado que a dose, nesses casos, é pequena.

Os alergênicos, como foi anotado, não são tóxicos por sí mesmos. Kodras e colaboradores (16) reportam que, em suas experiências, nenhum dos animais apresentou sintomas que pudessem ser atribuídos aos alergênicos. A mesma afirmação é feita pela SANBRA (32) e reportada também por uma usina de Planview, Texas (42). Porém, tanto Kodras e a usina Texana, reportam que algumas pessoas que trabalharam com os farelos, adquiriram sen-

sibilidade alérgica aos mesmos, sendo este o maior problema apresentado.

No que se refere ao valor biológico das proteínas, Kodras e colaboradores (16) encontraram que ratos alimentados com rações contendo farelo de mamona desintoxicado rejeitaram parcialmente a ração, consumindo-a em pouca quantidade e que, para uma mesma ingestão de proteínas, ratos alimentados com rações onde 20% da proteína foi fornecida por farelo de mamona, cresceram 50% daqueles alimentados com dieta padrão de caseína, demonstrando a baixa qualidade das proteínas de mamona. Porém, os resultados foram melhores na alimentação de frangos.

A SANBRA (32) reporta que, na alimentação de frangos, o farelo de mamona não deve exceder de 10% da ração, enquanto que Fuller e colaboradores (9) elevam este nível até 15%.

Testado na alimentação de porcos, o farelo de mamona mostrou 50% da eficiência comparado à dos de amendoim ou de soja (32).

Estes resultados fazem pensar que o farelo de mamona não é muito eficiente na alimentação de monogástricos podendo isto dever-se ao alto conteúdo de fibra (42), e que, no caso destes animais, a proteína deve ser complementada com lisina, metionina (9), e triptofânio (16).

Vilhjalmsdottir e Fisher (41), estudando o valor biológico do farelo de mamona na alimentação de frangos usando rações com 40% de farelo de mamona, encontram que as proteínas nele contidas tem um NPU 25%, e que é elevado a 45% quando suplementadas com lisina e triptofânio. Segundo estes autores, frangos alimentados com o farelo enriquecido apresentam um crescimento semelhante ao de outros alimentados com proteína de soja suplementada com metionina, sendo, porém, maior o NPU da soja (53%). Afirmam também que diminuindo o conteúdo de fibra no farelo, pode-se elevar o NPU das proteínas.

Quando testado na alimentação de ruminantes, verificou-

se que o farelo de mamona é aceitável (42), e que gado bovino alimentado com ele apresenta ganhos de peso considerados bons, ainda que o mesmo não esteja totalmente desintoxicado, desde que os animais sejam gradualmente acostumados com o alimento (9).

Com base neste revisão, pode-se concluir com Fuller e colaboradores (9) que, ainda com as restrições anotadas, o farelo de mamona continua sendo uma fonte de proteínas aproveitável e barata e que a utilização do mesmo como ração animal dependerá do seu preço em relação a outras fontes protéicas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Matéria prima.-

Todas as experiências foram realizadas com sementes de mamona da variedade "Guarani" colhidas no ano de 1973 na estação experimental do Instituto Agronômico de Campinas, e cedidas para este estudo graciosamente pelo Eng. Agr. Vicente Canechio Filho, Diretor da seção de Oleaginosas daquele Instituto.

1.2. Reativos.-

Para todos os trabalhos utilizaram-se reagentes quimicamente puros (p.a.) de diversas procedências.

Para a curva padrão de dosagem de proteína pelo método do Biureto, usou-se albumina de sôro bovino Nº A-4378 da Sigma Chemical Company.

1.3. Aparelhos e equipamentos.-

Além da vidraria e utensílios comuns de laboratório (pipetas, buretas, termômetros, balões volumétricos, balanças, estufa, etc...) utilizaram-se os seguintes equipamentos e aparelhos específicos:

Potenciômetro "Corning Digital 110"
Potenciômetro "H-5 Horiba"
Centrífuga "Sorval Superspeed RC2-B"
Centrífuga "IEC UV Damon/IEC Division"
Espectrofotômetro "U.V. - Visible Espectrofotometer Perkin-Elmer 402"
Liofilizador "Virtis Model Nº 10-146 MR-BA"
Evaporador rotativo "Flash-Evaporator

Equipamento para extração "Goldfish Lab-Con-Co Model 35001".

Moinho de martelos "Laboratory Pulverizing Mill, Weber Bros & White Metal Works Inc."

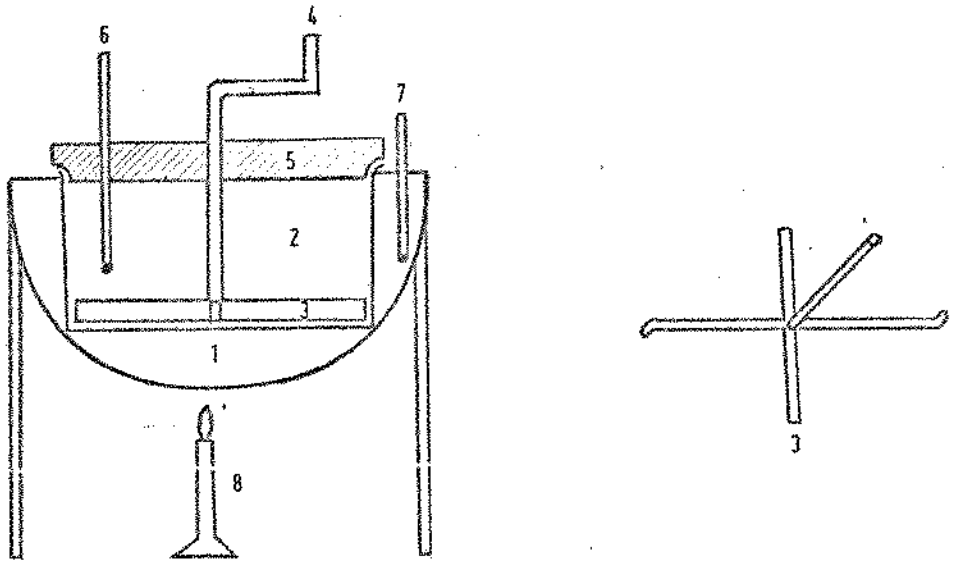
Moinho de grãos tipo doméstico "Maesa"

Analizados de aminoácidos "Beckman Model 120 C".

Gaiolas de tela e chapas galvanizadas para ratos.

Para a cocção das sementes moídas (Antes da extração com hexana) usou-se um aparelho desenhado e contruido no laboratório que coresponde ao esquema da Figura 1.

FIGURA 1. - ESQUEMA DO APARELHO USADO PARA O TRATAMENTO TÉRMICO DAS SEMENTES



1. Banho de óleo.
2. Panela de alumínio.
3. Palhetas agitadoras
4. Manivela para movimentar as palhetas
5. Tampa de madeira.
6. Termômetro para contrôle da temperatura do produto.
7. Termômetro para contrôle da temperatura do banho.
8. Bico de Bunsen.

1.4. Ingredientes (nutrientes) para os ensaios biológicos.

Utilizaram-se os seguintes ingredientes: caseína comercial, fornecida pela Indústria e Comércio de Laticínios Tacrigy Ltda.; amido de milho, grau alimentício, Bisco-Mil Refinações de Milho Brasil Ltda. ; óleo de soja comercial marca Familiar; Sacarose marca Açúcar União; mistura vitamínica "Vitamin Diet Fortification Mixture, Nutritional Biochemicals Corporation " ; sais minerais (p.a.) de diversas procedências.

1.5. Animais utilizados nos ensaios biológicos.

Ratos brancos da raça Wistar com idade de 21-23 dias, pesando entre 40 e 70g, provenientes da colônia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

2. MÉTODOS

2.1. Análises Físicas e Químicas gerais

Umidade.- A umidade das sementes de mamona foi determinada pelo método descrito pelo A.O.C.S. Ac 3-52 (1).

No caso da determinação da umidade nos farelos e nos isolados proteícos usou-se o método A.O.C.S. Bd 2-52 (1).

Gordura.- Para a determinação da gordura nas sementes de mamona aplicou-se o método A.O.C.S. Ae 3-52 (1) usando-se para a extração o aparelho Goldfish da Lab-Con-Co.

No caso dos farelos de mamona usou-se o método A.O.C.S. Bd 3-52 (1) e o aparelho Goldfish para extração.

Proteína.-O preparo das amostras para determinação de proteína (N x 6,25) nas sementes e farelos foi feito segundo o método A.O.C.S. Aa 5-38 (1).

Para a determinação da proteína nas amostras antes especificadas bem como nos extratos e isolados, usou-se o método Micro-Kjeldahl descrito por Vilhela, Bacila e Tastaldi (39) página 395, usando-se um indicador misto de vermelho de metila 0,06% e verde de bromocresol 0,15% em etanol absoluto.

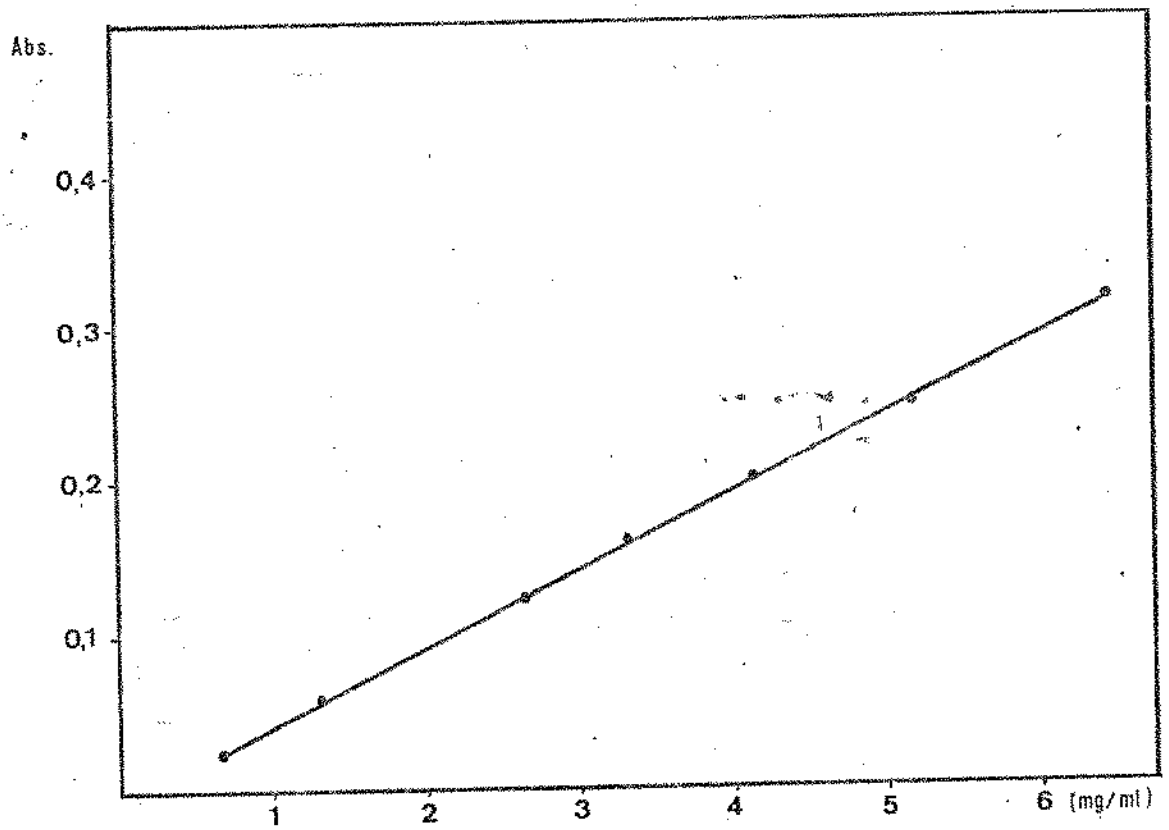
Ao fazer-se o estudo da influência de alguns fatores (pH, concentração de sais, efeito combinado de sais e pH) na extração das proteínas, empregou-se o método do biureto (39) página 398, para a dosagem das mesmas.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas num espectrofotômetro UV-Visivel Perkin-Elmer 402, usando-se células de 1 cm, comprimento de onda de 550nm e abertura de fenda 25.

Usou-se como padrão a curva de calibração preparada com albumina de sôro bovino que é apresentada na Figura 2.

FIGURA 2. - CURVA PADRÃO PARA A DOSAGEM DAS PROTEÍNAS PELO MÉTODO DO BIURETO

Estandar albumina de sôro bovino.
Branco reativo-água 4:1 v/v
Célula 1 cm.
Largura de fenda 25.
Comprimento de onda 550nm.
UV-Visible Expectrofotometer Perkin-Elmer 402



Fibra crua

Para a determinação do teor de fibra crua nas sementes e farelos usou-se o método de Van de Kamer e Van Juikel (38) em amostras de 2 a 3g.

Cinzas

Foram determinadas pelo método A.O.C.S. Ba 5-49 (1) .

Granulometria

Na análise granulométrica dos farelos empregados para a extração das proteínas, usou-se uma amostra de 100g em peneiras colocadas num vibrador durante 20 minutos. Em seguida,o material contido em cada uma das peneiras foi pesado para o cálculo das porcentagens de cada fração.

Determinação de aminoácidos

Amostras contendo 20mg de proteína foram hidrolisadas com HCl 6N empregando-se o método descrito no manual Beckman (2). O volume de hidrolizado foi completado a 50ml e após eliminado o HCl numa alíquota de 20ml por evaporações sucessivas , o residuo foi redissolvido em 10ml de tampão citrato pH 2,2. A determinação qualitativa e quantitativa dos aminoácidos foi feita com 0,4 ml, usando-se o analizador Beckman Model 120C e o método de Spackman e colaboradores também descrito no manual.

2.2. Extração do óleo para a obtenção dos farelos

-Extração com éter etílico.

As sementes de mamona foram moidas num moinho de discos tipo doméstico até a formação de uma pasta onde as partículas de casca tinham um tamanho médio de 1 mm. Colocou-se este produto num cilindro fechado de papel de filtro e procedeu - se a extração em sistema sohxlet durante o tempo necessário para se atingir um resíduo de óleo no farelo menor que 2%. O farelo

foi deixado durante 1 hora em estufa a 40°C a fim de eliminar o solvente residual. A seguir, foi moido no moinho de martelos usando-se a peneira 0,04pol e conservado até a sua utilização em sacos plásticos fechados. Este farelo foi denominado "Farelo Éter".

Extração com hexana

Para a extração direta do óleo de mamona com solvente usou-se o método desenvolvido por D'Aquin e colaboradores (7)ligeiramente modificado a fim de adaptá-lo às condições de trabalho do laboratório.

O processo pode ser dividido em três etapas, a saber: tratamento prévio das sementes (moagem e cocção); extração propriamente dita e tratamento final (desolventização e moagem).

Após a moagem como na extração etérea, procedeu-se a cocção da pasta resultante num aparelho desenhado para esta finalidade (Figura 1).

Uma vez aquecido o banho de óleo até 120 - 140°C, colocou-se a pasta na panela tampando-a. Manteve-se uma agitação constante a uma velocidade aproximada de 60 r.p.m.,controlando-se a temperatura do banho de modo a se conseguir a elevação da temperatura do produto desde a ambiente (30°C)até 80°C em 8 minutos.Neste ponto,adicionou-se água quente (90°C)suficiente para se obter uma umidade aproximada de 14% e continuou-se o aquecimento até se atingir os 100°C nos 4 minutos seguintes.Manteve-se esta temperatura por 12 minutos impedindo-se,tanto quanto possível,a evaporação da água.Em seguida,conservou-se a mesma temperatura mas procurou-se obter a máxima evaporação abrindo-se regularmente a tampa a fim de se atingir uma umidade de 3% em mais 12 minutos.Passou-se então o produto da panela a uma bandeja onde foi esfriado até 60°C. Transferiu-se em seguida para um balão de boca esmerilhada e adicionando-se hexana numa relação sólido-solvente 1:2 p/p , colocou-se em refluxo com agitação manual intermitente durante 45 minutos. Findo este tempo , a suspensão foi passada para um funil Büchner

provido de papel de filtro e filtrada sob ligeiro vácuo. A torta resultante foi lavada no mesmo funil com 3 porções de hexana quente (pouco abaixo do ponto de ebulição) usando-se ao todo uma relação sólido solvente 1:1 p/p, obtendo-se uma camada de farelo no filtro de 5 cm.

Eliminou-se a maior parte do solvente retirado deixando-se o farelo no funil por mais um tempo após a filtragem da micela, antes de se colocar por 1 hora numa estufa a 40°C. Finalmente o farelo foi moido em moinho de martelos usando-se uma peneira de 0,04pol. e estocado em sacos plásticos fechados até sua utilização. Este farelo foi denominado "Farelo Hexana".

2.3. Efeito de alguns fatores na extração das proteínas.

Efeito do pH.

Colocou-se em erlenmayers de 500ml 15 g do farelo desengordurado, adicionou-se 75ml de água (relação sólido-solvente 1:5 p/v) e uma quantidade de NaOH 1N ou HCl 1N a fim de se obter na suspensão um determinado pH entre 2 e 12, medido num potenciômetro. Agitou-se as suspensões durante 3 horas mantendo-se o pH inicial com novas adições de ácido ou álcali. Em seguida, centrifugou-se a 12.000 x g durante 10 minutos e filtraram-se os sobrenadantes através de lã de vidro para eliminar as partículas sólidas mais leves que a solução. Completou-se o volume dos filtrados a 250ml mantendo-se o pH inicial e dosou-se as proteínas pelo método do biureto.

Efeito da concentração de NaOH.

Colocou-se em erlenmayers de 500ml 15 g do farelo desengordurado, adicionou-se 75 ml de soluções de NaOH de concentrações entre 0,13 e 2,0%, agitou-se durante 2,5 horas, centrifugou-se a 12.000 x g durante 10 minutos, filtrou-se os sobrenadantes através de lã de vidro, completou-se o volume dos filtrados a 250ml e dosou-se as proteínas pelo método do biureto.

Efeito da concentração de sais.

Estudou-se o efeito de diversas concentrações de NaCl, $CaCl_2$, Na_2SO_4, e Na_3PO_4 na extração das proteínas empregando-se o seguinte método: a 10g do farelo desengordurado adicionou-se 50ml da solução salina em estudo, agitou-se durante 2,5 horas, centrifugou-se a 12.000 x g durante 10 minutos, filtrou-se o sobrenadante através de lã de vidro e completou-se o volume a 250ml com a mesma solução. Dosaram-se as proteínas nestes extratos pelo método do biureto, exceto no caso do $CaCl_2$ em que empregou-se o método micro-Kjeldahl para evitar a interferência dos íons de cálcio que precipitariam no meio básico do reativo do biureto.

Efeito combinado de sais e pH.

Empregou-se as concentrações ótimas de NaCl, Na_2SO_4, e Na_3PO_4 encontradas no estudo já mencionado, e regulou-se o pH das suspensões entre valores de 7 a 11. O procedimento empregado foi semelhante ao descrito para o estudo do efeito do pH, em amostras de 10g de farelo, mas usando-se em lugar de água a solução salina em estudo.

Extração com álcool etílico 75% v/v.

A 10g de farelo desengordurado juntaram-se 50ml de uma solução de álcool etílico 75% v/v, agitou-se durante 2,5 horas, centrifugou-se a 12.000 x g durante 10 minutos, filtrou-se o sobrenadante através de lã de vidro e completou-se o volume a 250ml com a mesma solução alcóolica. Dosaram-se as proteínas pelo método micro-Kjeldahl.

Efeitos da temperatura e do tempo de contato do solvente na extração das proteínas.

Estudou-se a extração das proteínas a temperaturas compreendidas entre a ambiente (35°C) e 60°C e com tempos variá-

veis de contato com o solvente.

Usou-se o seguinte método: colocou-se um bequer contendo 20g de farelo num banho termostatizado (provido de agitador magnético) e regulado na temperatura desejada, adicionou-se 100 ml de água na mesma temperatura e imediatamente NaOH 50% suficiente para atingir pH 11 na suspensão, o qual foi mantido durante toda a extração com adição de NaOH 1N e controlado com o potenciômetro. Em diferentes tempos (5,15,30,45 e 60 minutos) tomou-se uma amostra de 5 ml e centrifugou-se imediatamente a 35.000 x g durante 5 minutos. A concentração protéica foi determinada no sobrenadante pelo método micro-Kjeldahl.

2.4. Obtenção dos isolados proteícos.

Os farelos "éter e hexana" obtidos segundo o procedimento descrito em 2.2 do presente capítulo, foram submetidos a dois tipos de extração usando-se como solventes uma solução de NaOH a um pH final de 11 e uma solução de NaOH 0,5%. A temperatura do processo foi de 45°C. Usou-se uma relação sólido-solvente 1:5 p/v, agitação constante e um tempo de contato de 15 minutos. Após a recuperação do sobrenadante por centrifugação a 1.600 x g durante 10 minutos, o residuo resultante foi submetido a novas lavagens com o mesmo solvente e nas mesmas condições antes especificadas. Para manter a mesma relação sólido - solvente nas lavagens, o volume do novo solvente adicionado foi igual ao do extrato obtido nas extrações anteriores.

Nos extratos assim obtidos testou-se o pH de mínima solubilidade das proteínas procedendo-se do seguinte modo: tomou-se uma alíquota do extrato e com agitação constante adicionou-se HCl concentrado até atingir um determinado pH (medido com potenciômetro). Depois de alguns minutos de estabilização, tomou-se uma alíquota de 5 ml que foi centrifugada a 12.000 x g durante 10 minutos e dosou-se o teor de proteína no sobrenadante pelo método do biureto. Repetiu-se o processo de adição de ácido e dosagem de proteína em diferentes pH, até atingir o de menor solubilidade (menor concentração protéica no sobrenadante).

A seguir, a proteína dos extratos foi precipitada no pH de mínima solubilidade, aquecendo a suspensão e mantendo-se em ebulição por 5 minutos. O coágulo de proteína foi então separado do sôro por filtração a vácuo num funil de Büchner. A proteína obtida foi lavada suspendendo-a em água e mantendo-se o pH da precipitação. Após nova filtragem, foi secada sob alto vácuo no liofilizador "Virtis" com as placas aquecidas a 30°C. Os isolados foram moidos até granulometria menor que 40 "mesh" e estocados em vidros fechados até sua utilização.

Os quatro isolados obtidos foram denominados "Isolado Éter pH 11"; "Isolado Éter NaOH 0,5%"; "Isolado Hexana pH 11"; "Isolado Éter NaOH 0,5%", dependendo do solvente empregado na obtenção do farelo e do isolado.

Preparou-se ainda um extrato que foi denominado "Extrato cru" pelo seguinte processo: o farelo éter foi submetido a extração a pH 11 nas mesmas condições antes descritas. O primeiro extrato foi neutralizado (pH 7) com HCl concentrado, congelado e liofilizado. O produto assim obtido foi moido até granulometria menor que 40 "mesh" e conservado em vidro fechado até sua utilização.

2.5. Ensaios biológicos.

O valor biológico das proteínas dos isolados obtidos, bem como do extrato cru e do isolado hexana pH 11 enriquecido com 3% de L-Lisina e 1,54% de DL-Metionina em relação a proteína foi determinado pelo método do NPU (utilização líquida da proteína) descrito por Miller e Bender (22), empregando-se caseina como padrão de comparação.

Preparo das dietas.

A composição centesimal das dietas utilizadas para a determinação dos valores de NPU, está especificada no Quadro 5.

QUADRO 3. - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS.

Componentes	Percentagem
Proteína (N x 6,25 proveniente de cada amostra)	10
Óleo de soja comercial (Familiar)	8
Mistura salina (Ver Quadro 2)	5
Mistura vitamínica (ver Quadro 3)	2
Sacarose (açúcar União)	25
Amido de milho (Refinações de Milho Brasil)	até completar 100

A composição da mistura salina usada foi a de Rogers e Harper (29) conforme especificação do Quadro 4.

QUADRO 4. - COMPOSIÇÃO DA MISTURA SALINA.*

Componentes	Percentagem
Molibdato de Amônio.$4H_2O$	0,003
Carbonato de Cálcio	29,290
Fosfato de Cálcio.$2H_2O$	0,430
Sulfato Cúprico	0,156
Citrato Férrico.$6H_2O$	0,623
Sulfato de Magnésio. $7H_2O$	9,980
Sulfato de Manganês.H_2O	0,121
Iodeto de Potássio	0,0005
Fosfato de Potássio	34,310
Cloreto de Sódio	25,060
Selenito de Sódio.$5H_2O$	0,002
Cloreto de Zinco	0,020

*ROGERS, Q.R., and A.E. HARPER, J. Nutr., 87,267 ,1965.

A mistura vitamínica utilizada "Vitamin Diet Fortification Mixture" da "Nutritional Biochemicals Corporation" corresponde à composição detalhada no Quadro 5.

QUADRO 5. - COMPOSIÇÃO DA MISTURA VITAMÍNICA UTILIZADA NAS DIETAS PARA OS ENSAIOS BIOLÓGICOS.

Componentes	P e s o
Vitamina A concentrada (200.000 U/g)	4,50g
Vitamina D concentrada (400.000 U/g)	0,25g
Alfa Tocoferol	5,00g
Ácido Ascórbico	45,00g
Inositol	5,00g
Cloreto de Colina	75,00g
Menadiona	2,25g
Ácido p-aminobenzóico	5,00g
Niacina	4,50g
Rivoflavina	1,00g
Hidrocloreto de Piridoxina	1,00g
Hidrocloreto de Tiamina	1,00g
Pantotenato de Cálcio	3,00g
Biotina	20mg
Ácido Fólico	90mg
Vitamina B 12	1,35mg
Dextrose	até completar 1K

Alimentação dos ratos

A experiência foi realizada com 40 ratos que no seu início tinham uma idade entre 21 e 23 dias. Todos receberam a ração padrão de caseína durante 2 dias e foram então divididos em 8 grupos de 5 ratos cada, tendo cuidado de que os pesos totais de cada grupo não diferissem em mais de 3 g.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, ocupando cada grupo uma coluna no suporte tipo estante e alimentados durante 10 dias com água e ração "ad libitum". Nos dias 3º, 7º e 10º da experiência, foi determinado o peso de cada rato e a quantidade de ração consumida.

Determinação do NPU

Após os 10 dias de alimentação, os ratos foram sacrificados com éter, congelados, cortados em fatias de 2 mm e a água corporal determinada por secagem em estufa a 110°C durante 48 horas (peso constante). O cálculo dos valores de NPU foi realizado segundo o método descrito por Miller e Bender (22).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Composição da matéria prima

Os resultados da determinação da composição das sementes de mamona empregadas no presente estudo e realizadas segundo os métodos antes descritos são apresentados no Quadro 6.

QUADRO 6. - COMPOSIÇÃO DAS SEMENTES DE MAMONA VARIEDADE "GUARANI"

Componentes	Base úmida %	Base seca %
Umidade	6,36	---
Óleo	47,91	51,17
Cinzas	2,41	2,57
Fibra crua	6,65	7,11
Proteína bruta (N x 6,25)	17,85	18,95

2. Composição dos farelos desengordurados.

A composição dos farelos, determinada segundo os métodos descritos, e apresentada no Quadro 7, corresponde a valores médios obtidos da análise de diferentes cargas do extrator de óleo.

QUADRO 7. - COMPOSIÇÃO DOS FARELOS DE MAMONA, APÓS EXTRAÇÃO DO ÓLEO

Componentes	Farelo éter		Farelo hexana	
	Base úmida %	Base seca %	Base úmida %	Base seca %
Umidade	8,10	---	7,72	---
Óleo	0,95	1,03	2,57	2,78
Cinzas	5,15	5,61	5,05	5,46
Fibra crua	13,35	14,50	11,30	12,22
Proteína (N x 6,25)	35,20	38,40	34,60	37,50

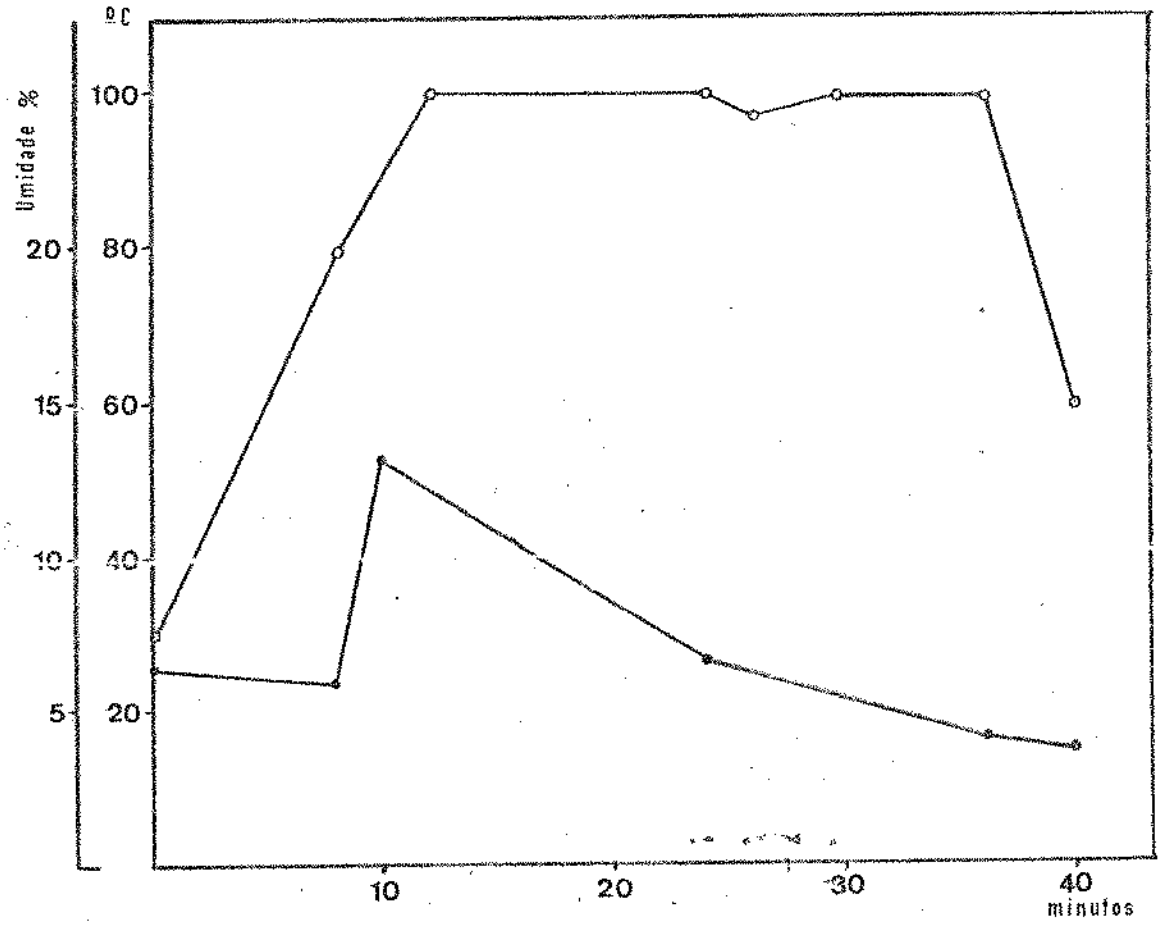
A composição dos farelos obtidos pelos dois processos é semelhante, porém diferenciam-se notadamente no tratamento térmico recebido. No caso da extração etérea, a semente não recebeu, fora da moagem, nenhum outro tratamento. A extração foi realizada à temperatura de ebulição do éter etílico e a desolventização foi feita com ar a 40°C.

No caso da extração com hexana, as sementes, depois de moídas, receberam tratamentos cujos perfis de temperatura e umidade em relação ao tempo são apresentados na Figura 3. A extração foi realizada à temperatura de ebulição da hexana e o farelo desolventizado, como no caso anterior, com ar a 40°C simulando, tanto quanto possível, o processo industrial.

Todos os estudos de isolamento e caracterização das proteínas, foram feitos a partir dos farelos após extração da quase totatilidade do óleo. Para simplificação passaremos a chamar apenas farelo nos tópicos seguintes.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

FIGURA 3. - PERFIS DE UMIDADE E TEMPERATURA DURANTE A COCÇÃO ANTES DA EXTRAÇÃO COM HEXANA.



o Temperatura

• Umidade

Os valores médios da análise granulométrica dos farelos é apresentada no Quadro 8.

QUADRO 8. - ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DOS FARELOS.

Peneira "Tyler" Nº	Tamanho da partícula mm	Retido %	Peneirado acumulado %
20	1,016	0,00	100,00
35	0,631	22,17	77,83
48	0,359	25,24	52,59
60	0,274	8,59	44,00
100	0,200	7,45	36,55
150	0,127	5,95	30,60
200	0,090	10,12	20,48
<200	<0,074	20,48	

Analisando-se o Quadro 8, observa-se que no farelo existem duas frações bem diferenciadas. Uma, com um tamanho de partícula maior que 60 "mesh", formada na sua maioria por partículas de casca e outra, com tamanho de partícula menor que 150 "mesh" formada, quase inteiramente, por partículas do endosperma desengordurado. A existência destas duas frações tão diferenciadas fazem improcedente o cálculo do tamanho médio de partícula, pois este não teria um significado real.

3. Estudo da influência de alguns fatores na extração das proteínas.

Efeito do pH

Os resultados do estudo da extração das proteínas usando como solvente soluções ácidas ou alcalinas numa relação sólido-solvente 1:5 p/v, são apresentados no Quadro 9. As demais

condições foram temperatura ambiente, com agitação constante durante 3 horas e completando-se a seguir o volume dos extratos a 250ml.

As porcentagens de extração foram calculadas a partir da proteína total extraída em relação ao peso do farelo e da proteína nele contida.

QUADRO 9. - EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DOS FARELOS A DIVERSOS VALORES DE pH.

Peso do farelo 15g.
Relação sólido-solvente 1:5 p/v.
Temperatura ambiente.
Agitação contínua durante 3 horas.
O volume do extrato foi completado a 250ml para a dosagem das proteínas.

A. - FARELO ÉTER (36,58% proteína).

Ensaio Nº	pH	% Extração	
		$\frac{\text{Prot. Extraída}}{\text{Farelo}} \times 100$	$\frac{\text{Prot. Extraída}}{\text{Prot. no farelo}} \times 100$
1	2,0	8,12	22,15
2	3,0	10,32	28,15
3	4,0	11,12	30,35
4	5,0	9,38	25,60
5	5,8	8,42	23,05
6	7,3	10,32	28,15
7	8,0	13,38	36,50
8	8,9	14,12	38,55
9	9,7	19,72	53,80
10	10,1	18,90	51,60
11	10,8	24,60	67,20
12	11,6	28,70	78,40

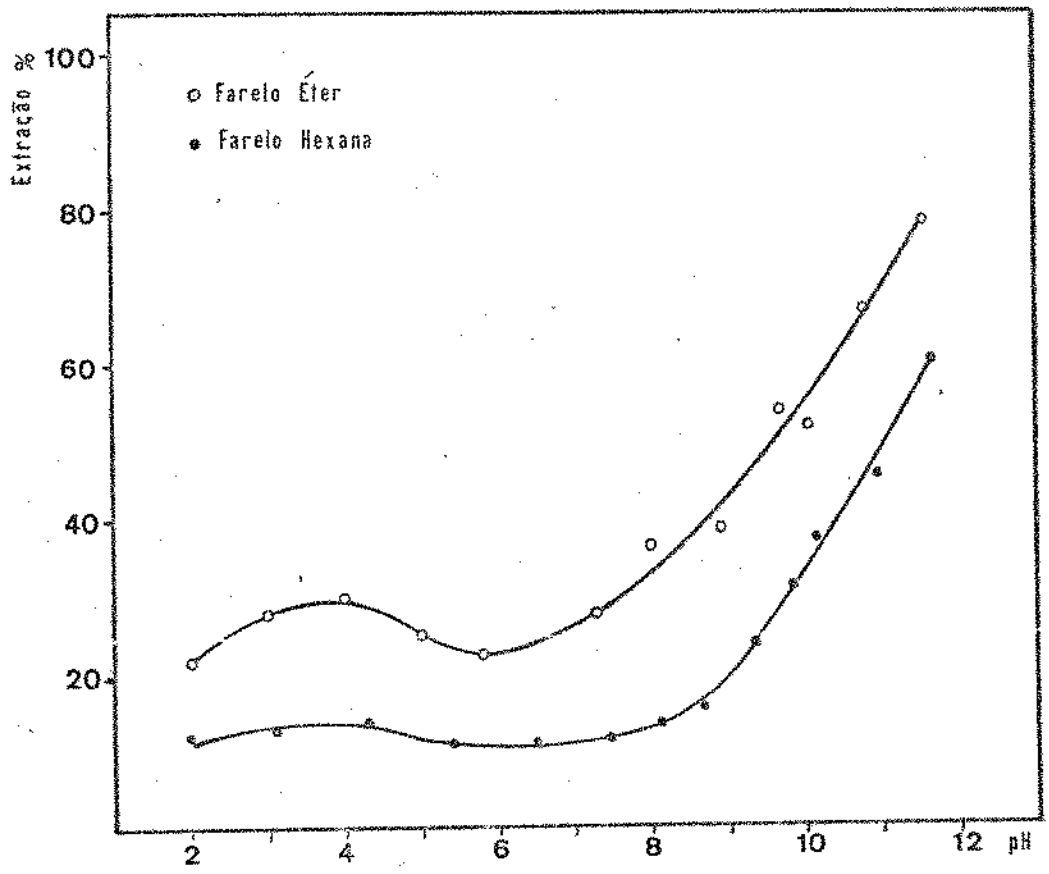
QUADRO 9. - (CONTINUAÇÃO).

B. - FARELO HEXANA (36,30% proteína).

Ensaio Nº	pH	% Extração	
		$\frac{\text{Prot.Extraída}}{\text{Farelo}} \times 100$	$\frac{\text{Prot.Extraida}}{\text{Prot.no farelo}} \times 100$
1	2,0	4,34	11,92
2	3,1	4,61	12,72
3	4,2	4,96	13,75
4	5,4	3,96	10,92
5	6,5	4,00	11,02
6	7,5	4,21	11,60
7	8,1	4,87	13,44
8	8,7	5,61	15,50
9	9,4	8,62	23,80
10	9,9	11,35	31,20
11	10,2	13,50	37,20
12	11,0	16,45	45,40
13	11,7	21,70	60,00

- Na Figura 4 apresenta-se a correlação gráfica entre as porcentagens de proteína total extráida e o pH em que esta foi realizada.

FIGURA 4. - EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DOS FARELOS A DIVERSOS VALORES DE pH.



Analisando-se a Figura 4, observa-se que, partindo de pH 2, a extração das proteínas aumenta até atingir um máximo a pH 3,8, decresce em seguida até um valor mínimo em pH 5,8 e torna aumentar rápida e significativamente em pH alcalino mostrando, portanto, um comportamento semelhante ao de outras proteínas vegetais.

Observa-se também que o grau de extração é maior no caso do farelo éter que não sofreu tratamento térmico, o que se explica facilmente pois as proteínas não sofreram desnaturação, conservando uma maior solubilidade, característica de proteínas não desnaturadas.

Efeito da concentração de NaOH

Nas soluções de NaOH usadas as concentrações foram tais que o pH da extração excedia a escala de medida do potenciômetro, ou seja maior que 12.

Os resultados obtidos, são apresentados no Quadro 10 , incluindo-se valores de concentração de NaOH entre 0,13 e 2,00%.

QUADRO 10. - EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM SOLUÇÕES DE NaOH DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES.

Peso do farelo 15g
Relação sólido-solvente 1:5 p/v.
Temperatura ambiente.
Agitação contínua durante 2,5 horas.
O volume do extrato foi completado a 250ml para a dosagem das proteínas

A. - FARELO ÉTER (36,58% proteína).

Conc. NaOH %	% Extração	
	$\frac{\text{Prot. Extraída}}{\text{Farelo}} \times 100$	$\frac{\text{Prot. Extraída}}{\text{Prot.no farelo}} \times 100$
0,15	18,90	51,60
0,21	24,60	67,20
0,28	28,70	78,40
0,50	31,25	85,30
1,00	32,50	88,80
1,50	34,50	94,30
2,00	35,40	96,70

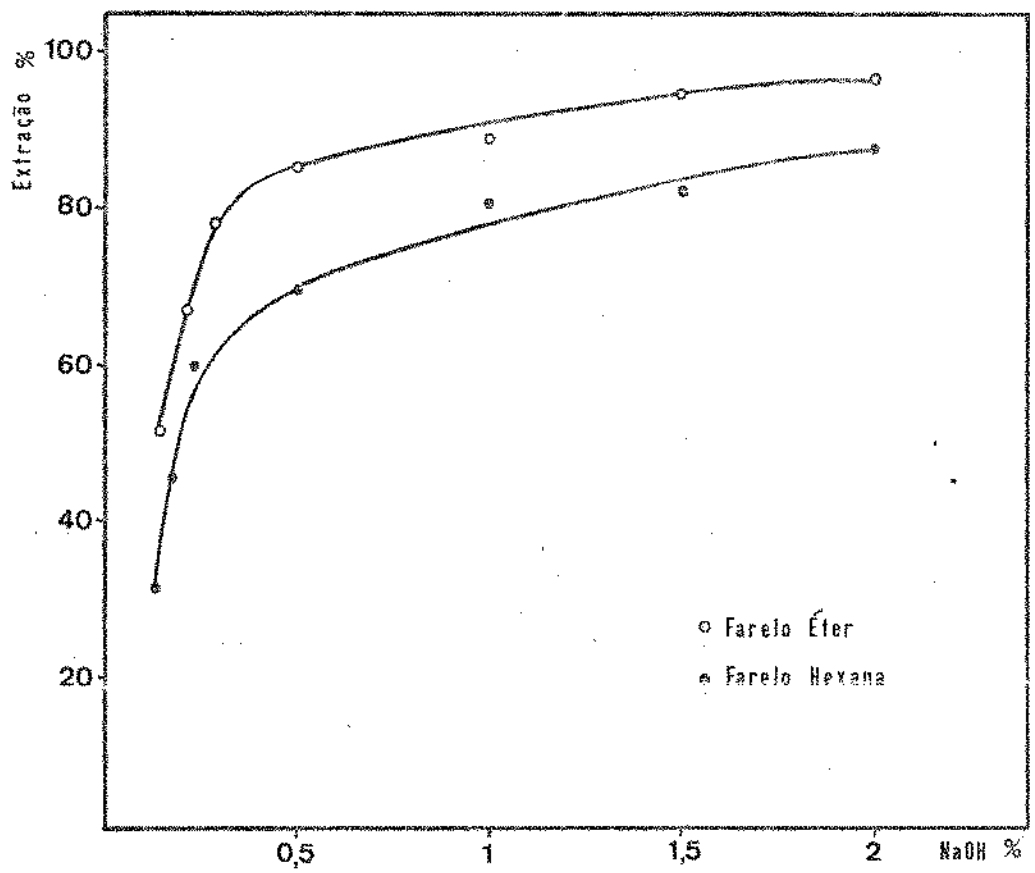
QUADRO 10. - (CONTINUAÇÃO).

B. - FARELO HEXANA (56% proteína).

Conc. NaOH %	% Extração	
	$\frac{\text{Prot. Extraída}}{\text{Farelo}}$ x 100	$\frac{\text{Prot. Extraída}}{\text{Prot.no farelo}}$ x 100
0,13	11,35	31,20
0,17	16,45	45,40
0,23	21,70	60,00
0,50	25,40	69,95
1,00	29,30	80,70
1,50	29,75	82,00
2,00	31,60	87,10

Na figura 5 apresenta-se a correlação gráfica entre as porcentagens de proteína total extraída e a concentração de NaOH.

FIGURA 5. - EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DOS FARELOS COM SOLUÇÕES DE NaOH.



Analisando-se a Figura 5, observa-se que a quantidade de proteína extraída eleva-se grandemente com o aumento da concentração de soda e que a partir de uma concentração de 0,5% este incremento diminui apresentando uma tendência a estabilizar-se.

Cabe notar que à medida que se aumenta a concentração de soda, eleva-se a viscosidade da suspensão tornando-se mais difícil a separação dos sólidos insolúveis, seja por centrifugação ou por filtração, devendo-se portanto adotar uma solução de compromisso entre o maior grau de extração alcançado a altas concentrações e a maior dificuldade de recuperação dos extratos.

Efeito da concentração de sais.

Os resultados do estudo da extração das proteínas com diversas soluções salinas a várias concentrações são apresentados no Quadro 11.

A experiência foi realizada somente com farelo hexana, pois do estudo anterior pode-se concluir que apesar de existir um grau diferente de extratibilidade das proteínas, devido à diferença de tratamento térmico recebido pelos dois tipos de farelo, o comportamento geral das mesmas é semelhante. Cabe notar além disso, que pela maior dificuldade de se obter o farelo éter, este foi preparado em quantidade menor, razão pela qual não se fez o presente estudo com os dois farelos.

Usaram-se sais contendo íons mono, di e trivalentes.

QUADRO 11. - EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM DIFERENTES SOLUÇÕES SALINAS A VÁRIAS CONCENTRAÇÕES.

Farelo hexana (36,30% proteína) 10g.
Relação sólido-solvente 1:5 p/v.
Temperatura ambiente.
Agitação constante durante 2,5 horas.
O volume do extrato foi completado a 250ml para a dosagem das proteínas.

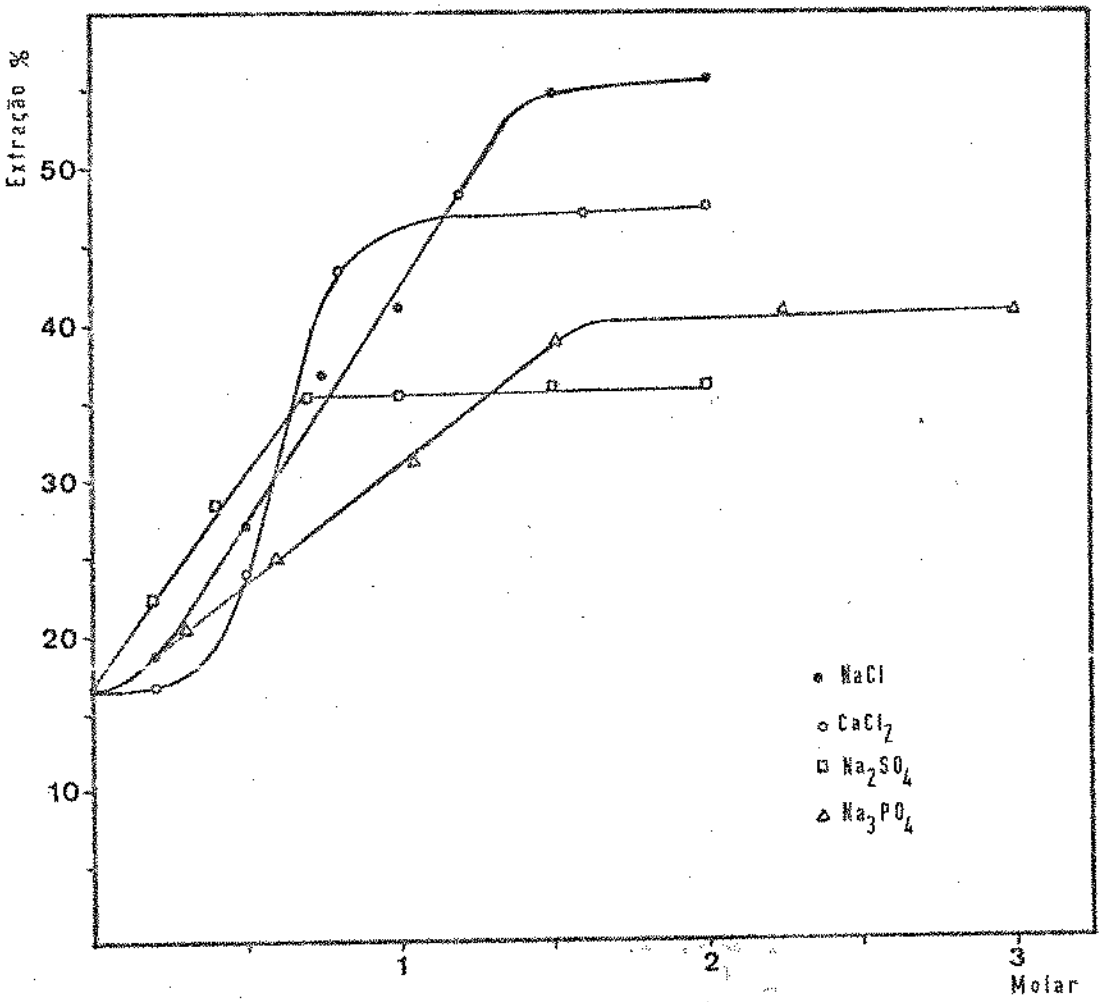
Sal	Concentração		% Extração	
	%	Molar	$\frac{\text{Prot.Extr.}}{\text{Farelo}} \times 100$	$\frac{\text{Prot.Extr.}}{\text{Prot.no far.}} \times 100$
NaCl	0,00	0,00	6,04	16,65
	1,17	0,20	6,82	18,85
	2,92	0,50	9,86	27,15
	4,38	0,75	12,32	33,90
	5,85	1,00	14,92	41,10
	8,78	1,50	19,90	54,80
	11,70	2,00	20,20	55,70
$CaCl_2$	0,00	0,00	6,04	16,65
	1,11	0,20	6,15	16,92
	2,77	0,50	8,66	23,80
	4,44	0,80	15,85	43,65
	6,60	1,20	17,52	48,20
	8,88	1,60	17,05	47,05
	11,10	2,00	17,25	47,60

QUADRO 11. - (CONTINUAÇÃO)

Sal	Concentração		% Extração	
	%	Molar	$\frac{\text{Prot.Extr.}}{\text{Farelo}}$ x 100	$\frac{\text{Prot.Extr.}}{\text{Prot.no far.}}$ x 100
Na_2SO_4	0,00	0,00	6,04	16,65
	0,71	0,20	8,13	22,45
	1,42	0,40	10,30	28,40
	2,49	0,70	12,85	35,45
	3,55	1,00	12,85	35,45
	5,32	1,50	13,15	36,15
	7,10	2,00	13,15	36,15
Na_3PO_4	0,00	0,00	6,04	16,65
	0,55	0,30	7,46	20,55
	1,10	0,60	9,12	25,15
	1,92	1,05	11,37	31,20
	2,74	1,50	14,08	38,80
	4,11	2,25	14,88	40,95
	5,47	3,00	14,85	40,90

A fim de se poder comparar o efeito dos distintos sais, apresenta-se na Figura 6 as porcentagens da proteína total extraída contra a molaridade das soluções empregadas como solvente.

FIGURA 6. - EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM DIFERENTES SOLUÇÕES SALINAS A VÁRIAS CONCENTRAÇÕES



Analisando-se a Figura 6, encontra-se que todos os sais, nas concentrações empregadas, aumentam o grau de extração das proteínas até um certo limite no qual se atinge um máximo. Tanto as concentrações requeridas quanto os máximos atingidos são diferentes para cada sal. A ordem decrescente de efetividade é a seguinte: NaCl 1,5M com 55% de extração; $CaCl_2$ 1,25 N com 47% de extração; Na_3PO_4 1,5M com 40% de extração; e Na_2SO_4 0,7M com 35% de extração.

Extração com etanol 75% v/v.

A extração foi feita com álcool a 75% v/v, como descrito em 2.3 do capítulo Material e Métodos. Obteve-se uma recuperação de proteína de 0,93% em relação ao peso do farelo, equivalente a 2,56% da proteína total nele contida, comprovando-se assim, que o conteúdo de proteínas solúveis em álcool (prolaminas) é praticamente nulo, característica esta que é comum a todas as oleaginosas.

Efeito combinado de sais e meio alcalino.

Visto que tanto a adição de sais, quanto o uso de soluções alcalinas aumentam o grau de extratibilidade das proteínas, procedeu-se a verificação do efeito combinado destes dois fatores visando obter-se uma extração maior, no caso das proteínas solubilizadas com cada um deles serem diferentes. Usaram-se como solventes soluções de NaCl 1,59M, Na_2SO_4 0,7N e Na_3PO_4 1,8 M que foram as que produziram máxima extração e regulou-se o pH da suspensão comadição de NaOH 1N segundo o método descrito em 2.3. do capítulo anterior.

Eliminou-se, neste caso, o estudo com $CaCl_2$ pois, no pH alcalino utilizado, precipitaria o cálcio como $Ca(OH)_2$ anulando, por um lado, o efeito da adição do sal, e por outro, o precipitado volumoso do hidróxido arrastaria consigo, por floculação, outras moléculas de elevado peso molecular.

Os resultados obtidos estão contidos no Quadro 12.

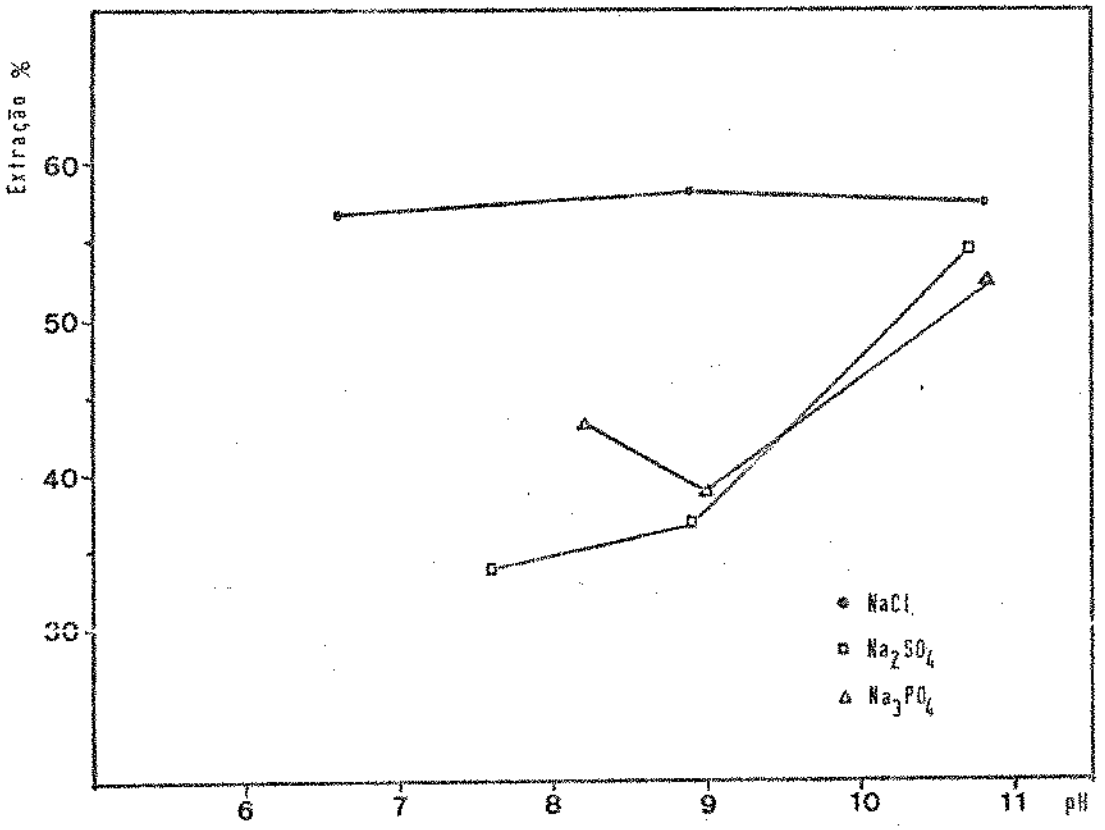
QUADRO 12. - EFEITO COMBINADO DE SOLUÇÕES SALINAS E MEIO ALCALINO NA EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS.

Farelo hexana (36,3% proteína) 10g.
Relação sólido-solvente 1:5 p/v.
Temperatura ambiente.
Agitação constante durante 2,5 horas.
O volume do extrato foi completado a 250ml para a dosagem das proteínas.

Solução Salina	pH	% Extração	
		$\frac{\text{Prot. Extraída}}{\text{Farelo}} \times 100$	$\frac{\text{Prot. Extraída}}{\text{Prot.no farelo}} \times 100$
NaCl 1,59M	6,6	20,6	56,75
	8,9	21,2	58,40
	10,8	20,9	57,58
Na_2SO_4 0,7M	7,6	12,4	34,14
	8,9	13,4	36,91
	10,7	19,8	54,55
Na_3PO_4 1,8M	8,2	15,8	43,52
	9,0	14,0	38,56
	10,8	19,1	52,62

Na Figura 7 apresenta-se a correlação gráfica entre as porcentagens de proteína extraída e o pH da extração.

FIGURA 7. - EFEITO COMBINADO DE SOLUÇÕES SALINAS E MEIO ALCALINO NA EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS.



Analisando-se a Figura 7, nota-se que, exceto no caso do NaCl, o grau de extração é aumentado com a elevação do pH . Por outro lado, comparando os valores desta Figura com os da Figura 4, nota-se que o grau de extração a pH 11, sem o emprego de sais, é praticamente o mesmo que na sua presença, podendo-se concluir que as proteínas extraídas com a solução de NaCl 1,5 M são as mesmas que as extraídas com solução alcalina pH 11 e que a adição de sais não aumenta a extração das proteínas desde que se use um pH maior ou igual a 11.

Deve-se notar além disso, que o uso de sais num proces

so industrial, sem um aumento significativo da extratibilidade, somente acarretaria uma elevação dos custos e produziria um isolado final com maior conteúdo de cinzas.

Efeitos da temperatura e do tempo de contato do solvente na extração das proteínas.

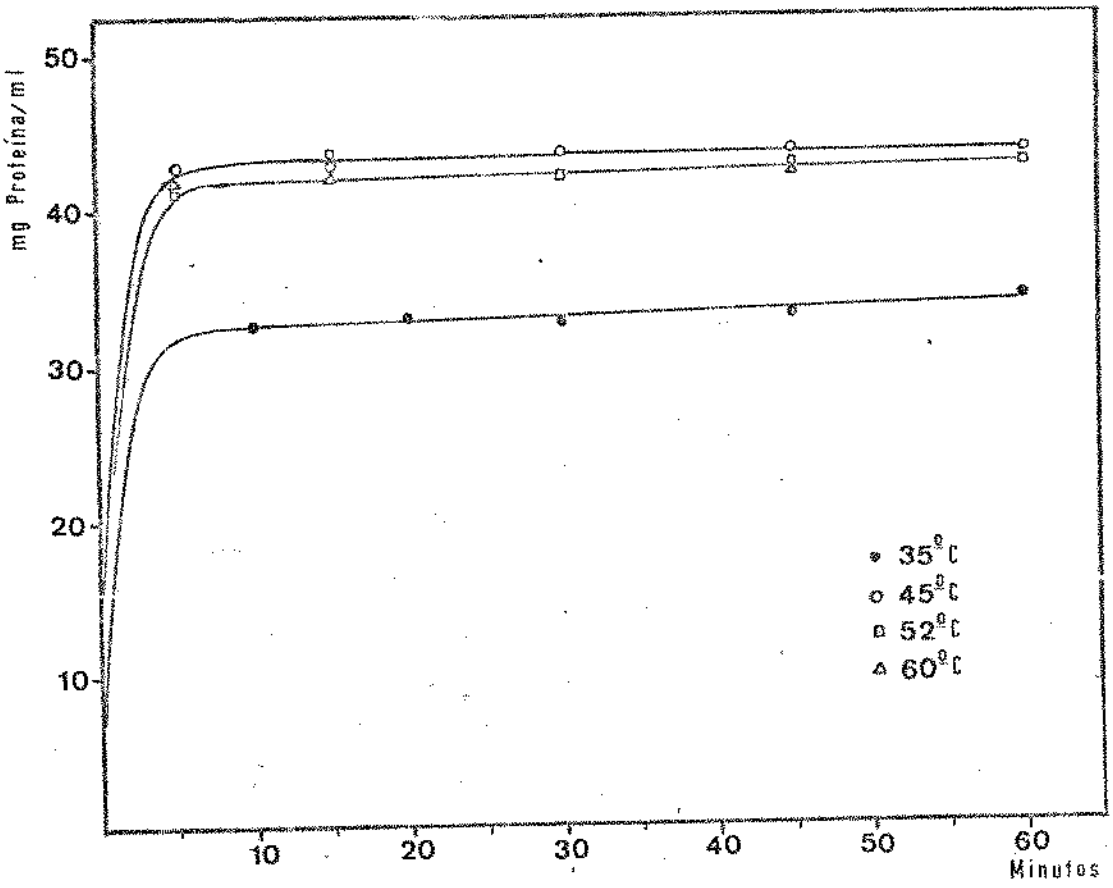
Para o estudo das curvas de extração da proteína contra o tempo de contato a diversas temperaturas, escolheu-se como solvente uma solução de NaOH capaz de dar um pH 11.

O procedimento empregado não permitiu o cálculo da recuperação das proteínas em relação ao farelo ou a proteína nele contida, porque as dosagens foram feitas em pequenas alíquotas da suspensão. Os resultados expressam as concentrações protéicas dos extratos a diferentes tempos de contato. Portanto, pode-se afirmar que uma concentração maior corresponderá diretamente a uma maior extração e que, atingida uma concentração de equilíbrio, ter-se-á atingido a máxima extração nas condições empregadas.

Usou-se o método do micro-Kjeldahl em lugar do método do biureto na dosagem das proteínas, a fim de se evitar a influência que possa ter a temperatura na determinação da concentração, pois verificou-se que soluções de proteína aquecidas sem nenhuma produção de precipitado, davam dosagens maiores que as não aquecidas, quando analizadas por biureto.

Os resultados obtidos são apresentados na Figura 8 onde poderá ser feita uma melhor comparação dos efeitos dos tempos e das temperaturas sobre o grau de extração das proteínas.

FIGURA 8. - EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONTATO E DA TEMPERATURA.



Analisando-se a Figura 8 observa-se que o tempo necessário para se atingir o equilíbrio na concentração do extrato é muito curto, podendo-se afirmar que, nas condições empregadas, a extração é completa em 10 minutos. Observa-se também, que ao se elevar a temperatura, aumenta-se a extração até atingir um

máximo em 45°C, havendo uma diminuição da extratibilidade a temperaturas mais altas.

Considerou-se desnecessário repetir este estudo usando outros tipos de solventes, pois dos estudos anteriores concluiu-se que, usando-se pH mais baixos, obtém-se recuperações muito baixas e, usando-se solventes muito mais enérgicos (soluções concentradas de NaOH) as proteínas seriam afetadas desfavoravelmente. Considerou-se além disso, que usando-se NaOH 0,5%,o tempo e a temperatura de extração vão ser praticamente os mesmos, mudando somente o grau de extratibilidade.

4. Obtenção dos isolados protéicos.

Define-se em geral um isolado proteíco como sendo " a maior fração protéica obtida do material por remoção dos componentes não protéicos e que deve conter, no mínimo, 90% de proteína (N x 6,25) na base seca" (33).

O procedimento mais comum para a sua obtenção a partir de farelo desengordurado implica na extração das proteínas empregando-se um solvente adequado, geralmente água ou álcali,clarificação do extrato obtido, precipitação das proteínas no pI da maioría das mesmas (ponto de menor solubilidade), lavagem do coágulo obtido, secagem e,se necessário, moagem para fornecer o produto final (21).

Na extração sólido-líquido de um produto qualquer com vistas à sua produção industrial, deve-se procurar: a) uma máxima recuperação do mesmo, para se ter um melhor aproveitamento da matéria prima; b) uma concentração elevada dos extratos, que redundará num menor gasto de solvente por unidade de peso da matéria prima; c) menor custo nas operações de clarificação e recuperação; e d) obtenção de um extrato de caraterísticas tais que permitam a posterior purificação e recuperação do produto do modo mais simples possível

No caso da extração de proteínas a partir de um farelo desengordurado, as principais variáveis que afetam o processo são pH, concentração de sais no solvente, temperatura, tamanho de partícula, relação solvente-sólido, agitação e tempo de contato (21), as mesmas que terão influência no grau de recuperação do produto, na velocidade de extração, na concentração e em outras caraterísticas do extrato obtido.

Neste estudo, os parâmetros de extração foram escolhidos baseando-se nos dados experimentais obtidos (item 3 do presente capítulo), aproveitando dados da literatura e experiência pessoal adquirida em outros estudos similares, ou ainda,nas condições de tempo e aparelhagem disponíveis.

Descreve-se a seguir quais os parâmetros escolhidos e a jusiticativa dessas escolhas.

Os dois tipos de farelo foram preparados visando-se comparar o efeito térmico no grau de extração protéica e no valor biológico das proteínas.

Baseando-se nos dados obtidos e analisados na Figura 7, deduziu-se que a adição de sais não oferece nenhuma vantagem eliminando-se portanto o seu uso.

Verificou-se que a melhor extração é obtida a 45°C sendo portanto esta a temperatura empregada no processo.

O tamanho de partícula do farelo a ser extraído influirá na velocidade de extração e nas caraterísticas de clarificação do extrato. Por falta de disponibilidade de tempo,não foi testada a sua influência, usando-se somente farelos com uma granulometria como a especificada no Quadro 8. No entanto, pelos resultados obtidos no que se refere à velocidade de extração e clarificação dos extratos, pode-se afirmar que o tamanho de partícula empregado encontra-se dentro de limites desejáveis.

O emprego de uma relação sólido solvente 1:5p/v baseia-se nas seguintes considerações: a) ter sido empregada por ou

tros pesquisadores no estudo das proteínas da mamona (40); b) ser uma relação que produz uma suspensão suficientemente fluída para permitir a agitação e separação dos insolúveis; c) permite um grau de extratibilidade considerado bom.

O grau de agitação no processo foi determinado pelas disponibilidades do laboratório, ou seja, agitação magnética na máxima velocidade permitida alcançando-se, deste modo, uma suspensão homogênea com todas as partículas em constante movimento e sem a formação de vortex.

Analisando-se a Figura 8 verificou-se que, nas condições empregadas, um tempo de contato de 10 minutos permite atingir máxima extração; empregou-se porém um tempo de 15 minutos como medida de segurança a fim de assegurar em todos os casos uma boa extração.

Uma vez realizada a extração e precipitação das proteínas nas condições especificadas e segundo o método descrito no capítulo anterior, procedeu-se ao aquecimento da suspensão mantendo-se em ebulição por 5 minutos, afim de inativar a ricina que é tóxica, pois de outro modo, o produto obtido não teria nenhum valor como suplemento alimentício. A comprovação de que este tratamento é suficiente para desentoxicar o produto baseia-se nos dados da referência (5) e nos testes biológicos posteriores. Este tratamento térmico produz, além disso, uma transformação no coágulo da proteína aglomerando as partículas e facilitando grandemente a filtração posterior. Cabe notar que, com o aquecimento, não se consegue praticamente nenhuma recuperação extra de proteína, ou seja, a precipitação é devida tão somente ao efeito da mudança de pH.

A lavagem do coágulo protéico tem por finalidade eliminar as impurezas oclusas dentro da massa, principalmente as proteínas alergênicas que, como foi dito na revisão bibliográfica, são resistentes ao calor, porém, solúveis em água.

O processo de secagem empregado, ainda que praticável somente em escala de laboratório, foi escolhido devido as faci-

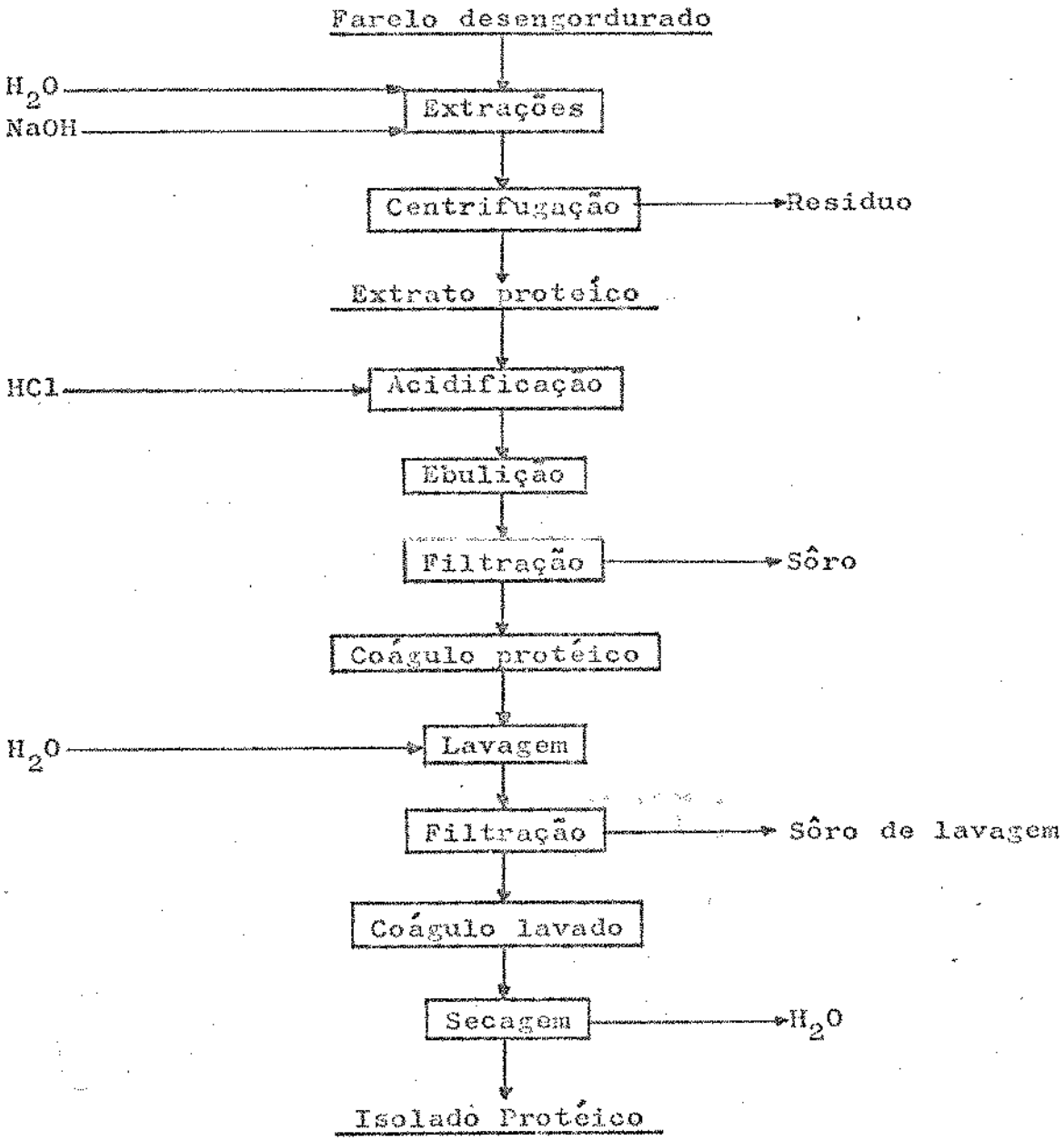
lidades existentes neste caso. Uma secagem em estufa com circulação de ar quente e à maior temperatura que a empregada neste estudo, daria um produto de cor mais escura, textura arenosa e possivelmente com ligeiras alterações no que se refere ao seu valor biológico.

Na Figura 9 apresenta-se um Diagrama de Fluxo do processo utilizado na obtenção dos isolados protéicos.

Os resultados obtidos na extração das proteínas dos farelos empregando-se os dois tipos de solventes mencionados anteriormente são apresentados no Quadro 13.

Os cálculos das porcentagens de extração foram feitos a partir da quantidade de proteína extraída em cada contato, do peso do farelo tratado e da proteína total nele contida.

FIGURA 9. - DIAGRAMA DE FLUXO DO PROCESSO UTILIZADO NA OBTENÇÃO DOS ISOLADOS PROTÉICOS.



QUADRO 13. - EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DOS FARELOS EMPREGANDO-SE COMO SOLVENTES NaOH A pH 11 E NaOH 0,5%.

Peso de farelo 300g.

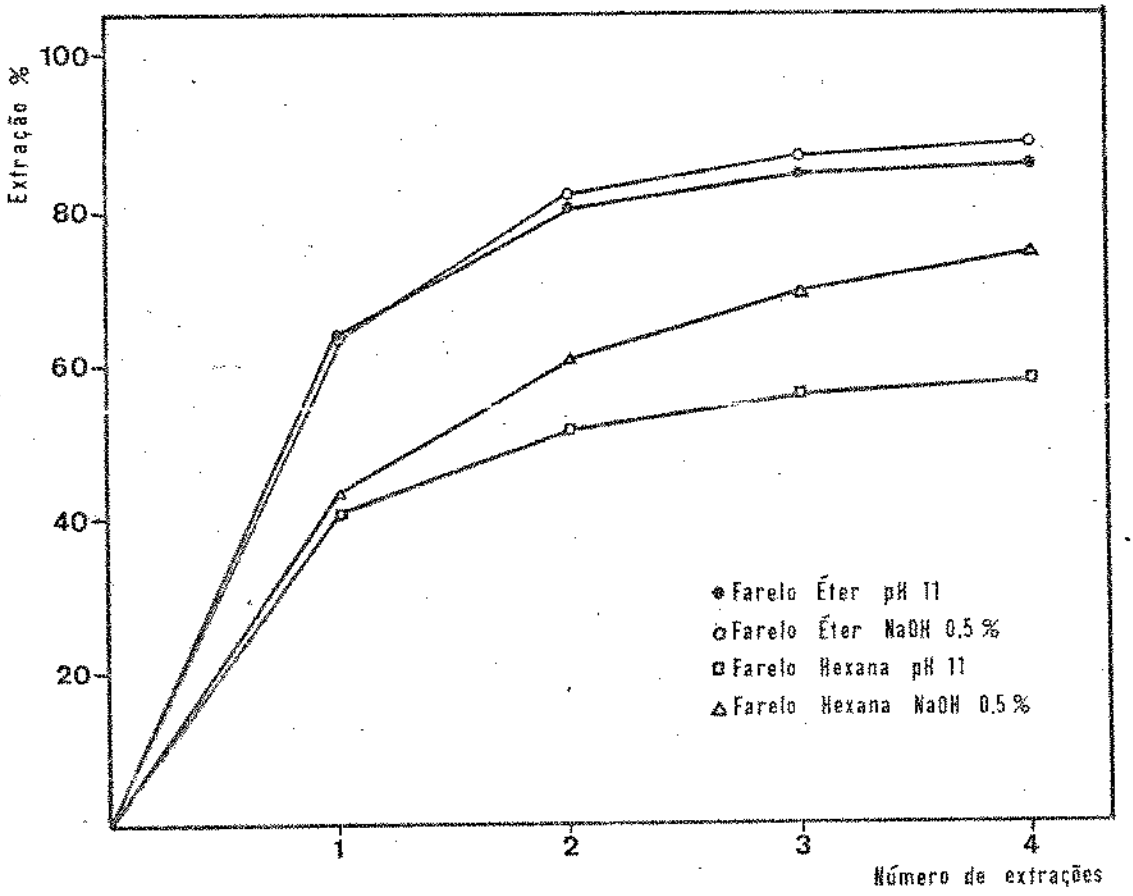
Relação sólido-solvente 1:5 p/v com 4 extrações por carga.

Tempo de contato 15 minutos com agitação constante e temperatura 45°C

Farelo	Solvente	Extração Nº	Solvente adicionado ml	Extrato recuperado ml	Concentração do extrato mg Prot./ml	Proteína extraída g	% Extração	
							Proteína / Farelo	Proteína / Prot.no far.
Éter (35,2% prot.)	NaOH pH 11	1	1500	1100	61,6	67,76	22,58	64,17
		2	1100	1070	15,8	16,90	5,63	16,00
		3	1070	1040	4,3	4,47	1,49	4,23
		4	1040	1040	1,6	1,66	0,55	1,58
		Total	4710	4250		90,79	30,25	85,98
	NaOH 0,5%	1	1500	1034	65,1	67,31	22,43	63,74
		2	1034	1045	18,8	19,65	6,55	18,61
		3	1045	1000	5,0	5,00	1,67	4,73
		4	1000	985	1,7	1,67	0,56	1,58
		Total	4579	4064		93,93	31,21	88,66
Hexana (36,3% prot.)	NaOH pH 11	1	1500	1020	42,8	43,66	14,55	40,09
		2	1020	853	15,0	12,83	4,28	11,78
		3	1020	975	5,1	4,97	1,66	4,56
		4	1020	1005	1,9	1,91	0,64	1,75
		Total	4560	3855		63,37	21,13	58,18
	NaOH 0,5%	1	1500	930	50,7	47,15	15,72	43,30
		2	930	930	20,4	18,97	6,32	17,42
		3	930	930	9,9	9,21	3,07	8,46
		4	930	945	6,4	6,05	2,02	5,56
		Total	4290	3735		81,38	27,13	74,74

Na Figura 10 apresentam-se os dados de extração acumulativa para cada um dos isolados.

FIGURA 10. - EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DOS FARELOS EMPREGANDO-SE COMO SOLVENTES NaOH À pH 11 E NaOH 0,5%.

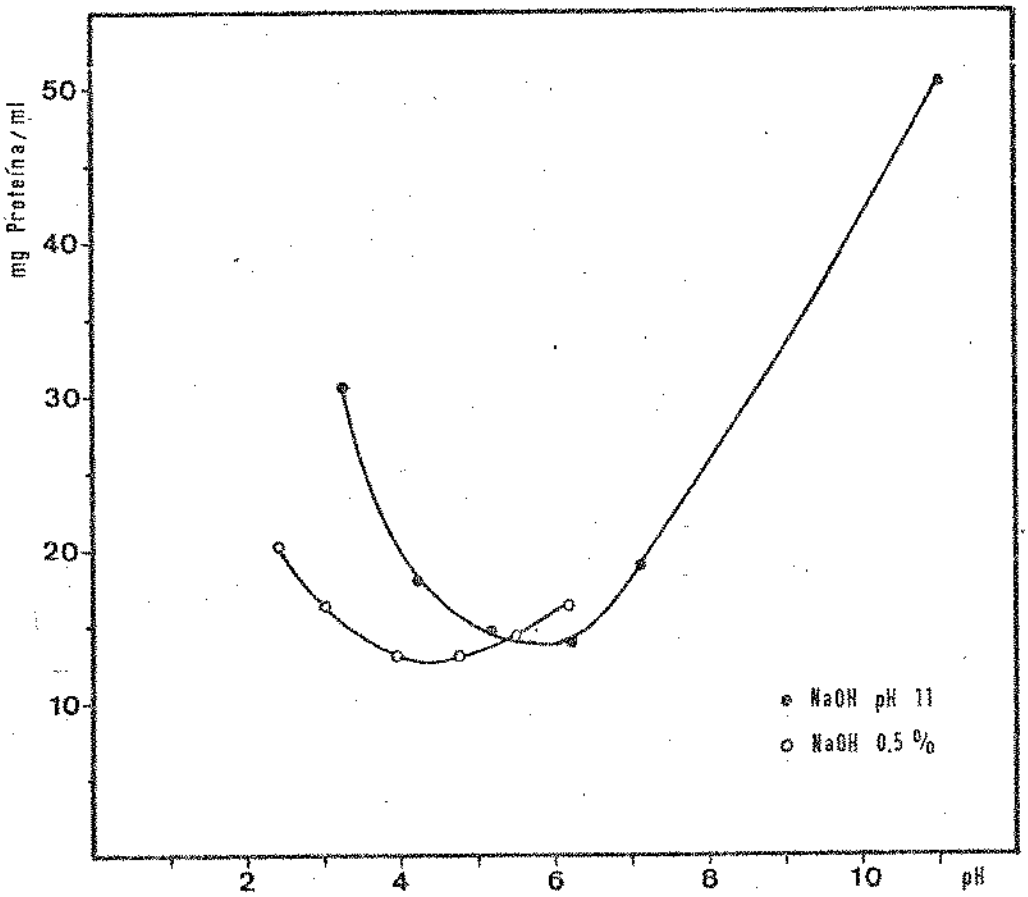


Analisando-se a Figura 10, pode-se observar que, no caso do farelo éter, o nível de extração obtido com os dois tipos de solvente é semelhante, enquanto que, no caso do farelo hexana, é bem maior quando usado NaOH 0,5%. Explica-se isto pelo fato que, ao receber o farelo hexana o tratamento térmico, desnaturam-se as proteínas requerendo, portanto, um solvente mais

enérgico para a sua extração.

Testou-se o pH de mínima solubilidade das proteínas usando-se os primeiros extratos obtidos do farelo hexana com NaOH pH 11 e NaOH 0,5%, considerando-se que os valores encontrados seriam válidos também para os extratos obtidos a partir do farelo éter, fato que foi comprovado em experimentação posterior. Os resultados obtidos empregando-se o método descrito em 2.4. do capítulo Material e Métodos, são apresentados na Figura 11.

FIGURA 11. - DETERMINAÇÃO DO pH DE MENOR SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS NOS EXTRATOS DO FARELO HEXANA OBTIDOS COM NaOH pH 11 e NaOH 0,5%.



Analisando-se a Figura 11 verifica-se que o pH de mínima solubilidade é diferente para cada um dos extratos, indicando que as proteínas sofreram alguma modificação no meio fortemente alcalino do NaOH 0,5%, devendo-se notar que, ao se acidificar esse extrato, ocorre o desprendimento de H_2S detectável pelo seu cheiro característico.

O pH de menor solubilidade para o extrato obtido com NaOH pH 11 é 5,8, que corresponde ao valor encontrado no estudo de extração a diversos valores de pH (Figura 4), enquanto que para o extrato obtido com NaOH 0,5% o valor é 4,5.

Feita a precipitação das proteínas dos extratos, o aquecimento e coagulação, a lavagem e a secagem, obtém-se os isolados protéicos que se apresentam como um pó fino de cor creme.

Os graus de recuperação protéica encontrados em cada caso são apresentados no Quadro 14, reportanto-se como porcentagem de proteína recuperada em relação à proteína extraída, ao peso de farelo e à proteína nele contida. No mesmo Quadro apresentam-se também, para fins de comparação, as porcentagens de proteína total extraída já reportadas no Quadro 13.

QUADRO 14. - PORCENTAGENS DE EXTRAÇÃO E DE RECUPERAÇÃO, NA OBTENÇÃO DOS ISOLADOS PROTÉICOS A PARTIR DOS FARELOS, EMPREGANDO-SE COMO SOLVENTES NaOH A pH 11 e NaOH 0,5% .

Farelo	Solvente	% Extração		% Recuperação		
		Prot. Ext. / Farelo	Prot.Ext. / Prot.no far.	Prot.Recup. / Prot. Ext.	Prot. Recup. / Farelo	Prot.Recup. / Prot.no far.
Éter (35,2% Prot.)	NaOH pH 11	30,25	85,98	74,20	22,45	63,80
	NaOH 0,5%	31,21	88,66	81,50	25,43	72,26
Hexana (36,3% Prot.)	NaOH pH 11	21,13	58,18	66,56	14,06	38,72
	NaOH 0,5%	27,13	74,74	77,40	20,99	57,85

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A análise do Quadro 14 mostra que para os dois tipos de farelo, o nível de recuperação da proteína extraída é maior quando usado NaOH 0,5% como solvente, significando que, ainda no caso do farelo éter, no qual não existe uma diferença significativa na extração, o uso deste solvente permite uma recuperação bem maior de isolado.

Deve-se notar que, comparando as extrações realizadas com o mesmo solvente, no caso do farelo éter obtém-se maior grau de recuperação da proteína extraída, explicando-se este fenômeno pelo fato de que as proteínas deste farelo, por não sofrerem aquecimento prévio, e portanto desnaturação, foram dissolvidas e precipitadas somente neste estágio do processo.

Observa-se também que o grau de recuperação final é aumentado pelo uso de solvente mais enérgico, e diminuído pelo tratamento térmico dado ao farelo.

5. Obtenção do Extrato Cru.

Aplicando-se o método descrito em 2.4. do capítulo Material e Métodos, obteve-se, a partir de 300g do farelo éter extraído com NaOH à pH 11, 1100ml de extrato, que após neutralização e liofilização, forneceu 76g de extrato seco.

A preparação deste extrato cru teve por finalidade obter um produto que conservasse, tanto quanto possível, as características originais das proteínas extraíveis contidas na mamona, a fim de se comparar o efeito produzido por elas e pelos isolados, nos animais usados para os ensaios biológicos.

6. Análise dos isolados protéicos, do extrato cru e da caseína empregada nos ensaios biológicos.

A composição dos isolados protéicos e do extrato cru

obtidos no laboratório, bem como a da caseína empregada nos ensaios biológicos, determinada segundo os métodos descritos no capítulo correspondente, é apresentada no Quadro 15.

QUADRO 15. - COMPOSIÇÃO DOS ISOLADOS PROTÉICOS, DO EXTRATO CRU E DA CASEÍNA EMPREGADA NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS.

Material	Composição %				
	Base úmida			Base seca	
	Umidade	Cinzas	Proteína	Cinzas	Proteína
Isolado Éter pH 11	6,52	1,65	92,2	1,77	98,8
Isolado Éter NaOH 0,5%	4,97	1,91	90,3	2,05	95,1
Isolado Hexana pH 11	5,92	0,90	97,7	0,95	103,5
Isolado Hexana NaOH 0,5%	5,77	1,09	89,5	1,16	94,8
Extrato cru	4,79	5,62	83,1	5,91	87,2
Caseína	9,33	2,74	82,0	3,02	90,5

Deve-se recordar que a porcentagem de proteína dosada segundo o método micro-Kjeldahl é calculada como N x 6,25, não sendo necessariamente esse o fator de transformação, sendo bem conhecido que em geral, o fator de conversão para proteínas de origem vegetal é menor. Contudo, de acordo com Smith (33), "o uso de dois ou mais fatores de conversão na literatura, podem levar a confusão e dificuldade na interpretação dos resultados nutri -

cionais ou de outra natureza, obtidos na pesquisa de proteínas". Ainda que o citado autor esteja se referindo especificamente às proteínas da soja, os mesmos critérios são aplicáveis no caso presente, não sendo, por outro lado, conhecidos os fatores de conversão exatos para as proteínas em estudo. Por esses motivos, não deve causar estranheza o fato de se obter porcentagens maiores que 100%.

Analisando-se o Quadro 15, observa-se que o teor de proteína nos isolados obtidos, encontra-se na faixa estipulada para este tipo de produto, notando-se que a extração com NaOH 0,5% fornece um produto com menor conteúdo protéico, fato que deve ser atribuído a que, sendo o solvente mais enérgico, extrai em maior quantidade substâncias que podem ser consideradas como impurezas e que coprecipitam com a proteína.

Deve-se notar que o elevado teor protéico do isolado hexana pH 11 pode ser considerado como uma anomalia, se comparado com os outros e que, como é demostrado depois, apresenta também um conteúdo de aminoácidos algo diferente.

O conteúdo menor de proteína e maior de cinzas no extrato cru, é explicado pelo fato de não existir nesse caso a etapa de purificação produzida pela precipitação.

As análises apresentadas serviram de base no cálculo das quantidades de cada um dos produtos adicionadas no preparo das rações empregadas nos ensaios biológicos.

7. - Determinação dos aminoácidos nos isolados proteícos.

No Quadro 16 encontra-se a composição em aminoácidos dos quatro isolados protéicos, obtida segundo o método descrito em 2.1. do capítulo anterior. Os valores foram expressos em gramas de aminoácido por 100g de proteína (N x 6,25).

Inclui-se no mesmo Quadro, para fins de comparação, a

composição em aminoácidos essenciais de uma referência teórica para as exigências humanas segundo um comitê de especialistas da F.A.O. (3).

QUADRO 16. - COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS CONTIDAS NOS ISOLADOS PROTÉICOS.

(g aminoácido /100g Proteína-N x 6,25)

Aminoácido	Isol.Éter pH 11	Isol.Éter NaOH 0,5%	Isol.Hexana pH 11	Isol.Hexana NaOH 0,5%	F.A.O
Lisina	2,68	2,55	1,89	2,05	4,2
Histidina	2,19	2,02	2,23	2,11	
Amonia	2,27	2,18	2,38	2,29	
Arginina	12,97	12,88	15,07	13,33	
Ác.Aspárt.	14,20	13,47	12,94	13,50	
Treonina	4,23	4,08	3,20	3,53	2,8
Serina	6,81	6,74	6,58	6,79	
Ác.Glutám.	25,33	26,04	27,58	29,68	
Prolina	4,58	4,24	4,29	4,22	
Glicina	4,97	4,84	4,53	5,00	
Alanina	5,36	5,18	5,06	5,06	
1/2 Cist.	1,43	0,85	1,03	*	2,0
Valina	4,67	4,55	5,26	4,59	4,2
Metionina	1,50	1,37	1,20	1,33	2,2
Isoleucina	3,73	3,61	3,86	3,53	4,2
Leucina	7,71	7,38	6,26	7,02	4,8
Tirosina	3,55	3,42	2,46	2,94	2,8
Fenilalan.	4,39	4,27	3,94	4,27	2,8

* Neste caso não se obteve uma boa resolução da cistina podendo-se apenas estimar, por comparação com os outros cromatogramas, que é semelhante à do isolado éter NaOH 0,5%.

Analisando-se o Quadro 16, verifica-se que existe alguma discrepância entre a composição do isolado hexana pH 11 e a dos outros isolados, estimando-se que pode ser atribuida ao fato

de ter-se, nesse caso, níveis bem mais baixos de extração e recuperação sendo, portanto, proteínas com diferente composição.

Nota-se que, com o emprego de tratamentos mais enérgicos (maior tratamento térmico e maior alcalinidade do solvente), se produz uma destruição parcial de alguns aminoácidos, sobretudo de lisina, treonina, cistina, metionina e tirosina todos eles essenciais, sendo crítica a situação sobretudo com a lisina e sulfurados que já se encontram em quantidade limitante mesmo no isolado éter pH 11.

8. Análise dos alergênicos.

Tentou-se determinar o conteúdo de alergênicos tanto nos farelos como nos isolados obtidos, empregando-se o método de Waller e Negi (40), mas obtiveram-se resultados inconsistentes, sendo rejeitados os valores encontrados.

No desenvolvimento da pesquisa, o autor adquiriu sensibilidade aos alergênicos podendo, portanto, servir a sua própria reação frente aos diversos produtos como um testemunho do grau de desalerginização dos produtos isolados.

Observou-se que, ao trabalhar com o farelo éter, a reação foi intensa produzindo espirros, coriza e dificuldade no sistema respiratório além de mal estar geral, mesmo usando máscara contra pó no trabalho. Já no caso do farelo hexana, precisou-se de uma exposição bem maior para produzir efeitos semelhantes, mostrando que o tratamento térmico dado ao mesmo, destruiu parte dos alergênicos. Ao se trabalhar com os isolados obtidos, ainda sem proteção, não se manifestou reação nenhuma, mostrando que o grau de desalerginização conseguido foi elevado, ainda que não se possa afirmar tenha sido total. Esta afirmação pode ser substanciada por observações de Coulson e colaboradores (6), que ao fazerem a dosagem dos alergênicos, encontram que as proteínas precipitadas pelo calor não dão, praticamente, reação positiva para

alergênicos.

9. Determinação do valor biológico.

Os resultados obtidos na determinação do NPU (utilização líquida da proteína) realizada segundo o método descrito em 2.5. do capítulo anterior, são apresentados no Quadro 17.

Para a determinação da proteína corporal, aplicou-se a correlação encontrada por Miller e Bender (22) entre o teor de água corporal e o de proteína, considerando que os ratos tinham no início da experiência uma idade média de 22 dias, e de 34 dias no final da mesma.

Considerou-se como nula a quantidade de proteína existente no amido de milho, sendo, portanto, levada em conta somente a proveniente dos isolados ou da caseína.

Aproveitando-se os dados obtidos durante a experimentação, calculou-se também as relações de ganho de peso contra proteína consumida, sendo estas equivalentes ao valor de PER. Sabendo-se que num estudo de PER com 28 dias de duração, existe tendência de diminuição dos valores computados semana a semana, sendo esta diminuição, em geral, proporcional para as diversas rações, os valores encontrados em apenas 10 dias de ingestão das dietas são válidos para efeitos comparativos.

O grupo de ratos que foi alimentado com a ração contendo o extrato crú, apresentou uma mortalidade de 100% dentro dos primeiros 5,5 dias da experiência sendo que o primeiro animal morreu antes de dois dias. O consumo de ração deste grupo foi praticamente nulo (1,5g em média). Cabe notar que feita a observação "post mortem" das vísceras destes animais, não apresentaram sinais visíveis de intoxicação, fato atribuível a que a alta toxicidade do pouco alimento ingerido matou o animal antes do aparecimento de mudanças morfológicas visíveis.

No fim da experiência, todos os outros animais apresen

taram um aspecto sadio exceto um deles, alimentado com isolado éter NaOH 0,5% que sofreu um ferimento sendo porisso eliminado.

QUADRO 17. - RESULTADOS DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS.

Valores médios de grupos de 5 ratos cada.
Rações com 10% de proteína.
Alimentação "ad libitum" durante 10 dias.

Ração	Peso Inicial g/rato	Alteração do peso g/rato	Proteína Consumida g/rato	Proteína Corporal g/rato	PER	NPU %
Isenta de proteína	54,30	-10,62	0	7,15		
Caseína	54,14	+29,50	8,836	13,06	3,34	66,88
Isol. Éter pH 11	54,14	+ 6,86	6,986	9,73	0,98	56,93
Isol. Éter NaOH 0,5%	54,04	+ 8,01	6,398	10,09	1,25	45,95
Isol.Hexana pH 11	54,48	+ 3,70	6,174	9,47	0,60	37,58
Isol.Hexana NaOH 0,5%	54,58	+ 5,44	7,028	9,53	0,77	33,86
Isol.Hexana pH 11 Enriquecido*	54,28	+17,52	8,574	11,37	2,04	49,22

* Enriquecido com 3,0% de L-lisina e 1,54% de DL-metionina em relação à proteína.

Analisando-se o Quadro 17, observa-se que o nível de aceitabilidade das proteínas é bom pois todos os animais comeram

quantidades semelhantes e não muito diferentes da caseína, levando-se em consideração que os grupos alimentados com caseína e isolado hexana pH 11 enriquecido, por terem crescido mais, consumiram também uma quantidade maior. Este fato, ao lado do aspecto sadio apresentado pelos animais, comprova que se conseguiu a desintoxicação das proteínas isoladas.

Comparando-se os valores de ganho de peso, PER e NPU, observa-se que os valores de PER encontrados refletem melhor a resposta dos animais às dietas em estudo, principalmente ao enriquecimento com aminoácidos do isolado hexana pH 11, enquanto que os valores de NPU mostram uma menor consistência. Estes valores de PER mostram que os isolados obtidos a partir do farelo éter apresentam um valor biológico ligeiramente maior, fato que pode ser explicado pelo menor tratamento térmico recebido e pela menor destruição dos aminoácidos essenciais limitantes segundo foi constatado, e que, com o enriquecimento com os dois aminoácidos limitantes lisina e metionina, eleva-se grandemente o valor biológico da proteína.

O fato do enriquecimento não se refletir nos valores de NPU de maneira tão sensível, pode ser explicado pela afirmação de Hegsted e Neff (13) que "proteínas deficientes em lisina, ao contrário do esperado, apresentam valores de NPU mais próximos aos de proteínas de alta qualidade, à medida que diminui o seu nível de ingestão".

Cabe notar ademais que, segundo Said e Hegsted (30,31) e Hegsted e Chang (12), ao fazer a correlação entre o ganho de proteína corporal e a proteína consumida, o ponto de interseção a um consumo zero difere do valor encontrado para o grupo que não recebeu nenhuma proteína, sobretudo no caso de proteínas de baixo valor biológico, sendo, portanto, aconselhável a utilização, para cada proteína, de vários grupos de animais alimentados com rações contendo diferentes porcentagens de proteína, obtendo-se, caso contrário, um valor biológico acima do real.

Cientes das limitações do método empregado nos ensaios

biológicos e levando em conta que um estudo de PER também não é uma medida real de eficiência protéica (12), limitados por fatores de tempo e disponibilidade de material para o teste, optou - se pelo NPU como medida de eficiência nutricional dos isolados .

O método do NPU é largamente utilizado por outros pesquisadores e os valores obtidos neste trabalho para materiais já conhecidos como a caseína, podem ser comparados com os existentes na literatua.

Comparando, portanto, com a tabela de valores de NPU fornecida por Miller e Bender (22) encontra-se que o NPU dos isolados obtidos é semelhante aos de glútem de trigo ou glútem de milho, considerados proteínas de baixo valor alimentício. Já no caso do isolado éter NaOH 0,5%, o seu NPU é comparável com o do levedo seco ou o farelo de amendoim e, no caso do isolado hexana pH 11 enriquecido com os aminoácidos limitantes lisina e metionina, atinge-se valores comparáveis aos do farelo de copra (côco), sendo porém, menor que os dos farelos de algodão, soja ou linho.

CONCLUSÕES

Nas condições do trabalho, e baseados nos resultados obtidos e apresentados no capítulo anterior, podemos concluir :

1.- O tratamento térmico de cocção dado às sementes antes da extração do óleo, diminui notavelmente a solubilidade das proteínas da mamona.

2.- O aumento da alcalinidade do solvente aquoso empregado na extração das proteínas do farelo desengordurado, aumenta a recuperação das mesmas no processo de isolamento, sendo maior o efeito no farelo aquecido.

3.- O grau diferente de aquecimento dado aos farelos não apresenta um efeito apreciável sobre o valor biológico das proteínas, contudo, quando combinados um maior tratamento térmico e maior alcalinidade do solvente, nota-se uma ligeira diminuição no PER e NPU das proteínas dos isolados.

4.- As análises de aminoácidos mostram que as proteínas da mamona são deficientes principalmente em lisina e aminoácidos sulfurados.

5.- A suplementação da proteína com 3% de L-lisina e 1,54% de DL-metionina mais que triplica o PER (o valor passou de 0,6 a 2,04), enquanto o NPU eleva-se de 37,5 a 49,2%.

6.- O aquecimento do extrato protéico no "pI" por 5 minutos a ebulição, é suficiente para destruir a toxicidade da ricina .

7.- O processo de obtenção dos isolados protéicos permite, pela diferença de solubilidade, eliminar dos mesmos a maior parte (se não a totalidade) das proteínas alergênicas contidas na mamona.

BIBLIOGRAFIA

1. A.O.C.S. -Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists' Society,3rth Edition. American Oil Chemists' Society,Chicago,Illinois,1960.

2. BECKMAN. -Model 120C Amino Acid Analyzer Instruction Manual.Spinco Division Beckman Instruments,Inc. Stanford Industrial Park,Palo Alto,California.

3. BENDER,A.E. -Dietetic Foods. Chemical Publishing Co.,New York,1967.

4. BOLLEY,D.S., and R.L. HOLMES. -Inedible Oilseed Meals. In ALTSHUL A.M. -Processed Plant Protein Foodstuffs. Academic Press Inc. Publishers, New York, 1958.

5. BREESE JONES,D. -Proteins of the Castor Beans - Their Preparation,Properties and Utilization. J. Am. Oil Chem. Soc.,24,247,(1947).

6. COULSON,E.J., J.R. SPIES, and S.H. STEVENS. -The Allergen Content of Castor Beans and Castor Pomance. J. Am. Oil Chem. Soc.,37,657,(1960).

7. D'AQUIN,E.L., J. POMISKI, H.L.E. VIX, N.B. KNOEPFLER, B.S. KULKARNI, and E.A. GASTROCK. -Direct Solvent-Extraction of Castor Beans Yields High Grade Oil. J. Am. Oil Chem. Soc.,37,93,(1960).

8. F.A.O. -Anuario de Producción 1973,Vol.27. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación, F.A.O.,1974.

9. FULLER,G., H.G.Jr. WALKER, A.C. MOTTOLA, D.D. KUZMYCKY, G.O. KOHLER, and P. VOHRA. -Potential for Detoxified Castor Meal. J. Am. Oil Chem. Soc.,48,616,(1971).

10. FUNATSU,M. -The Structure and Toxic Function of Ricin. In -Proteins Vol.2 Structure and Function. J. Wiley and Sons, New York,1972.

11. GARDNER,H.K.Jr., E.L. D'AQUIN, S.P. KOLTUN E.J. McCOURTNEY, H.L.E. VIX, and E.A. GASTROCK. -Detoxification and Deallerginization of Castor Beans. J. Am. Oil Chem. Soc.,37,142,(1960).

12. HEGSTED,D.M., and Y. CHANG. -Protein Utilization in Growing Rats I. Relative Grouth Index as a Bioassay Procedure. J. Nutr.,85,159,(1965).

13. _____ , and R. NEFF. -Efficiency of Protein Utilization in Young Rats at Various Levels of Intake. J. Nutr.,100,1173,(1971).

14. JANSON,H. -Castor Bean Processing. Oleagineaux,28,307, (1973).

15. JOSHI,B.N., and J.P. VARMA. -Castor Seed Proteins and Their Viscosities. J. Am. Oil Chem. Soc.,32,553,(1955).

16. KODRAS,R., C.K. WHITEHAIR, and R. McVICAR. -Studies on the Detoxication of Castor Seed Pomance. J. Am. Oil Chem. Soc.,26,641,(1949).

17. LAYTON,L.L., LI.K. MOSS, and F. DeEDS. -The Complex Nature of Castor Sensitivity. J. Am. Oil Chem. Soc.,38, 76,(1961).

18. _____ , D.T. DANTE, Ll.K. MOSS, N.H. DYE, and F. DeEDS, -Electrophoretic Fractionation of Soluble Antigenic Proteins from the Seed of Ricinus communis, (Castor Bean). J. Am. Oil Chem. Soc.,38,405,(1961).

19. LIENER,I.E. -Phytohemagglutinins:their Nutritional Significance. Symposium of Toxic Proteins and Peptides. J. Agr. Food Chem.,22,17,(1974).

20. MANSMANN,H.C.Jr. -Foods as Antigens and Allergens. In -Toxicants Occurring Naturally in Foods. Publication 1354,National Academy of Sciences,National Research Council,Washington D.C.,1966.

21. MEYER,E.W. -Oilseed Protein Concentrates and Isolates. J. Am. Oil Chem. Soc.,48,484,(1971).

22. MILLER,D.S., and A.E. BENDER. -The Determination of the Net Utilization of Proteins by a Shortened Method. Br. J. Nutr.,9,382,(1955).

23. MOTTOLA,A.C., A.P. HENDRICKSON, D.E. O'CONELL, RHODA PALTER, and G.O. KOHLER. -Pilot Plant Deactivation of Castor Meal Antigen.Lime Process. J. Agr. Food Chem.,16,725,(1968).

24. _____ , L. ELDRIDGE, V. HERRING, and G.O. KOHLER. -A Comparison of Pasive Cutaneous Anaphylaxis Guinea Pig Responses Using an Itravenous or an Intradermal Route for Antigen Challenge. J. Am. Oil Chem. Soc., 47,458,(1970).

25. _____ , B. MACKEY, V. HERRING, and G.O. KOHLER. -Castor Meal Antigen Deactivation-Pilot Plant Ammonia Process. J. Am. Oil Chem. Soc.,49,101,(1971).

26. _____ , _____ , and V. HERRING. - Castor Meal Antigen Deactivation - Pilot Plant Steam Process. J. Am. Oil Chem. Soc.,48,510,(1971).

27. MOTTOLA,A.C., B. MACKEY, H.G. WALKER, and G.O. KOHLER. -Castor Meal Antigen Deactivation:Pilot Plant Lime Process. J. Am. Oil Chem. Soc.,49,662,(1972).

28. OSBORNE,T.B., L.B. MENDEL, and I.F. HARRIS. -A Study of the Proteins of the Castor Bean With Special Reference to the Isolation of Ricin. Am. J. Physiol.,14,259, (1905).

29. ROGERS,Q.R., and A.E. HARPER. -Amino Acid Diets and Maximal Growth in the Rat. J. Nutr.,87,267,(1965).

30. SAID,A.K., and D.M. HEGSTED. -Evaluation of Dietary Protein Quality in Adult Rats. J. Nutr.,99,474,(1969).

31. _____ , and _____. -Response of Adult Rats to Low Dietary Levels of Essential Amino Acids. J. Nutr. 100,1363,(1970).

32. SANBRA. -LEX Protéico.Contribuição da SANBRA ao desenvolvimento da pecuária nacional. Sociedade Algodoeira do Nordeste Brasileiro, Recife,1960.

33. SMITH,A.K., and S.J. CIRCLE. -Soybeans:Chemistry and Technology, Vol. 1. The AVI Publishing Co.,Inc.,Westport Connecticut,1972.

34. SPIES,J.R., and E.J. COULSON. -The Chemistry of Allergens. VII. Isolation and Properties of an Active Protein-polysaccharidic Fraction,CB-1A,from Castor Beans. J. Am. Chem. Soc.,65,1720,(1943).

35. SPIES,J.R., E.J. COULSON, D.C. CHAMBERS, H.S. BERNTON, and H. STEVENS. -The Chemistry of Allergens. IX. Isolation and Properties of an Active,Carbohydrate-Free Protein from Castor Beans. J. Am. Chem. Soc.,66,748, (1944).

36. _____ .-Allergens. Symposium on Toxic Proteins and Peptides. J. Agr. Food Chem.,22,30,(1974).

37. U.S. Department of Agriculture. -Foreign Agriculture Circular FFO 2-68. Foreign Agricultural Service,Washington,1968.

38. VAN DE KAMER,S.H., and L. VAN JUIKEL. -Rapid Determination of Crude Fiber in Cereals. Cereal Chem.,29,239, (1952).

39. VILLELA,G.G., M. BACILA, e H. TASTALDI. -Técnicas e Experimentos de Bioquímica. Guanabara Koogan S.A.,Rio de Janeiro,1973.

40. WALLER,G.R., and S.S. NEGI. -Isolation of Ricin,Ricinine and the Allergenic Fraction from Castor Seed Pomance from Two Different Sources. J. Am. Oil Chem.Soc.,35, 409,(1958).

41. VILHJALMSDOTTIR,L., and A. FISHER. -Castor Bean Meal as a Protein Source for Chickens:Detoxification and Determination of Limiting Amino-Acids. J. Nutr.,101, 1185,(1971).

42. WEISS,E.A. -Castor,Sesame and Safflower. Leonard Hill Books,London,1971.