


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parecer

Este exemplar corresponde a edição final da tese defendida por Walkiria Hanada Viotto e aprovada pela comissão julgadora em 11.09.87

Campinas, 11 de setembro de 1987

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Banca

"ESTUDO DA DESTOXIFICAÇÃO DO FARELO

DE MAMONA E SEU CONTROLE ANALÍTICO"

WALKIRIA HANADA VIOTTO  
Engenheira de Alimentos

13/87

PROF. DR. WALTER ESTEVES  
Orientador

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de MESTRE em Tecnologia de Alimentos.

## ERRATA

Página	Parágrafo	onde lê-se:	leia-se
10	2	foi homogênea ultracentrifugamente	mostrou-se homogênea por ultracentrifugação
44	3	altoclavagem	autoclavagem
79	1	é de supor	é de se supor
91	1	perfeitamentecom	perfeitamente com

Dedicatória

Ao Viotto, Marcelo e Lucas

## AGRADECIMENTOS

Ao Orientador, Prof. Dr. WALTER ESTEVES, pelo empenho na realização deste trabalho.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e à Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP.

Aos Professores: Dr. Salvador Massaguer Roig e Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves, pelo estímulo e incentivo na conclusão deste trabalho.

À Roseli Aparecida Ferrari, do Laboratório de óleos e Gorduras, pelo apoio e colaboração.

À ABIA - Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, pelo serviço de impressão.

## ÍNDICE

RESUMO.....	01
1. INTRODUÇÃO.....	02
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1. INTRODUÇÃO.....	04
2.2. RICINA: PREPARAÇÕES, PURIFICAÇÕES, ESTRUTURA E PROPRIEDADES.....	08
2.2.1. Ricina D.....	17
2.2.2. Ricina E.....	29
2.2.3. Hemaglutinina da mamona.....	30
2.3. RICINA: MECANISMO DE AÇÃO TÓXICA E EFEITOS FISIOLÓGICOS.....	31
2.4. MÉTODOS DE DESTOXIFICAÇÃO.....	38
2.5. DETECÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA DO FARELO DE MAMONA.....	46
2.6. RICININA.....	49
2.7. ALÉRGENO.....	50
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.1. MATERIAL.....	53
3.1.1. Matéria-Prima.....	53
3.1.2. Reagentes e Equipamentos.....	53
3.1.3. Animais utilizados nos ensaios biológicos.....	54
3.2. MÉTODOS.....	54

3.2.1. Métodos Analíticos.....	54
3.2.1.1. Umidade.....	54
3.2.1.2. Cinzas.....	54
3.2.1.3. óleo.....	55
3.2.1.4. índice de Acidez do óleo de Mamona....	55
3.2.1.5. índice de Refração do óleo de mamona.....	55
3.2.1.6. Atividade óptica do óleo de Mamona....	55
3.2.1.7. Fibra Bruta.....	56
3.2.1.8. Açúcares Totais.....	56
3.2.1.9. Proteína.....	56
3.2.1.10. Proteína Solúvel.....	56
3.2.1.11. Aminoácidos.....	57
3.2.1.12. Reação de Biureto.....	59
3.2.1.13. Reação de Sakaguchi.....	59
3.2.2. Métodos Experimentais.....	62
3.2.2.1. Preparo dos Farelos de Laboratório....	62
3.2.2.2. Tratamento Térmico do Farelo de Mamona para Inativação do Fator Tóxico.....	63
3.2.2.3. Extração das Proteínas Solúveis do Farelo de Mamona.....	63
3.2.2.4. Ensaio Biológico.....	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	65
4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS FARELOS DE MAMONA PREPARADOS	

NO LABORATÓRIO E DOS FARELOS DE MAMONA INDUSTRIAIS.....	65
4.1.1. Composição Centesimal.....	65
4.2. EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE OS COMPONENTES DO FARELO.....	67
4.2.1. Efeito do Tratamento Térmico Sobre a Atividade óptica do óleo de Mamona.....	67
4.2.2. Efeito do Tratamento Térmico Sobre o índice de Refração do óleo de Mamona.....	69
4.2.3. Efeito do Tratamento Térmico Sobre o índice de Acidez do óleo de Mamona.....	70
4.2.4. Efeito do Tratamento Térmico Sobre o Teor de Açúcares Totais do Farelo de Mamona....	71
4.2.5. Efeito do Tratamento Térmico Sobre o Teor de Proteína Solúvel do Farelo de Mamona....	72
4.2.6. Efeito do Tratamento Térmico Sobre os Aminoácidos do Extrato Protéico do Fa- relo de Mamona.....	77
4.3. EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO NA TOXIDEZ DOS FARELOS...	82
4.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA SOLÚVEL PELO TESTE DE BIURETO.....	89
4.5. DETERMINAÇÃO DE ARGININA COM O MÉTODO DE SAKAGUCHI (89) MODIFICADO.....	90
4.6. MÉTODO QUÍMICO PARA DETECÇÃO DE TOXIDEZ EM FARELO DE MAMONA.....	91
5. CONCLUSÕES.....	95
6. BIBLIOGRAFIA.....	96

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01 - Composição percentual da semente de mamona indiana.....	05
Tabela 02 - Propriedades fisiológicas das proteínas contidas na ricina Tb e na ricina cristalina.....	13
Tabela 03 - Propriedades físicas e fisiológicas da Ricina Cí..	14
Tabela 04 - Composição de aminoácidos da Ricina Cí.....	15
Tabela 05 - Composição de aminoácidos da Ricina D.....	19
Tabela 06 - Propriedades físicas da Ricina D e das subunidades S - CM da Ricina D.....	22
Tabela 07 - Composição de aminoácidos das cadeias S - CM Ile e S - CM Ala.....	24
Tabela 08 - Composição de aminoácidos do CB - 1A.....	52
Tabela 09 - Composição centesimal dos farelos de mamona Industriais.....	65
Tabela 10 - Composição centesimal dos farelos de laboratório..	66



Tabela 11 - Efeito do tratamento térmico sobre a atividade óptica do óleo de mamona.....	68
Tabela 12 - índice de refração do óleo de mamona antes e depois do tratamento térmico a 125 °C/1 h.....	69
Tabela 13 - índice de acidez do óleo de mamona antes e depois do tratamento térmico a 125 °C/1 h.....	70
Tabela 14 - Teor de açúcares totais do farelo de mamona antes e depois do tratamento térmico a 125 °C/3h..	71
Tabela 15 - Proteína solúvel do farelo de mamona antes e depois do tratamento térmico a 125 °C/3 h.....	72
Tabela 16 - Proteína solúvel dos farelos de mamona preparados em laboratório antes e depois do tratamento térmico a 125 °C.....	74
Tabela 17 - Teor de aminoácidos do extrato protéico do farelo de mamona antes e depois do tratamento térmico....	78
Tabela 18 - Dose mínima de proteína extraível de farelo de mamona sem tratamento térmico, injetada intra- peritonealmente, suficiente para causar a mor- te do animal em 4 dias (DLM).....	82

Tabela 19 - Avaliação da toxidez do farelo de mamona, auto-clavado a 125 °C, em cobaias por via intraperitoneal.....	86
Tabela 20 - Tratamento térmico de inativação do fator tóxico do farelo de mamona.....	88
Tabela 21 - Comparação do teor de arginina em caseína pelo método de Sakaguchi adaptado com valores de literatura.....	90
Tabela 22 - Avaliação por método químico da toxidez de farelos de mamona de várias origens autoclavados a 125 °C, por tempos diversos através da relação S / 10 B.....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura principal da ricina D.....	25
Figura 2 - Sequência completa de aminoácidos da cadeia Ile da ricina D.....	27
Figura 3 - Estrutura primária da cadeia Ala da ricina D.....	28
Figura 4 - Estrutura esquemática da ricina.....	34
Figura 5 - Estrutura esquemática da ricina e da aglutinina da mamona.....	37
Figura 6 - Gráfico: teor de proteína solúvel (mg proteína/Ml) Vs tempo de tratamento térmico a 125 °C (min).....	76
Figura 7 - Gráfico: porcentagem de arginina Vs tempo de autoclavagem a 125 °C (min).....	81

## SUMMARY

Four samples of castor bean meal of industrial origin and two samples of castor meal produced in the laboratory were autoclaved at 125 °C for different time intervals and submitted to toxicity tests in guinea pigs. It was shown that a time of 10 minutes was needed for total detoxification of the analysed samples.

On evaluating the effect of the heat treatment on the components of the castor meal, it was discovered that the percentage of arginine in the soluble protein increased with the intensity of heat treatment, thus constituting a good chemical parameter for the evaluation of the residual toxicity of castor bean meal detoxified by thermal treatment.

Thus the percentage of arginine was proposed as a toxicity index of castor meal, expressed as the S/10 B ratio, that is the relation between the quantity of arginine determined by the modified Sakaguchi method and the quantity of soluble protein determined by the Biuret method.

When the ratio S/10 B is equal or greater than 13, the castor meal analysed was shown to be completely detoxified.

## RESUMO

Quatro farelos de mamona de origem industrial e 2 farelos de mamona produzidos no laboratório foram autoclavados a 125 °C por vários tempos e submetidos a testes de toxidez em cobaias, observando-se a necessidade de um tempo de 10 minutos para a total destoxificação das amostras analisadas.

Ao se avaliar o efeito do tratamento térmico sobre os constituintes do farelo, descobriu-se que a porcentagem de arginina, na proteína solúvel, aumentou com a intensidade do tratamento térmico, constituindo-se portanto num bom parâmetro químico para avaliação de toxidez residual do farelo de mamona, destoxificado por tratamento térmico.

Propôs-se então, como indicador de toxidez do farelo de mamona, a sua porcentagem de arginina, expressa pela relação S/10 B, ou seja, a relação entre o teor de arginina determinado pelo método Sakaguchi modificado e o teor de proteína solúvel, determinado pelo método de Biureto.

Quando a relação S/10B > 13, os farelos analisados se mostraram totalmente destoxificados.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o 2º produtor mundial de semente de mamona e o primeiro em produção de óleo extraído (124), de grande valor industrial. O volume de óleo de mamona produzido pelo país é de aproximadamente 150.000 ton/ano, superando a Índia que é o maior produtor dessa cultura (124).

O farelo de mamona, resíduo da extração do óleo de semente de mamona, possui cerca de 40% de proteína bruta (69). Apesar do seu elevado teor proteico, ele vem sendo utilizado como fertilizante, devido a suas propriedades tóxicas e alergênicas (28).

Atualmente, são bem conhecidos os processos de destoxificação total do farelo de mamona e redução do seu conteúdo alergênico, o que viabiliza o seu uso como fonte de proteína em rações animais (64). Os métodos usados para inativação da ricina, proteína responsável pela toxidez do farelo de mamona, são extração de material com água, ácidos e outros solventes; utilização de raios ultravioleta; fermentação do farelo; tratamento com agentes químicos e utilização de calor seco e úmido. O mais adequado para o tratamento de grandes quantidades de resíduo é o tratamento térmico.

O uso do resíduo de mamona na formulação de rações requer o controle da sua atividade tóxica, que não pode ser facilmente detectada por análises químicas. Ela é frequentemente determinada por sua atividade biológica ou bioquímica, isto é, através de testes de toxidez em animais e de ensaios de hemaglutinação. O teste de hemaglutinação mede, muitas vezes, o nível do poder hemaglutinante sem a esperada indicação do grau de toxidez do farelo (59). Por outro lado, os testes de toxidez em animais são impraticáveis a nível industrial.

No presente trabalho, procurou-se estudar as condições de destoxificação através de autoclavagem das amostras, monitoradas com ensaios biológicos e buscando-se paralelamente desenvolver um teste químico, rápido e confiável para detectar a toxidez residual no farelo, que pudesse servir como controle e garantia de que o produto foi destoxificado para, então, ser utilizado em rações animais.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. INTRODUÇÃO

A mamona é a semente da planta *Ricinus communis*, a única espécie do gênero *Ricinus*, da família *Euphorbiaceae*. A mamoneira é uma planta arbórea de 1 a 5 m de altura, podendo alcançar 10 m ou mais, que cresce espontaneamente em regiões tropicais e subtropicais (49).

A semente de mamona é composta, em média, de 25% de casca e 75% de semente. A percentagem de casca depende da variedade da semente. A composição percentual da semente de mamona indiana, variedade Bombaim, é dada na Tabela 1 (64).

Segundo a FAO PRODUCTION YEARBOOK de 1982, a área global cultivada de mamona é de 1.603.000 ha, sendo que a Índia contribui com 558.000 ha e o Brasil com 469.000 ha. A produção mundial de semente de mamona em 1982 foi de 872.000 ton, sendo que os dois principais países produtores, a Índia e o Brasil, foram responsáveis por 302.000 ton e 212.000 ton, respectivamente (25).

O cultivo da semente de mamona tem aumentado, quase que exclusivamente, devido ao óleo extraído das sementes, que é um óleo de grande valor industrial. Em 1980, a produção mundial de óleo de mamona atingiu a casa das 394.000 ton. Somente o Brasil



exporta entre 20.000 a 50.000 ton/ano. A exportação de óleo desses dois países representa cerca de 90% de todo o óleo de mamona comercializado no mundo. A demanda internacional desse óleo tem sido crescente nos últimos anos e, de acordo com um trabalho elaborado pelo Ministério das Relações Exteriores do Brasil, o consumo mundial deste óleo deverá elevar-se das atuais 200.000 ton para cerca de 400.000 ton em 1987 (124).

Tabela 1 - Composição percentual da semente de mamona indiana.

	semente integral	amêndoa	casca
Composição da semente	-	70	30
Água	5,14	3,60	8,76
Proteína	17,88	23,43	4,76
óleo	46,65	66,02	0,98
Carboidrato	12,61	4,01	32,92
Fibra	14,99	0,70	48,69
Cinzas	2,73	2,24	3,89

A semente de mamona contém cerca de 50% de óleo, cujo principal ácido graxo componente, o ácido ricinoleico, alcança

níveis de até 93% e confere ao óleo algumas características especiais, a saber:

- a) solubilidade em etanol,
- b) baixa solubilidade em éter de petróleo,
- c) solubilidade somente em hexana quente, e
- d) alta viscosidade e reatividade química (146).

Devido a suas propriedades físicas, o óleo encontra várias aplicações na indústria moderna. Após desidratação, é utilizado na fabricação de tintas e isolantes. Serve como lubrificante na aeronáutica, sendo o melhor óleo para lubrificação de motores a jato, e como fluido em instalações hidráulicas. É usado também como base para a manufatura de cosméticos e de muitos tipos de drogas farmacêuticas. Também é empregado em vários processos industriais, como a fabricação de corantes, anilinas, desinfetantes, germicidas, colas e aderentes; óleos lubrificantes de baixa temperatura; como base para fungicidas e inseticidas, tintas de impressão e vernizes. Uma das aplicações de grande valor econômico do óleo de mamona é na fabricação de nylon e de matéria plástica, onde seu emprego é de grande relevância (99).

O óleo de mamona é obtido industrialmente por prensagem simples ou dupla, ou alternativamente por prensagem mecânica acompanhada de extração por solvente. A prensagem pode ser efetuada em prensa hidráulica ou em prensa contínua, produzindo uma torta com aproximadamente 10% de óleo residual. A torta submetida

à extração com hexana produz um farelo com cerca de 1% de óleo. Cada tonelada de óleo de mamona deixa cerca de 1200 Kg de resíduo (113).

O farelo de mamona contém cerca de 40% de proteína bruta, que é deficiente nos aminoácidos essenciais metionina, lisina e triptofano (69).

Apesar do alto teor protéico do farelo de mamona, ele é usualmente utilizado como fertilizante. Esse resíduo contém componentes tóxicos, representados pela ricina e ricinina e um poderoso alergênico. A ricina é uma proteína altamente tóxica e de propriedades hemaglutinantes que pode ser inativada por ação de calor úmido. A ricinina é um alcalóide que exerce um efeito repressor no crescimento de aves, quando administrada em grandes quantidades. O alergênico é uma proteína estável ao calor que causa severas reações alérgicas em homens e animais. Nenhuma das propriedades tóxicas e alergênicas do farelo de mamona permanecem no óleo (94).

## 2.2. RICINA: PREPARAÇÕES, PURIFICAÇÕES, ESTRUTURA E PROPRIEDADES

As hemaglutininas são proteínas que têm a propriedade de aglutinar as células vermelhas do sangue. Além disso, como os anticorpos, elas mostram uma especificidade marcante atuando, em alta diluição, somente sobre uma espécie de eritrócito e não sobre todos ou mais fracamente sobre algum outro. Cada hemaglutinina específica é portanto claramente diferente de todas as outras e pode ser estudada individualmente; os resultados obtidos com uma espécie não podem ser aplicados à outra sem verificação (60).

As hemaglutininas têm sido encontradas em um grande número de plantas e em diferentes órgãos ou partes da planta. Por causa da especificidade de sua ação sobre as células vermelhas do sangue de diferentes animais, Boyd e Shapleigh (13) propuseram o termo lectinas, da palavra latina legere (escolher, preferir), um termo que é hoje usado alternadamente com fitohemaglutininas ou simplesmente aglutininas.

Desde o século XIX, é sabido que as sementes de certas plantas eram altamente tóxicas a homens e animais. Em 1886-1887, Dixson obtve um concentrado altamente tóxico do extrato de mamona. Sillmark entretanto, parece ter sido o primeiro a observar que uma fração protéica da mamona, a qual ele chamou "RICINA",

era capaz de aglutinar as células vermelhas do sangue (80).

Em 1905, a ricina era purificada pela primeira vez por Osborne et alii (115), a partir do farelo de mamona tratado com solução de NaCl 10%. O extrato foi dialisado e filtrado. O filtrado foi, então, fracionado repetidamente com sulfato de amônio produzindo um precipitado que revelou alta toxidez e forte atividade hemaglutinante. A análise elementar dessa preparação revelou: C = 52,01%; H = 7,02%; O = 23,12%; N = 16,56% e S = 1,09%. A preparação coagulou e perdeu completamente sua atividade quando submetida à ação do calor. O composto foi identificado como sendo uma proteína de alto peso molecular. A ricina, assim obtida, compreendeu cerca de 1,5% do farelo.

Em 1947, Kabat et alii (65) extraíram a ricina da torta de mamona com água a pH 3,8. A proteína foi precipitada do extrato por saturação com cloreto de sódio, redissolvida em água e reprecipitada a pH 8,0 por saturação com sulfato de amônio. Seu peso molecular estava entre 77.000 e 85.000 e foi chamada "Ricina B1". Esta preparação mostrou ser altamente tóxica e hemaglutinante.

A ricina foi obtida pela primeira vez na forma cristalina, em 1948, por Kunitz e McDonald (72). Estes autores isolaram a "RICINA CRISTALINA" de uma suspensão aquosa de farelo de mamona por saturação com sulfato de sódio. Depois de várias semanas a 5 °C foram produzidos cristais brutos. Um produto homogêneo foi

obtido após 3 ou 4 recristalizações. A toxidez da ricina cristalina foi superior a da "ricina B1", enquanto que sua atividade hemaglutinante foi cerca de 1/10 daquela.

Le Breton e Moulé (77, 78, 97 e 98) relataram a preparação de uma ricina amorfa, chamada de "RICINA Tb" que possuía a mesma toxidez da ricina cristalina. A ricina Tb foi obtida pela extração de farelo de mamona com solução salina a 10%. O extrato dialisado e filtrado, foi fracionado com sulfato de amônio e a proteína assim precipitada teve o seu máximo de atividade tóxica e hemaglutinante na faixa de 33 a 50% de concentração. Apesar de sua forma amorfa, a ricina Tb foi homogênea ultracentrifugamente, mas a preparação era separável em 2 componentes, A e B, por eletroforese. Ambos componentes mostraram o mesmo grau e razão de atividade tóxica, hemaglutinante e proteolítica. A dependência à temperatura dessas atividades foi a mesma em cada caso.

Holasek et alii (55) purificaram a ricina por precipitação fracionada com sulfato de amônio e discutiram a homogeneidade da preparação obtida à luz dos resultados de eletroforese e das medições de rotação ótica. A composição de aminoácidos e os aminoácidos N-terminais foram também analisados.

Schöne (127) e Mourgue et alii (100) purificaram ricina pelo mesmo método. Os componentes das preparações resultantes foram examinados por eletroforese, mas a ação tóxica não foi investigada.

As preparações obtidas antes de 1960, em geral, não eram fisiologicamente homogêneas, e mostraram atividades hemaglutinante e proteolítica junto com a atividade tóxica. Em particular, muitas preparações, incluindo as amostras cristalinas, mostraram atividade hemaglutinante muito pronunciada, levando à conclusão que essas eram propriedades intrínsecas da ricina relacionadas ao mecanismo da toxidez. Subsequentemente, a sugestão de que a atividade hemaglutinante é uma propriedade inerente à ricina foi questionada com base na diferença de comportamento diante de certos agentes químicos. Por exemplo, a atividade hemaglutinante é perdida mais rapidamente que a toxidez numa hidrólise parcial com enzimas proteolíticas (27), mas não é afetada pela iodação que inativa completamente a toxidez (18). Porém, em outra preparação, presumiu-se que a atividade proteolítica era a causa da toxidez (98).

Essas hipóteses foram derrubadas mais recentemente pelas preparações altamente purificadas conhecidas como ricina C1 e D, que são altamente tóxicas mas não exibem nenhuma atividade hemaglutinante e nenhuma atividade proteolítica. A confusão primitiva com respeito à identidade dos componentes tóxicos e hemaglutinantes nos extratos da mamona foram resolvidas por Funatsu e seu grupo (39). Eles foram os primeiros a separar um componente tóxico não aglutinante (ricina D) e uma aglutinina não tóxica (hemaglutinina da mamona).

Ao tentarem resolver o problema da não homogeneidade da

ricina cristalina e da ricina Tb, Funatsu e Funatsu (40 e 30) obtiveram 2 frações, C1 e C2, na proporção de 85 : 12, da ricina cristalina e 3 frações, TBI, TBII e TBIII, na proporção de 34 : 38 : 25 respectivamente, a partir da ricina amorfa, por separação em eletroforese de papel contínua e fracionamento por cromatografia em hidroxilapatite. As propriedades fisiológicas das citadas frações estão indicadas na Tabela 2.

Os componentes C1 e TBI tiveram idêntico comportamento cromatográfico. Estas preparações possuíam alta toxidez sem atividade proteolítica, sendo que a atividade hemaglutinante foi muito fraca para a fração TBI e inexistente para a fração C1. As propriedades fisiológicas e a composição de aminoácidos da ricina C1 estão nas tabelas 3 e 4, respectivamente.



Tabela 2 - Propriedades fisiológicas das proteínas contidas na ricina Tb e na ricina cristalina (39).

ATIVIDADE	Ricina Tb			Ricina cristalina	
	TBI	TBII	TBIII	C1	C2
TÓXICA, U.T. g N (a)	0,3	0,3	-	0,3	3
PROTEOLÍTICA	-	+	+	-	-
HEMAGLUTINANTE, g N (b)	5	5	0,1	18	0,25

(a) U.T. (Unidade de Toxidez): quantidade mínima de nitrogênio protéico necessário para matar um camundongo de 20 g em 24h.

(b) Quantidade mínima de nitrogênio protéico com evidência definitiva de hemaglutinação de 0,2 ml de uma suspensão de eritrócitos 4% lavados.

Tabela 3 - Propriedades físicas e fisiológicas da Ricina C1 (39).

---

PROPRIEDADES	RICINA C1
Constante de Sedimentação	4,04 S
Peso Molecular	31.000 (a)
Absorção UV: Máximo, nm	279 (a pH 6,0)
Mínimo, nm	250
Atividade Proteolítica	-
Atividade Hemaglutinante	-
Toxidez: U.T. g N (b)	0,3
DLM <sub>48</sub> g N/g (c)	0,015

---

(a) Estimado pelo método de dispersão de luz.

(b) U.T. Unidade de Toxidez.

(c) DLM<sub>48</sub> - Dose letal mínima de proteína injetada intraperitonealmente necessária para matar pelo menos a metade dos animais testados em um período de 48 horas.

Tabela 4 - Composição de aminoácidos da Ricina C1 (39).

AMINOÁCIDO	CONTEÚDO DE AMINOÁCIDO DA RICINA C1 (%)
Glicina	2,05
Alanina	5,45
Valina	4,16
Leucina	8,93
Isoleucina	6,65
Prolina	5,20
Fenilalanina	4,50
Ácido Aspártico	12,14
Ácido Glutâmico	12,72
Arginina	7,14
Histidina	3,28
Lisina	3,09
Serina	8,05
Treonina	6,46
Tirosina	4,56
Triptofano	3,57
Cistina	2,50
Metionina	2,44
Amônia Amídica	3,22
<b>TOTAL</b>	<b>106,11</b>

O componente TBII apresenta toxidez e alta atividade proteolítica, possuindo o mesmo grau de toxidez da ricina C1, embora esta não possua atividade proteolítica.

A fração TBIII possui alto potencial hemaglutinante e considerável atividade proteolítica sem toxidez. Esta última fração foi resolvida em 2 novos componentes por cromatografia de coluna com DEAE-celulose. Um desses componentes era uma protease e o outro uma hemaglutinina (133). O componente C2 também mostrou alta atividade hemaglutinante, toxidez muito baixa e nenhuma atividade proteolítica. A purificação dessa fração por DEAE-celulose seguida de cromatografia em CM-celulose resultou na preparação de uma hemaglutinina que mostrou ser homogênea quando submetida à eletroforese e ultracentrifugação. O material foi completamente distinto da ricina cristalina (134).

Quando a ricina C1 foi purificada da ricina cristalina, sua toxidez não aumentou. Mais tarde, descobriu-se que um componente minoritário era separável da ricina C1 por cromatografia em CM-celulose. Os esforços efetuados no sentido de melhorar o procedimento de purificação, resultou no isolamento de uma preparação cristalina, conhecida como RICINA D, cuja toxidez foi 10 vezes maior que a da ricina C1 (39).

A separação da toxina da aglutinina foi também descrita por Waldschmidt-Leitz e Keller (142 e 143); o peso molecular da toxina foi de 46.000, enquanto que o peso molecular da aglutinina

foi 87.000.

Enquanto a ricina D foi purificada e cristalizada das sementes graúdas de mamona oriundas da Tailândia, a ricina E, descoberta primeiramente por Funatsu (29), foi extraída das sementes miúdas da mamona produzida no Japão. As sementes de mamona da Tailândia não contêm ricina E e as sementes do Japão contêm ricina D e E. Posteriormente, Mise et alii (90) isolou e purificou a ricina E, estudando suas propriedades físico-químicas.

#### 2.2.1. Ricina D

Sementes de mamona, do tipo graúdo procedentes da Tailândia, foram usadas para obter uma ricina bruta pela extração do farelo de mamona com solução aquosa de HCl a pH 3,8, seguida de precipitação com NaCl. O produto foi dissolvido em água e precipitado com sulfato de amônio a 50% de concentração. O rendimento de ricina bruta foi 4,6% por peso. Este material foi purificado por cromatografia em DEAE-celulose a pH 7,0, seguido de filtração em gel através de Sephadex G-75. A ricina eluída no primeiro pico foi precipitada por saturação com sulfato de amônio, dissolvida em água, dialisada e centrifugada. O sobrenadante foi submetido a uma segunda separação cromatográfica usando CM-celulose a pH 6,5. A primeira das 4 frações resultantes foi passada através de Sephadex G-75 e a ricina foi ainda purificada em coluna de CM-celulose a pH 7,0, obtendo-se uma ricina homogênea. A ricina foi en-

tão dialisada contra tampão fosfato 0,005 M contendo íons cúpricos  $10^{-6}$  M a pH 6,5, obtendo-se pequenos cristais. O material recristalizado mostrou ser homogêneo por eletroforese e por sedimentação em ultracentrífuga, e foi chamado "RICINA D" (39).

As propriedades físico-químicas dessa preparação são: peso molecular 60.000; constante de sedimentação 4,64 S e ponto isoelétrico, pH 5,9 (58).

A composição de aminoácidos da ricina D está na Tabela 5. O número total de resíduos de aminoácidos foi 493, tendo sido encontrado que 105 resíduos eram ácidos e 47 básicos. Como o ponto isoelétrico dessa preparação foi 5,9, um número relativamente grande de aminoácidos deve ocorrer na forma amídica. Os 12 resíduos da meia-cistina encontrados existem na forma de dissulfeto, de modo que a ricina D contém 6 ligações dissulfeto (57).

Tabela 5 - Composição de aminoácidos da Ricina D (57).

AMINOÁCIDOS	NÚMERO DE RESÍDUOS
Ácido Aspártico	59
Treonina	35
Serina	37
Ácido Glutâmico	46
Prolina	26
Glicina	36
Alanina	37
Valina	29
Isoleucina	35
Leucina	42
Tirosina	20
Fenilalanina	18
Lisina	9
Histidina	6
Arginina	32
Metionina	6
Meia-Cistina	12
Triptofano	8
Amônia Amídica	64
<b>TOTAL</b>	<b>493</b>

A ricina D é uma glicoproteína com 23 açúcares em sua molécula, contendo 5,6% de manose e cerca de 2% de glucosamina (45).

Ishiguro et alii (57) estudaram a estrutura terminal da ricina D. Os aminoácidos N - terminais desta preparação eram "alanina" e "isoleucina" determinados por dinitrofenilação. Os aminoácidos C - terminais foram analisados quantitativamente pelo método de hidrazinólise e por hidrólise catalisada por carboxipeptidase A. As dificuldades na separação desses dois componentes permitiu supor que a ricina D consistia em 2 cadeias polipeptídicas, as quais foram designadas de Ala e Ile cadeias, unidas por ligação dissulfeto. De fato, foi possível separar a ricina D em 2 cadeias diferentes através de oxidação ou redução da ligação dissulfeto (41).

Em 1971, Funatsu et alii descreveram a separação das 2 cadeias polipeptídicas por oxidação ou redução da ligação dissulfídica (43). Elas foram isoladas da ricina D, oxidadas por ácido fórmico, sendo a separação feita por cromatografia de coluna em DEAE-celulose em tampão fosfato, pH 7,0, contendo uréia 8 M. Outro procedimento foi o isolamento das duas subunidades a partir da ricina D reduzida e carboximetilada por filtração em gel sobre Sephadex G-75 seguida por cromatografia em DEAE-celulose em tampão Tris-HCl, pH 8,5. A análise de aminoácidos das 2 cadeias isoladas revelaram que elas eram moléculas distintas possuindo pesos moleculares similares ao redor de 30.000 e unidas por uma única ligação dissulfídica (31).



Algumas propriedades físicas, químicas e fisiológicas das duas subunidades isoladas, por redução e carboximetilação (cadeias S-CM Ile e S-CM Ala), da ricina D foram estudadas por Hara et alii (53). As propriedades físicas das subunidades estão sumarizadas na Tabela 6. As subunidades S-CM consistiam em 244 (cadeia S-CM Ile) e 254 (cadeia S-CM Ala) resíduos de aminoácidos.

Tabela 6 - Propriedades físicas da Ricina D e das subunidades S-CM da Ricina D (42).

	Ricina D	Cadeia S-CM-Ile	Cadeia S-CM-Ala
<b>Espectro absorção U.V.</b>			
máximo, nm	280	280	280
mínimo, nm	251	251	250
Emáx/Emín	2,32	2,09	2,38
<b>Ultracentrifugação</b>			
Constante de sedimentação	4,64S	3,45S	3,52S
Peso molecular	60.000	30.000	30.000
<b>Peso molecular pela eletrofo- rese em gel poliacrilamida</b>			
	-	30.000	30.000
<b>Eletroforese</b>			
Ponto isoelétrico	7,34	7,42	5,17

Por clivagem específica da única ligação dissulfídica intermolecular da ricina D, as 2 cadeias polipeptídicas mostraram valores de rotação óptica similares, indicando que nenhuma alteração significativa tinha ocorrido na conformação das cadeias polipeptídicas, mas a toxidez diminuiu consideravelmente (41 e 42).

A toxidez relativa da ricina D, das cadeias S-CM Ile e S-CM Ala foi estimada como sendo 100, 1,5 e 0,3, respectivamente. Foi também descoberto que as subunidades separadas podiam ser facilmente digeridas pela tripsina apesar da ricina D não ser facilmente atacada por esta enzima proteolítica. Estas observações, decréscimo na toxidez e aumento na susceptibilidade através da clivagem pela tripsina da única ligação dissulfídica intermolecular, indicaram que a toxidez da ricina D pode ser atribuída à estrutura quaternária da molécula da ricina (53).

A composição de aminoácidos das 2 subunidades da ricina D está na Tabela 7.

Tabela 7 - Composição de aminoácidos das cadeias S-CM Ile e S-CM Ala (53).

Resíduos de aminoácidos	Número de resíduos de aminoácidos	
	cadeia S-CM Ile	cadeia S-CM Ala
Ácido Aspártico	24	35
Treonina	16	19
Serina	17	19
Ácido Glutâmico	27	22
Prolina	14	13
Glicina	16	21
Alanina	22	18
Meia Cistina	7	4
Valina	13	15
Metionina	3	3
Isoleucina	20	17
Leucina	21	24
Tirosina	12	9
Fenilalanina	12	6
Lisina	3	7
Histidina	3	3
Arginina	18	14
Triptofano	2	6
S-CM-Cistina	1	1

Segundo Funatsu (39), a estrutura das subunidades da ricina D pode ser esquematizada pela Fig. 1.

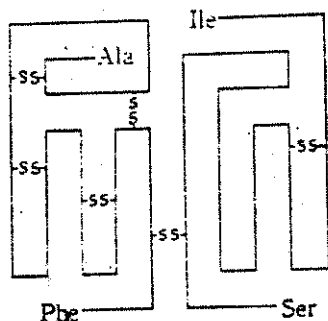


Fig. 1 - Representação esquemática da estrutura principal da ricina D.

Investigando a natureza do componente carboidrato da ricina D, Nanno et alii (102) descobriram que esta glicoproteína continha 6 moles de glucosamina e 17 moles de manose por mol de proteína. O isolamento das 2 cadeias polipeptídicas constituintes, a cadeia da alanina e a cadeia da isoleucina, e as subsequentes digestões proteolíticas com Nagarase e Pronase revelaram 2 glicopeptídeos ( $Asp_1 Thr_1, Gly_1, glucosamina_2, manose_6$  e  $Asp_1 Thr_1, Glu_1, Pro_1, glucosamina_2, manose_7$ ) da cadeia da Ala e um ( $Asp_1, Ile_1, Phe_1, glucosamina_2, manose_4$ ) da cadeia da Ile. Assim os carboidratos são ligados covalentemente às cadeias polipeptídicas em 3 sítios para formar a glicoproteína.

A determinação da sequência de aminoácidos dos 3 glicopeptídeos obtidos da digestão proteolítica da ricina D revelou que o sítio de ligação do carboidrato é no resíduo de aspartato (asparagina em todos os 3 peptídeos). As estruturas estabelecidas são as seguintes: (1) cadeia da Ala: Asx-Asx-(glucosamina<sub>2</sub> manose<sub>6</sub>) Gly-Thr, onde o Asx é o aspartato ou asparagina; (2) Asx (glucosamina<sub>2</sub> manose<sub>7</sub>)Asx-Thr-Glu-Pro; (3) cadeia da Ile: Ile-Asx (glucosamina<sub>2</sub> manose<sub>4</sub>) Phe (103).

Com respeito à estrutura primária da ricina D, Funatsu et alii (37) e Kimura et alii (68) descreveram o isolamento de 20 peptídeos tripticos da cadeia da isoleucina e a sequência de 9 desses peptídeos.

Funatsu et alii (38) isolaram e alinharam os fragmentos de brometo de cianogênio das 2 cadeias polipeptídicas da ricina D.

A sequência completa de aminoácidos da cadeia da isoleucina, consistindo de 265 resíduos está na Fig. 2 (147). O peso molecular calculado da análise na sequência foi 30.625 (incluindo os 6 resíduos de carboidrato ligados à cadeia polipeptídica). A predição da estrutura secundária da proteína indicou 6 regiões  $\alpha$ -helicoidais, ocorrendo para 23% dos resíduos de aminoácidos. Além disso, detectou-se 9 regiões de folha pregueada na molécula, ocorrendo para 33% dos resíduos na cadeia polipeptídica da isoleucina.

Em relação à estrutura primária da cadeia Ala da ricina D, Funatsu et alii (32) descreveram a sequência completa de aminoácidos, como mostra a Figura 3.

<sup>1</sup>Ile-Phe-Pro-Lys-Gln-Tyr-Pro-Ile-Ile-Asn-Phe-Thr-Thr-Ala-Gly-Ala-<sup>CHO</sup>  
<sup>20</sup>Thr-Val-Gln-Ser-Tyr-Thr-Asn-Phe-Ile-Arg-Ala-Val-Arg-Gly-Arg-Leu-  
<sup>40</sup>Thr-Thr-Gly-Ala-Asp-Val-Arg-His-Glu-Ile-Pro-Val-Leu-Pro-Asn-Arg-  
<sup>60</sup>Val-Gly-Leu-Pro-Ile-Asn-Gln-Arg-Phe-Ile-Leu-Val-Glu-Leu-Gln-Asn-  
<sup>80</sup>His-Ala-Glu-Leu-Ser-Val-Thr-Leu-Ala-Leu-Ser-Val-Thr-Asn-Ala-Tyr-  
<sup>100</sup>Val-Val-Gly-Tyr-Arg-Ala-Gly-Asn-Ser-Ala-Tyr-Phe-Phe-His-Iro-Asp-  
<sup>120</sup>Asn-Gln-Glu-Asp-Ala-Glu-Ala-Ile-Thr-His-Leu-Phe-Thr-Asp-Val-Gln-  
<sup>140</sup>Asn-Arg-Tyr-Thr-Phe-Ala-Phe-Gly-Gly-Asn-Tyr-asp-arg-Leu-Glu-Gln-  
<sup>160</sup>Leu-Ala-Gly-Asn-Leu-Arg-Glu-Asn-Ile-Glu-Leu-Gly-Asn-Gly-Pro-Leu-  
<sup>180</sup>Glu-Glu-Ala-Ile-Ser-Ala-Leu-Tyr-Tyr-Tyr-Ser-Thr-Gly-Gly-Thr-Gln-  
<sup>200</sup>Leu-Pro-Thr-Leu-Ala-Arg-Ser-Phe-Ile-Ile-Cys-Ile-Gln-Met-Ile-Ser-  
<sup>220</sup>Glu-Ala-Ala-Arg-Phe-Gln-Tyr-Ile-Glu-Gly-Glu-Met-Arg-Thr-Arg-Ile-  
<sup>240</sup>Arg-Tyr-Asn-Arg-Arg-Ser-Ala-Pro-Asp-Pro-Ser-Val-Ile-Thr-Leu-Glu-  
<sup>260</sup>Asn-Ser-Tyr-Gly-Arg-Leu-Ser-Thr-Ala-Ile-Gln-Glu-Ser-Asn-Gln-Gly-  
<sup>265</sup>Ala-Phe-Ala-Ser-Pro-Ile-Gln-Leu-Gln-Arg-Asp-Gly-Ser-Lys-Phe-Ser-  
<sup>260</sup>Val-Tyr-Asp-Val-Ser-Ile-Leu-Leu-Pro-Ile-Ile-Ala-Met-Val-Tyr-Arg-  
<sup>265</sup>Cys-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Ser-Gln-Phe

Fig. 2 - Sequência completa de aminoácidos da cadeia Ile da ricina D (147).

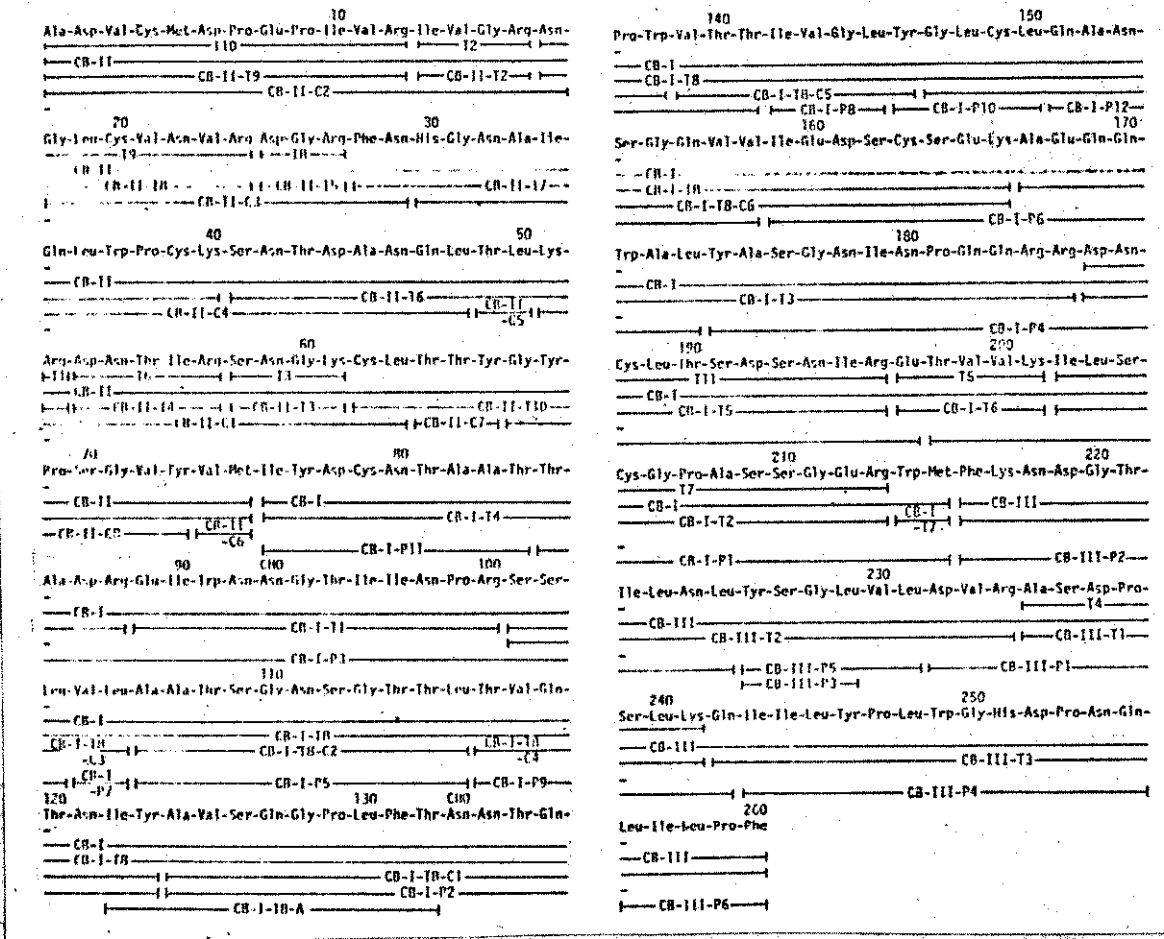


Fig. 3 - Estrutura primária da cadeia Ala da Ricina D (32).

O peso molecular calculado da análise da sequência é 31.432 (incluindo a glucosamina<sub>4</sub> e manose<sub>13</sub>). Os 22 resíduos de aminoácidos básicos e os 21 ácidos estão distribuídos em ambas as regiões N- e C- terminais, não havendo resíduos com carga na região central. Muitas sequências contínuas de aminoácidos hidrofóbicos ocorrem na cadeia; a região C- terminal é uma típica região



rica em aminoácidos hidrofóbicos como a leucina e a isoleucina (32).

A estrutura secundária, prevista a partir da sequência de aminoácidos, indica que a cadeia da Ala possui 4 regiões helicoidais (27 resíduos de aminoácidos, 10,4% do total de resíduos), 12 regiões de folha (82 resíduos, 32,3%) e 31 dobras (32).

### 2.2.2. Ricina E

De acordo com Mise et alii (90) a ricina E, isolada do farelo de mamona e purificada por cromatografia de coluna em DEAE-celulose e CM-celulose (56), mostrou ser uma glicoproteína com 2 aminoácidos N-terminais, Ile e Ala, idênticos à ricina D. O peso molecular da ricina foi estimado ser 64.000 e seu coeficiente de sedimentação 4,45 S. O ponto isoelétrico da ricina E foi maior que o da ricina D, tendo sido estimado em 8,8. Sua toxicidade, em camundongos, foi igual à da ricina D.

As duas cadeias polipeptídicas (cadeias Ala e Ile) da ricina E foram separadas e a cadeia Ala foi purificada e cristalizada. Das análises de pontos isoelétricos, composições de aminoácidos e peptídeos trípticos, revelou-se que a cadeia Ile era comum à ricina D e E enquanto que a cadeia Ala da ricina E era uma proteína homóloga, tendo vários aminoácidos substituídos em relação à ricina D (33).

### 2.2.3. Hemaglutinina da mamona

As atividades tóxica e hemaglutinante da mamona são propriedades de 2 proteínas diferentes, que possuem estruturas similares. Apesar de, no passado, terem sido referenciadas com uma variedade de nomes diferentes, atualmente a proteína tóxica é chamada pelo nome clássico de "RICINA" e a proteína aglutinante por "aglutinina da mamona" (81).

Já que ambas as proteínas têm afinidade por resíduos de galactose, mas diferem no peso molecular, vários trabalhos (51, 112, 133 e 134) têm se sucedido para separar a toxina da aglutinina por cromatografia de coluna e filtração em gel.

A hemaglutinina da mamona tem sido isolada e caracterizada em vários laboratórios (51 e 104). Ela consiste em 4 cadeias polipeptídicas de tamanho semelhante e possui especificidade a se ligar a açúcar, similar à ricina. O peso molecular foi estimado em 130.000 e o seu ponto isoelétrico foi 7,8. A hemaglutinina possui os aminoácidos N-terminais (Ile e Ala) idênticos à da ricina D. Sua composição em aminoácidos é muito parecida com a da ricina D, diferindo especialmente em Thr, Glu, Pro, Ala, Ile, Tyr e Lys, enquanto a sua toxidez, para camundongos, é cerca de 1% da toxidez da ricina D (138).

A proteína foi separada em 4 frações A, B, C e D. A atividade hemaglutinante foi detectada em todas as 4 frações, mas a fração A, em maior quantidade, possuía maior atividade. Da fração A oxidada por ácido perfórmico ou reduzida por carboximetilação foram isoladas 2 cadeias polipeptídicas por cromatografia em DEAE-celulose. Das análises dos aminoácidos N-terminais, composição de aminoácidos e dos peptídeos trípticos de cada cadeia, encontrou-se que a cadeia maior com peso molecular de 34.000 e a cadeia menor com peso molecular de 31.000 são homólogas às cadeias Ala e Ile da ricina D, respectivamente (35).

### 2.3. RICINA: MECANISMO DE AÇÃO TÓXICA E EFEITOS FISIOLÓGICOS

O caráter venenoso da semente de mamona que afeta homens e animais é conhecido há longo tempo. Em 1888, Edson (23) relatou sintomas de náuseas e vômitos em 15 crianças que haviam consumido até 4 sementes de mamona. Meldrum (87) por sua vez, registrou que 2 sementes de mamona causaram a morte de um adulto. A morte de gado Ayrshire, como resultado da ingestão de sementes de mamona, cuja dose letal mínima foi de 0,5 lb de semente, foi descrita por Anderson, (05) em 1948.

A ricina foi reconhecida como pertencente a um pequeno

número de fitotoxinas, que inclui compostos altamente tóxicos como abrina, crotina, circina e rubina. Todos esses compostos são antigênicos, termolábeis e possuem propriedades hemaglutinantes.

A ricina é uma proteína muito estável e pode ser mantida por meses sem deterioração (114). Ela aglutina não apenas sangue mas também suspensões de colesterol e outras suspensões de carga negativa (52).

A ricina foi a primeira fitohemaglutinina a atrair a atenção dos pesquisadores, presumivelmente devido à sua extrema toxidez; sua DLM (dose letal mínima) é cerca de 0,001 µg/g (rato), o que a torna cerca de 1000 vezes mais tóxica do que outras lectinas de sementes (80).

A toxidez varia com a espécie de animal, sendo que os porquinhos da índia (cobaias) são os mais susceptíveis e aparentemente, as aves são mais resistentes que os mamíferos à ação tóxica da ricina (64).

Os efeitos fisiológicos da ricina se assemelham àqueles de muitas toxinas bacterianas e das toxialbuminas. A DL<sub>50</sub> (dose letal de toxina necessária para matar metade dos animais testados, num período determinado (34)), por administração intraperitoneal em ratos, é de 100 ng para ricina pura (108). Esta pequena dose leva à morte em poucos dias, enquanto doses maiores têm um efeito mais rápido. Porém, os animais nunca morrem antes de 8-10

horas após a administração intraperitoneal da toxina.

Thompson (136) sugeriu que a ricina interferia em algum processo metabólico no fígado, possivelmente no ciclo de Krebs. Waler et alii (145) refutam esta teoria constatando que a ricina não tem nenhum efeito sobre a respiração mitocondrial.

A inibição seletiva de síntese de proteínas foi mostrada primeiramente por Lin et alii (82). Experimentos "in vivo" demonstraram que a síntese de proteínas foi mais resistente à ação da ricina, quando se tratava de células normais enquanto que as células malignas eram muito mais susceptíveis à sua ação. Lutski et alii (84) também registraram a atividade anti-tumor da ricina (63% de inibição do crescimento do tumor).

Pihl et alii (119) testaram a atividade cancerostática da ricina em 19 tumores humanos, obtendo efeitos melhores do que as drogas usadas correntemente.

Quanto à ação pirogênica da ricina, Eperjessy et alii (24) mostraram que esta é capaz de causar prolongada elevação de temperatura (40 a 41 °C por 60 a 72 h).

Também tem sido encontrado que a ricina limita o desenvolvimento do embrião durante a chocagem dos ovos de galinha (04). O desenvolvimento do coração, fígado e estômago foi grandemente limitado, não acontecendo o mesmo com o baço.

Somente entre 1972 e 1974, o mecanismo de ação tóxica da ricina foi elucidado por Olsnes et alii (106, 108, 110, 112, 122) quando fizeram um estudo detalhado da estrutura da ricina, estabelecendo que ela se compõe de 2 cadeias polipeptídicas: a cadeia A e a cadeia B ou cadeias Ile e Ala, segundo Funatsu (39), que são ligadas por uma única ligação dissulfeto. Ver Figura 4.

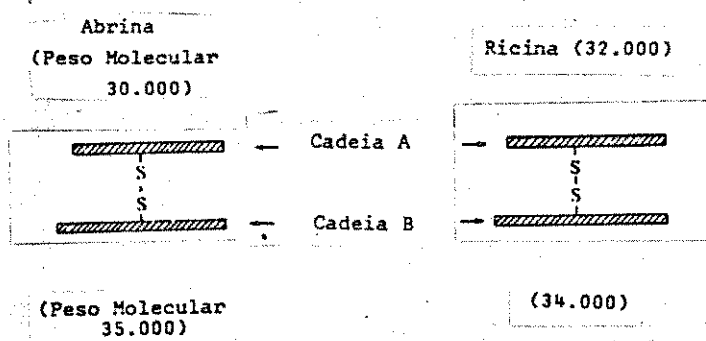


Figura 4 - Estrutura esquemática da ricina (110)

O efeito tóxico "in vivo" parece depender da estrutura intacta da toxina. As cadeias polipeptídicas isoladas têm somente 1% do efeito inibidor sobre a síntese de proteínas quando comparadas com a toxina integral. Quando essas 2 cadeias foram separadas, por redução com mercaptoetanol, a menor das duas cadeias, a cadeia A, mostrou estar associada com o efeito inibitório na síntese de proteínas, enquanto que a cadeia B foi comparativamente

inativa. A cadeia B atua na ligação das toxinas a receptores contendo galactose, na superfície da célula (109).

Assim, a cadeia B funciona como um transportador que serve para ancorar a toxina à superfície celular. Evidências de que somente a cadeia B está envolvida na ligação da toxina à galactose foi obtida em experimentos onde se aplicou as cadeias isoladas, A e B, em uma coluna de Sepharose 4B (que contém resíduos de galactose). Neste caso, a cadeia A passou através da coluna, enquanto a cadeia B foi retida e pode ser eluída com a galactose (108).

A penetração da toxina na célula parece acontecer do seguinte modo: a ligação da toxina à superfície da célula provoca um aumento da fluidez da membrana e a cadeia A (ou possivelmente a toxina toda) é transportada para dentro do citoplasma para o seu sítio de ação, os ribossomos, onde ela exerce seus efeitos tóxicos (110).

Num sistema livre de células as toxinas parecem inibir alguma etapa na elongação das cadeias peptídicas já iniciadas (15, 91 e 108). Os dados obtidos indicam que a toxina não inibe a formação da ligação peptídica. Vários autores (128, 15, 50 e 92) obtiveram evidências que a subunidade 60S do ribossomo é o sítio de ação da ricina onde ela, de algum modo, interfere com o processo de elongação da cadeia.

Tem sido sugerido que a ação da ricina possa ser de natureza enzimática (105, 92, 107 e 110) e que seu sítio específico de reação possa ser a guanosina trifosfatase (129). Que esta sugerida atividade enzimática esteja de algum modo relacionada à atividade proteolítica associada à ricina (44) é um fato que ainda necessita ser investigado.

Apesar de tanto a ricina como a aglutinina da mamona consistirem de cadeias Ala e Ile, tendo propriedades físico-químicas semelhantes, elas mostram diferenças marcantes quanto a toxidez e a atividade hemaglutinante da aglutinina da mamona. Isto se deve a estrutura tetrâmera da aglutinina, que possui 2 sítios de ligação para as células vermelhas do sangue, enquanto a cadeia B da ricina possui somente um sítio de ligação. Isto tem sido experimentalmente verificado (110, 140).

Com respeito à toxidez, tem sido demonstrado que a alta toxidez da ricina é causada pela ação cooperativa da cadeia Ile ou A, que inibe a síntese de proteínas e da cadeia Ala ou B, que liga os resíduos contendo galactose à superfície das células (108 e 34). Portanto, a toxidez extremamente baixa da aglutinina da mamona se deve à diferença funcional da cadeia Ile ou A da ricina e a cadeia mais leve da aglutinina (81 e 36), já que evidências químicas (104) e imunoquímicas (111 e 116) indicaram que a mais pesada das 2 cadeias da aglutinina (PM 34.000) é provavelmente idêntica à cadeia B da ricina, enquanto a mais leve (PM 31.000) é homóloga, mas não idêntica à cadeia A da ricina. Ver figura 5.



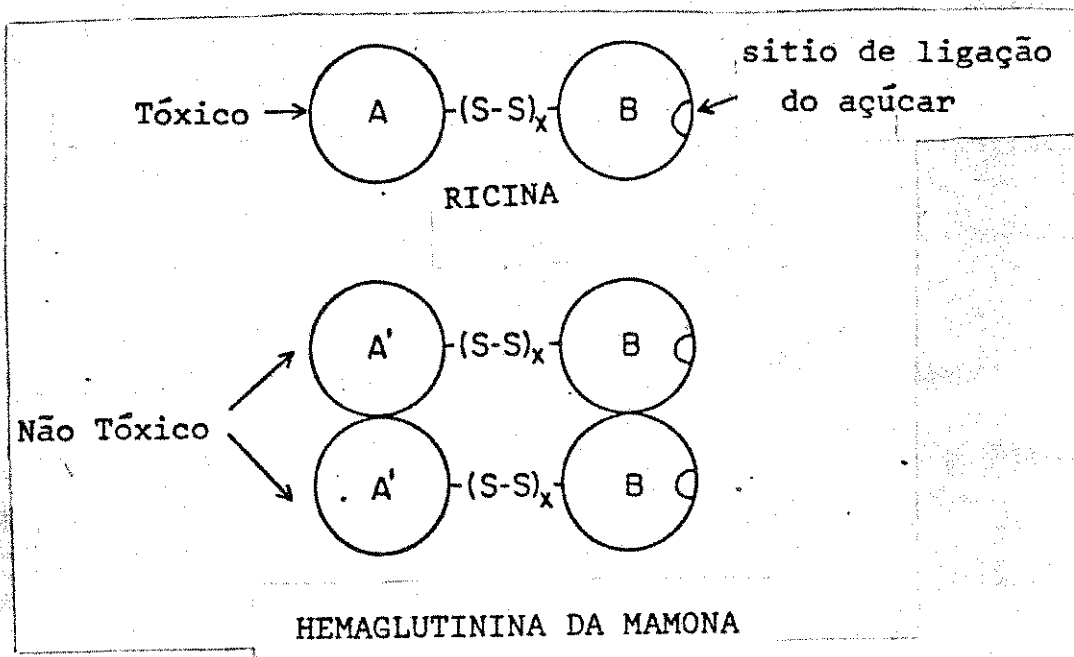


Figura 5 - Estrutura esquemática da ricina e da aglutinina da mamona (81).

## 2.4. MÉTODOS DE DESTOXIFICAÇÃO

Um dos mais sérios problemas para a produção em larga escala do óleo de mamona é a toxidez do seu resíduo, a torta e o farelo de mamona. Essa toxidez se deve principalmente à ação da proteína ricina, de tal modo venenosa, que o farelo não é usado senão como fertilizante. A inativação desse princípio tóxico permitiria o seu aproveitamento como suplemento protéico para a alimentação animal, já que este contém cerca de 40% de proteína bruta (117 e 07).

Vários métodos de destoxificação tem sido sugeridos, visando a completa destruição da ação tóxica da ricina que assegure o mínimo prejuízo ao valor nutricional das proteínas.

Já em 1889, Sillmark observou que a toxialbumina ricina era destruída pelo calor (59).

O efeito característico da ricina, em comum com as outras toxialbuminas, é o de aglutinar as células vermelhas do sangue dos mamíferos. Essa propriedade é perdida quando a solução de proteína é aquecida à ebulição ou por coagulação, quando aquecida a 60 ou 70 °C, enquanto que o calor seco não destrói completamente a toxidez da proteína (64).

Alguns autores têm afirmado que a dessolventização dos farelos extraídos por solvente promove a destoxificação total da ricina (80, 93 e 95), enquanto outros trabalhos têm revelado que tais farelos apresentaram, sem exceção, alta toxidez, devendo-se aplicar um tratamento mais enérgico para torná-los inócuos (69).

O cozimento à ebulição por 1-2 h foi usado por Petrosyan e Ponomarov (118). A torta assim tratada foi usada com êxito na alimentação de porcos. Nos estudos de Tang (135), a torta de mamona foi tratada a 140 °C no intervalo de 60 a 90 minutos. A torta tratada nessas condições foi usada na alimentação de ovelhas, sem que se observasse o aparecimento de efeitos tóxicos.

Rudolph (125 e 126) obteve duas patentes para o tratamento da torta com água quente e clorofórmio.

Em 1949, Borchers (12) registrou que repetidas extrações com etanol 95% a quente foram necessárias para a completa destoxificação do farelo.

Ambekar e Dole (03) obtiveram resultados indicando que a extração com solventes como  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{C}_6\text{H}_6$ , ou  $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$  não removiam a ricina mas que a extração com água produzia um farelo não tóxico comprovado em teste de alimentação de ratos. Nesse mesmo trabalho, os autores afirmaram que a extração com álcool, a autoclavagem, a vaporização e a ebulição com água produziam um farelo

destoxificado, o qual podia substituir o farelo de amendoim em até 50% na dieta de ratos recém-desmamados sem causar mudanças significantes no ganho de peso.

Segundo Charmichael (16), a ricina pode ser destoxificada por tratamento com permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio e halogenos. Delga (22) também comprovou a ação destoxificante do  $KMnO_4$  diluído e solução de Iodo diluído, revelando que o  $NaOCl$  diluído não causa nenhum efeito na destoxificação da ricina.

Na Bélgica, Massart e Massart (86) propuseram um método que consistia primeiramente na eliminação da ricina, por extração da torta com uma mistura de halogenetos e hidróxidos alcalinos, seguida de tratamento em autoclave.

O uso de raios ultravioleta para a destoxificação do farelo de mamona, tem sido advogado por Balint (09 e 10). Segundo o autor, a irradiação pode produzir completa destruição da proteína ricina ou somente desemparelhar as 2 cadeias da molécula, o que acarretaria significativo decréscimo na toxidez.

Vários trabalhos relatam a destoxificação do farelo de mamona por métodos microbianos. Gastani e Pistorio (48) concluíram que a ricina perde as suas propriedades tóxicas quando digerida pela pepsina e pela tripsina pancreática por 96 h a 37 °C.

A pH 6, 1 mg de papaína purificada, ativada por H<sub>2</sub>S, des-  
toxifica 5 doses letais de ricina em poucos minutos. A ação da  
papaína, segundo Velluz (141) deve ser outra que não a proteolít-  
tica já que a tripsina e a pepsina não têm o mesmo efeito.

Segundo Le Breton e Gregory (75), a torta de mamona ser-  
viria para consumo humano ou animal se fosse tratada com enzimas  
proteolíticas, ou com lêvedo autolisado, ou então com acetobacter  
autolisada.

Outro estudo, realizado em 1947, mostrou que a ricina  
tratada com papaína, pepsina, triptase e polipeptidase pancreáti-  
ca, registrava uma redução na sua toxidez (76).

Um método de destoxificação da ricina e redução do con-  
teúdo alergênico da torta de mamona usou *Clostridium*, obtido da  
água de esgoto, para fermentação e auto-digestão. A massa digeri-  
da foi então autoclavada por 1 h (a 100-120 °C a 1 atm) e seca. O  
produto final continha cerca de 32% de proteínas semi-digeridas e  
não tóxicas (21).

A vaporização e a autoclavagem têm sido testadas por  
muitos pesquisadores. Uma patente requerida em 1950, propunha que  
as sementes de mamona fossem tratadas com vapor a 150 lb/pol<sup>2</sup> por  
90 segundos ou a 300 lb/pol<sup>2</sup> por 20 segundos, seguido de descom-  
pressão abrupta, o que ocasionaria a explosão das cascas e fo-  
lhas, sendo que as amêndoas e cascas estariam destoxificadas

(17).

Jaki (61) tratou a torta de mamona com vapor e removeu o excesso de umidade sob vácuo.

Kodras et alii (69) apontaram vários tipos de tratamentos térmicos como capazes de promoverem a destoxificação do farelo de mamona: a) vaporização por 30 min; b) incubação do farelo na presença de ácido ou álcali brando seguido por neutralização ou oxidação branda com peróxido de hidrogênio; c) autoclavagem seca a 125 °C por 15 min. Os autores chegaram à conclusão que o tratamento que promoveu a destruição completa da ricina com mudanças mínimas nas características físicas da torta foi a autoclavagem sem adição de água por 15 min a 125 °C.

O vapor quente, como usado na recuperação de solventes empregados na extração do óleo de mamona, produziu uma redução de 1/1000 na toxidez original, resultando num farelo inofensivo a carneiros, coelhos e ratos, quando usada na proporção não maior que 10% (19).

Jenkins (63) usou 1 hora de autoclavagem a 15 lb/pol<sup>2</sup> ; obtendo uma redução de 1/2000 da toxidez original. Ratos que se alimentaram de uma dieta contendo 23,2% dessa torta, mantiveram-se saudáveis ao fim de 4 semanas, mas o crescimento e a conversão alimentar foram menores que nos controles.

Em 1960, Gardner et alii (47) fizeram um extenso traba-

lho, sobre a destoxificação e desalergenização do farelo de mamona, usando diversos tipos de tratamentos durante o acondicionamento das sementes antes da extração do óleo por solventes, ou após a extração. Os tratamentos mais efetivos foram os seguintes: a) calor seco a 205°C; b) cocção úmida com 0,9% de HCl e 3% de HCHO; c) cocção úmida com 2% de NaOH e 10% de formaldeído; d) cocção úmida com 2% de NaOH à pressão de 20 psig; e) cocção úmida com 1% de NaOH. Para que somente ocorresse a completa destoxificação da ricina, bastaria uma branda cocção úmida do farelo, com ou sem adição de álcali.

O hidróxido de cálcio também tem sido usado como um aditivo antes do aquecimento até a completa destruição da ricina e do alergênico (132).

Resíduos de sementes de mamona foram destoxificados por autoclavagem a 125 °C por 5 min a 2 Kg/cm<sup>2</sup> de pressão, na presença de excesso de água. A quantidade de albumina solúvel na água remanescente, após o tratamento térmico, pode ser determinada turbidimetricamente e foi aproximadamente proporcional à destoxificação (46).

Em publicações feitas entre 1968 e 1972, Motolla et alii (93, 95 e 96) apresentaram uma série de estudos feitos a nível de usina piloto, visando a destoxificação e a desalergenização do farelo de mamona. Os tratamentos propostos como os mais eficientes foram: a) tratamento com vapor a 10 psig durante 60 min de

uma mistura farelo-água 2:1; b) tratamento a 80 °C durante 45 min de uma mistura farelo-NH<sub>4</sub>OH 6 M 4:1 por volume; c) tratamento a 120 °C durante 15 min de uma mistura farelo-Ca(OH)<sub>2</sub> 4% 1:2 por volume. Os autores também analisaram o efeito dos distintos tratamentos sobre os aminoácidos essenciais, encontrando que todos eles afetam em maior ou menor grau a cistina, serina, treonina, metionina e lisina.

Estudos cinéticos mostraram que o farelo de mamona aquecido a 100 °C por 32 min é destoxificado, quando o conteúdo inicial de umidade do farelo é de aproximadamente 9%. O valor alimentar da proteína é quase que totalmente mantido (70).

Não houve nenhuma diferença na composição e no conteúdo de aminoácidos dos farelos de mamona destoxificados por várias combinações de autoclavagem (30 ou 60 min) ou tratamento com HCl aquoso ou H<sub>2</sub>O. Houve um aumento do peso corporal dos frangos especialmente a 120 °C por 60 min e pelo tratamento com H<sub>2</sub>O (79).

Em 1983, Raupp (121) mostrou que a autoclavagem a 121 °C por um período entre 10 a 20 minutos foi o suficiente para inativar a toxidez do farelo de mamona preparado no laboratório. Concluiu que possíveis desalergenizações do farelo de mamona comercial seriam alcançadas na autoclavagem (com calor úmido) a 121 °C conjugada com hidróxido de sódio.

Os efeitos tóxicos, a atividade hemaglutinante e as pro-



priedades proteolíticas são todas destruídas pela combinação de calor e umidade. É de considerável importância conhecer as condições exatas de tratamento térmico que assegure completa destruição da ação tóxica, já que a aplicação prática está limitada ao tratamento térmico.

## 2.5. DETECCÃO DA ATIVIDADE TÓXICA DO FARELO DE MAMONA.

Como todas as hemaglutininas, a ricina é uma proteína associada na planta com outro material protéico, o que faz com que ela não possa ser facilmente detectada por análises químicas; ela é usualmente determinada por suas atividades biológica e bioquímica, isto é, testes de toxidez em animais e testes de hemaglutinação.

Devido à especificidade de ação da hemaglutinina, testes padrões com sangue humano ou de coelho podem falhar para detectar a atividade aglutinante de extratos ou frações protéicas, sendo portanto, muito importante, a escolha do tipo de sangue. Deve ser lembrado que um teste de aglutinação positiva não distingue necessariamente entre hemaglutinina tóxica e não tóxica. Como sabemos, a toxidez e o poder hemaglutinante da semente de mamona dependem da variedade da semente de mamona, advindo daí que o uso do teste de hemaglutinação só irá medir o nível do poder de hemaglutinação da variedade testada e não o seu grau de toxidez (59).

Os testes de hemaglutinação são feitos com extratos de sementes moídas preparadas com soluções salinas fisiológicas, usando-se solução de células vermelhas de sangue lavado. A ação aglutinante é observada por comparação visual em tubos contendo as soluções diluídas em série (67, 47 e 14).

Muitas modificações têm sido propostas para tornar o teste de hemaglutinação mais sensível e quantitativo. O uso de  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  como anticoagulante, a omissão da lavagem dos eritrócitos, a manutenção do pH 7,0 e a temperatura a  $20 \pm \text{C}$  são condições recomendadas por Rigas et alii (123).

Mais recentemente, para melhorar a precisão de tais ensaios, foram incorporadas técnicas espectrofotométricas que medem o decréscimo na turbidez de uma suspensão de células causada por sua aglutinação (66) ou por medição direta do grau de formação das células agregadas (85).

Para a ricina, o teste de hemaglutinação não é tão sensível e específico quanto o ensaio toxicológico desde que existem aparentemente fatores interferentes em rações mistas (19). O teste de hemaglutinação serve para distinguir o farelo tratado termicamente do não tratado e para detectar grosseiramente, material subtratado termicamente. Para o ensaio de toxidez residual, ele deve ser complementado por testes de toxidez em animais.

Para os testes de toxidez parenteral, os animais mais usados são os ratos e os camundongos. Experimentos de alimentação têm sido feitos com uma grande variedade de animais, mas os ratos e as galinhas são frequentemente preferidos pela facilidade de manuseio e por razões econômicas (64).

Nos testes de alimentação, o atraso no crescimento e a

mortalidade quando comparados com controles apropriados, são considerados como medidas de toxidez (60).

A ricina é tóxica quando administrada pela boca e muito mais tóxica quando administrada parenteralmente.

Quando a substância teste é aplicada (por injeção subcutânea, intraperitoneal ou intravenosa), a percentagem de animais que morrem e o tempo entre a injeção e a morte são os parâmetros usados para a estimação da toxidez. Várias doses diferentes podem ser usadas, como, por exemplo, o DLM (a), ou o DL<sub>48</sub> (b) ou o DL<sub>50</sub> (c), e devem ser expressas como  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corporal. Como a susceptibilidade pode variar consideravelmente com o peso e a idade, os animais devem ser selecionados corretamente.

#### Observação:

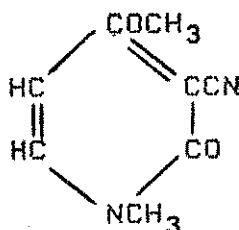
- (a) Dose Letal Mínima. Menor quantidade de toxina que mata uma cobaia de 250 g em 4 dias, injetada por via subcutânea (39).
- b) DL<sub>48</sub> - Dose letal mínima de proteína injetada intraperitonealmente, necessária para matar pelo menos a metade dos animais testados em um período de 48 horas (53).
- (c) DL<sub>50</sub> - Dose letal de toxina necessária para matar metade dos animais testados, injetada intraperitonealmente, num período determinado (34).

A única menção à tentativa de relacionar a toxidez residual com um teste químico, foi feita por Funatsu et alii (46), em

1963. O farelo foi destoxificado por aquecimento de 5 min numa autoclave a 125 °C e 2 Kg/cm<sup>2</sup> de pressão, na presença de excesso de H<sub>2</sub>O. A quantidade de albumina solúvel em água que permaneceu após o tratamento (determinada turbidimetricamente) foi aproximadamente proporcional ao grau de destoxificação.

## 2.6. RICININA

Na semente de mamona tem sido encontrado um alcalóide apresentando também atividade tóxica, denominado ricinina (11), cuja fórmula estrutural é:



Segundo consta, Tuson (137) foi o primeiro a isolar a ricinina da semente de mamona.

A ricinina é considerada um alcalóide medianamente tóxico, já que ocorre na semente em quantidade bem pequena. Waller et alii (144) encontraram 0,02% de ricinina no farelo de mamona industrial e 0,1% no farelo preparado no laboratório. Já Fuller et

alii (28) verificaram que a quantidade de ricinina presente na semente que já é pequena, diminui ainda mais durante o processamento, sendo 0,13% no farelo autoclavado. A dose letal mínima de ricinina testada por injeção intraperitoneal em camundongos e por administração oral em galinhas foi de 0,016 e 0,1 mg/g de peso corporal, respectivamente. Ela inibe o crescimento de pintinhos, quando estes são alimentados com grandes quantidades de farelo de mamona (101). Fuller et alii (28) também evidenciaram que a ricinina inibe o crescimento de pintinhos, quando doses elevadas de ricinina pura são incluídas nas suas dietas. O efeito nocivo devido à ricinina só foi evidenciado naqueles cujas rações continham níveis elevados de farelo de mamona, acima de 10%.

Um método de detecção da ricinina foi desenvolvido com base na propriedade de fluorescência desta quando excitada a 363 nm. Com base na intensidade dessa fluorescência, a ricinina pode ser quantitativamente determinada, se substâncias interferentes não estiverem presentes (28).

## 2.7. ALÉRGENO

A alergia à proteína da semente de mamona já era conhecida desde 1914 quando Alilaire (02) descreveu a alergia e atribuiu-a à albumina tóxica ricina. Ratner e Gruehl (120) mostraram

que a ricina não era responsável pela alergenicidade das proteínas da mamona, e os clássicos estudos de Spies, Coulson, Bernton e Stevens (130, 131 e 20) mostraram conclusivamente que o principal material alergênico da semente de mamona é distinto da ricina. Eles encontraram que o princípio alergênico é estável ao calor, solúvel em solução básica de acetato de chumbo, insolúvel em etanol 75% e não tóxico. Além disso, o princípio alergênico passou através de membranas de colódio, foi resistente à pepsina mas destruído pela tripsina. Estes pesquisadores designaram o material alergênico como CB-1A, uma mistura de proteínas polissacarídicas, classificadas como proteoses naturais.

Quanto à composição de aminoácidos, o CB-1A se caracterizou pelas proporções relativamente altas de arginina e cistina, e ausência de triptofano. O conteúdo de aminoácidos do CB-1A está na tabela B (130).

O alérgeno exibe uma extraordinária capacidade de sensibilizar indivíduos expostos a pequenas concentrações do pó da semente ou do farelo de mamona, sendo que a alergia é adquirida somente pela inalação (74). Os sintomas causados são coceiras nos olhos, fotofobia, vermelhidão e edema da conjuntiva, lacrimejamento abundante, fortes espirros, tosses, dispnéia, coceira e erupção da pele. São numerosos os casos registrados tanto na literatura médica, de surtos de asma brônquica em localidades próximas a indústrias de extração de óleo de mamona (88 e 26), como na literatura científica, de casos de pesquisadores impossibili-

tados de continuarem seus trabalhos, por contraírem a alergia à semente ou ao farelo de mamona (69).

Tabela 8 - Composição de aminoácidos do CB-1A (130).

Nitrogênio na forma de	CB-1A
Humina	0,1
Amônia	13,6
Cistina	5,0
Histidina	1,0
Arginina (a)	26,6
Lisina	3,2
Ácido Glutâmico	8,6
Tirosina	1,1
Triptofano	0,0
Fração mono-amínica	19,3
Fração ácido dicarboxílica	8,6
<b>TOTAL</b>	<b>87,1</b>

(a) Este valor foi obtido pelo método de ácido flaviânico de Vickers, Biochem. Z. 132: 325 (1940).



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL

##### 3.1.1. Matéria-Prima

Farelos de mamona de procedência industrial, de 4 indústrias diferentes, denominados F1, F2, F3 e F4, todos gentilmente cedidos pela Fundação Tropical de Pesquisas.

Farelos de mamona preparados no laboratório, com sementes da variedade Guarani e outras de variedade desconhecida, respectivamente, G e FL.

##### 3.1.2. Reagentes e Equipamentos

Para tratamento e análises das amostras foram utilizados equipamentos e aparelhos comuns em laboratório e reagentes em graus de pureza exigidos pelas especificações dos métodos analíticos.

### 3.1.3. Animais utilizados nos ensaios biológicos

Porquinhos da índia (cobaias) machos e fêmeas, pesando em média 250 g, com idade de 2 semanas, provenientes de criação nas proximidades de Campinas.

Os animais foram alimentados com ração comercial para animais de laboratório, ingerindo também uma mistura vitamínica na forma de xarope, diluída em água (recomendação veterinária).

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Métodos Analíticos

#### 3.2.1.1. Umidade

A umidade dos farelos de mamona foi determinada pelo método Ba 2-38 da AOCS (06).

#### 3.2.1.2. Cinzas

Foi determinada pelo método Ba 5-49 da AOCS (06).

### 3.2.1.3. óleo

Para determinar o teor de óleo foi usado o método Ae 3-52 e Bd 3-52 da AOCs (06).

### 3.2.1.4. índice de acidez do óleo de Mamona

Foi utilizado o método Aa 6-38 da AOCs (06).

### 3.2.1.5. índice de Refração do óleo de Mamona

Para a determinação do índice de refração foi usado o método Cc 7-25 da AOCs (06).

### 3.2.1.6. Atividade óptica do óleo de Mamona

A atividade óptica do óleo de mamona foi determinada segundo o procedimento adequado ao polarímetro efetuando as medidas a vários comprimentos de onda.

#### 3.2.1.7. Fibra Bruta

O teor de fibra bruta foi determinado pelo método de Van de Kamer e Van Ginkel (139).

#### 3.2.1.8. Açúcares Totais

O teor de açúcares totais foi determinado pelo método 80-60 da AACC (01).

#### 3.2.1.9. Proteína

O método utilizado foi o de Kjeldahl modificado, Ba 4-38 da AOCS (06). O fator de conversão de nitrogênio foi 6,25, recomendado para proteína de mamona (59).

#### 3.2.1.10. Proteína Solúvel

Para se medir o teor de proteína solúvel do farelo de mamona, usou-se o teste de Biureto (73).

### 3.2.1.11. Aminoácidos

As determinações de aminoácidos foram feitas no analisador de aminoácidos Beckman 119-CL.

#### a) Preparo da amostra

Um extrato aquoso de proteínas do farelo de mamona contendo aproximadamente 25 mg de proteína foi acondicionado em tubo Pirex de tampa rosqueável. Adicionou-se ácido clorídrico 6 N, eliminando-se todo o ar do tubo. A hidrólise foi realizada a  $110 \pm 1$  °C por 22 h. Após o tempo de hidrólise ter-se completado, as amostras foram esfriadas e filtradas em funil de vidro sinterizado, completando-se o volume para 100 ml com água. Desse volume, retirou-se uma alíquota de 20 ml, a qual foi evaporada. Adicionou-se água destilada e evaporou-se novamente, para se garantir a eliminação total do ácido clorídrico. O material hidrolisado seco foi dissolvido em 5 ml de tampão citrato de sódio (0,20 N; pH 2,2), de onde foram tomadas alíquotas de 100 µl para serem injetadas no analisador automático.

#### b) Mistura Padrão

Foi utilizada uma mistura de calibração da Beckman Instruments, contendo 0,5 mol/100 l dos seguintes aminoácidos: L-li-

sina, L-histidina, sulfato de amônia, L-arginina, ácido L-aspartico, L-treonina, L-serina, ácido L-glutâmico, L-prolina, glicina, L-alanina, L-valina, L-metionina, L-isoleucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina. A concentração de L-cistina foi de 0,025 mol/ 100 l.

### c) Análise Automatizada e Cálculos

Alíquotas de 100 µl de hidrolisado, previamente filtradas em membrana Millipore 0,2 µm foram injetadas no analisador automático Beckman 119-CL. A mistura de aminoácidos foi eluída com sistema de 3 tampões de citrato de sódio pH 3,25, 3,95 e 6,40, sequencialmente, em forma descontínua formando um gradiente de concentração de Na<sup>+</sup> de 0,2 até 1 N. O programa de eluição automática teve uma duração de 90 minutos. As áreas dos picos dos aminogramas foram integradas manualmente e as concentrações de cada aminoácido calculadas por comparação com um aminograma de mistura padrão obedecendo a relação:

$$\frac{C_x}{C_p} = \frac{A_x}{A_p}$$

onde C<sub>x</sub> e C<sub>p</sub> são as concentrações de um aminoácido qualquer na solução problema e na solução padrão, respectivamente, e A<sub>x</sub> e A<sub>p</sub> são as áreas sob os picos correspondentes.

### 3.2.1.12. Reação de Biureto

As proteínas solúveis do farelo de mamona foram determinadas pelo teste de Biureto. Em um tubo de ensaio, colocou-se 1 ml da amostra e adicionou-se 4 ml do reagente de Biureto, misturou-se e deixou-se reagir por 30 minutos. A leitura foi feita a 540 nm (73).

Para se construir a curva padrão, usou-se uma solução de caseína em NaOH 0,5 N. Para a preparação do branco, usou-se água no lugar da amostra.

A curva obedeceu a lei de Beer, no intervalo de 0 a 7 mg/ml, e para se calcular o teor de proteína/ml da amostra, usou-se a leitura da absorbância na seguinte equação de regressão linear:

$$\text{mg proteína} = \frac{A \pm 0,0087}{0,0920}$$

onde A é a absorbância.

### 3.2.1.13. Reação de Sakaguchi

Foi feita uma adaptação no método de Messineo (89) para a determinação de arginina nos extratos aquosos dos farelos de mamona industriais e de laboratórios, com ou sem tratamento térmico. O reagente 2,4 dicloro  $\alpha$ -naftol foi substituído pelo  $\alpha$ -naftol, também utilizado por outros autores, em reações semelhantes em virtude da ausência desse reagente no mercado e do seu alto custo de importação. Houve esmaecimento da cor produzida na reação de Sakaguchi. Resolveu-se tal problema, preparando-se o reagente de Sakaguchi (reagente B) 1 hora antes do uso.

#### a) Reagentes

Reagente A: 300 mg de KI em 100 ml de água destilada.

Reagente B1: para 100 ml de KOH 5,0 M, 2 g de tartarato de sódio e potássio.

Reagente B2: 67,7 mg de  $\alpha$ -naftol em 150 ml de álcool etílico destilado sobre lentilhas de KOH.

Reagente B: juntar 15 ml do reagente B1 + 27 ml do reagente B2 + 1 ml de NaOCl técnico. Deixar 1 h em repouso.

Reagente C: NaOCl comercial diluído 1:15, concentração essa determinada pelos procedimentos adotados por Messineo (89).

#### b) Procedimento



A partir de solução estoque de arginina, em HCl 0,01 N na concentração de 100 µg/ml, preparou-se um certo número de amostras de arginina, com diluições conhecidas. Em um tubo de ensaio, colocou-se 1 ml da amostra de solução de arginina. Acrescentou-se 1 ml do reagente A mais 3 ml do reagente B. Deixou-se 1 h em repouso, adicionando-se a seguir 1 ml do reagente C.

O branco foi preparado pela adição de todos os reagentes acima mencionados, com exceção de que em vez de 1 ml de solução da amostra foi usado 1 ml de HCl 0,01 N. Após 10 minutos à temperatura ambiente, leu-se a absorbância no espectrofotômetro a 520 nm.

A curva obedeceu à Lei de Beer, no intervalo de 0 a 40 µg. Para se calcular o teor de arginina/ml da amostra, usou-se a leitura da absorbância na seguinte equação de regressão linear:

$$\mu\text{g de arginina} = \frac{A}{0,00119} - 0,0236$$

onde A é a absorbância.

- Determinação do Teor de Arginina na amostra

A 1 Ml da amostra, diluída, se necessário, adicionou-se 1 Ml do reagente A mais 3 Ml do reagente B. Deixou-se 1 h em repouso, adicionando-se a seguir 1 Ml do reagente C. Depois de 10 minutos, leu-se a 520 nm.

Para a preparação do branco, usou-se 1 Ml de água destilada em vez de 1 Ml de amostra.

A seguir, obteve-se da equação a quantidade de arginina em  $\mu\text{g}$  multiplicando-se pelo fator de diluição, se esta foi efetuada.

### 3.2.2. Métodos Experimentais

#### 3.2.2.1. Preparo dos Farelос de Laboratório

Foram usadas sementes de mamona da variedade Guarani e outra de variedade desconhecida. As sementes foram descascadas e moídas. A extração do óleo foi feita em aparelho Soxhlet, empregando-se éter etílico purificado como solvente.

Posteriormente os resíduos de sementes já desengordura-

dos foram triturados num liquidificador, e o farelo resultante foi passado em um jogo de peneiras vibratórias. Foi usado o farelo que passou na peneira de 14 mesh e ficou retido nas peneiras 28, 48 e 100 mesh. O remanescente, nas peneiras 150 mesh e o fundo, foi descartado.

3.2.2.2. Tratamento térmico do farelo de mamona para inativação do fator tóxico.

Amostras de 2 g de farelo de mamona industrial e de laboratório foram autoclavadas a 125 °C por 10, 20, 30, 45 e 60 minutos para inativar a ricina, proteína tóxica do farelo de mamona.

3.2.2.3. Extração das proteínas solúveis do farelo de mamona

Amostras de 2 g do farelo de mamona foram misturadas com 20 ml de solução salina fisiológica (NaCl 0,85%). A agitação da mistura foi efetuada num agitador magnético por 2 h e a seguir, a suspensão foi filtrada em papel de filtro comum. O filtrado foi então usado para os testes de avaliação de toxidez.

#### 3.2.2.4. Ensaio biológico

A toxidez dos farelos de mamona foi avaliada em cobaias, injetando-se por via intraperitoneal extrato aquoso do farelo de mamona, obtido de acordo com o item 3.2.2.3. Durante o período de adaptação (3 dias) e durante o período de teste (4 dias) os animais foram alimentados com ração comercial e água à vontade misturada com um complexo vitamínico. Foram formados grupos com 4 animais cada, de acordo com o peso. Durante o ensaio, os animais permaneceram em gaiolas individuais. Interpretou-se como tóxicas aquelas amostras que mataram os animais dentro do período de 4 dias (47).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS FARELOS DE MAMONA PREPARADOS NO LABORATÓRIO E DOS FARELOS DE MAMONA INDUSTRIAIS

#### 4.1.1. Composição Centesimal

A composição centesimal dos farelos, determinado segundo os métodos descritos, é apresentada na Tabela 9 e Tabela 10.

Tabela 9 - Composição Centesimal dos Farelos de Mamona Industriais.

COMPONENTES	Farelo Industrial			
	F1	F2	F3	F4
Umidade	8,00	10,22	8,06	8,72
Cinzas	10,01	9,05	13,71	13,55
óleo	1,93	1,22	2,77	1,60
Proteína	51,56	39,44	35,59	43,30
Fibra Bruta	9,31	14,57	13,55	16,93
Carboidrato*	19,19	25,50	26,32	15,90

\* Por diferença.

Tabela 10 - Composição Centesimal dos Farelos de Laboratório

COMPONENTES	Farelo de Laboratório	
	FL	G
Umidade	8,27	10,35
Cinza	6,61	9,38
Óleo	0,74	1,92
Proteína	66,64	70,06
Fibra Bruta	2,84	1,96
Carboidrato*	14,90	6,33

\* Por diferença.

Os farelos industriais F1, F2, F3 e F4 procedem de 4 indústrias diferentes. Ao se comparar as tabelas 9 e 10, observou-se que os farelos de laboratório, apresentaram teores mais baixos de fibra bruta em relação aos farelos industriais, resultado já esperado, pelo fato dos farelos de laboratório se originarem de sementes descorticadas. Isso explica também os teores mais altos de proteína dos farelos de laboratório em relação aos farelos industriais.

## 4.2. EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE OS COMPONENTES DO FARELO

Foram feitas medidas das atividades ópticas, índice de refração e índice de acidez do óleo de mamona comercial, antes e depois dos tratamentos térmicos. Esses experimentos foram feitos em sistema modelo, usando óleo de mamona comercial, já que visavam determinar apenas se um prolongado tratamento térmico causaria mudanças acentuadas, físicas e/ou químicas no óleo de mamona residual na torta ou farelo tratados, que pudessem servir como referência de intensidade do tratamento térmico sofrido pelo material.

Além disso, determinou-se o teor de açúcares totais, proteína solúvel e aminoácidos em amostras de farelo de mamona comercial, antes e depois de submetê-las a tratamento térmico, objetivando descobrir em qual ou quais componentes do farelo, ocorreriam mudanças significativas.

### 4.2.1. Efeito do Tratamento Térmico sobre a Atividade óptica do óleo de Mamona.

O óleo de mamona é um dos óleos naturais que exibem uma atividade óptica significativa devido ao ácido ricinoléico, que ocorre em alta proporção neste óleo, cerca de 90% (08). O ácido é similar ao ácido oleico, exceto por apresentar um grupo hidroxila

ligado ao carbono 12 (12-hidroxi-9-octadecenoico) tornando este carbono assimétrico.

Mediu-se a atividade óptica do óleo de mamona antes e depois do tratamento térmico, a vários comprimentos de onda. Os resultados foram transcritos na Tabela 11.

Tabela 11 - Efeito do Tratamento Térmico sobre a Atividade óptica do óleo de Mamona

Comprimento de onda (nm)	Farelo de Mamona sem tratamento	Farelo de Mamona tratado a 125 °C/1 h
	Atividade óptica	
365	5,620°	5,310°
405	9,225°	8,875°
436	8,030°	7,750°
546	5,070°	4,915°

Foi observada uma pequena mudança nos índices de atividade óptica do óleo de mamona após tratamento térmico em relação ao óleo não tratado, indicando que a configuração da cadeia do ácido ricinoleico não foi marcadamente afetada pelo tratamento térmico sofrido. A pequena variação constatada não serve de referencial para a intensidade de tratamento térmico sofrido pela



amostra.

#### 4.2.2. Efeito do Tratamento Térmico sobre o índice de Refração do óleo de Mamona

A leitura foi feita a 21 °C com luz natural. Os resultados obtidos estão na Tabela 12.

Tabela 12 - índice de Refração do óleo de Mamona Antes e Depois do Tratamento Térmico a 125 °C/1 h.

	óleo Antes do Tratamento Térmico	óleo Depois do Tratamento Térmico
índice de Refração	1,4785	1,4785

O índice de refração de um óleo aumenta com o comprimento da cadeia e com o grau de insaturação dos ácidos graxos constituintes dos triacilgliceróis (08).

A ausência de variação do índice de refração do óleo de mamona após o tratamento, revelou que o tratamento térmico foi insuficiente para causar mudanças na estrutura química dos ácidos graxos do óleo de mamona. Portanto, o índice de refração não é um parâmetro adequado para avaliar o efeito do tratamento térmico.

#### 4.2.3. Efeito do Tratamento Térmico sobre o índice de Acidez do óleo de Mamona

Sob condições apropriadas, os triacilgliceróis são hidrolisados a ácidos graxos livres e é sabido que um dos fatores que acelera a velocidade de hidrólise é o aumento da temperatura (08). A análise do índice de acidez permite avaliar a ocorrência e a intensidade da hidrólise depois de um tratamento térmico.

O óleo de mamona foi analisado quanto ao índice de acidez, antes e depois do tratamento térmico efetuado a 125 °C/1 h. Os valores encontrados estão na Tabela 13.

Tabela 13 - índice de Acidez do óleo de Mamona Antes e Depois do Tratamento térmico a 125 °C/1 h.

	óleo de Mamona sem tratamento	óleo de Mamona tratado a 125 °C/1 h
índice de Acidez $\left( \frac{\text{mg de KOH}}{\text{g de amostra}} \right)$	1,62	1,81

O índice de acidez do óleo de mamona, após o tratamento a 125 °C/1 h, aumentou levemente, em relação ao não tratado, indicando haver ocorrido, em pequena extensão, hidrólise do óleo de mamona. Contudo, a variação foi considerada incipiente para inferir intensidade de tratamento térmico sofrido pela amostra.

#### 4.2.4. Efeito do Tratamento Térmico Sobre o Teor de Açúcares Totais do Farelo de Mamona.

As amostras do farelo de mamona foram tratadas em autoclave a 125 °C/3 h, tratamento térmico bastante prolongado, objetivando assim detectar qualquer mudança significativa no teor de açúcares totais após o tratamento. Os dados obtidos foram listados na Tabela 14.

Tabela 14 - Teor de Açúcares Totais do Farelo de Mamona Antes e Depois do Tratamento Térmico a 125 °C/3 h.

	Farelo de Mamona não tratado	Farelo de Mamona tratado a 125 °C/3 h
Açúcares Totais		
$\left( \frac{\text{mg glucose}}{10 \text{ g amostra}} \right)$	73,0	73,0

As análises efetuadas nos farelos de mamona, antes e depois do tratamento térmico, mostraram não ter ocorrido nenhuma variação do teor de açúcares totais evidenciando que a temperatura e o tempo foram insuficientes para promover degradações que se refletissem nos resultados, sendo portanto inadequado o uso de açúcar como parâmetro para avaliar o efeito do tratamento térmico.

#### 4.2.5. Efeito do Tratamento térmico Sobre o Teor de Proteína Solúvel do Farelo de Mamona.

As amostras do farelo de mamona foram autoclavadas a 125 °C/3 h e a proteína extraída segundo 3.2.2.3.. O teor de proteína solúvel foi medido nas amostras de farelo tratadas e nas amostras sem tratamento térmico, pelo método de Biureto. Os resultados estão na Tabela 15.

Tabela 15 - Proteína Solúvel do Farelo de Mamona Antes e Depois do Tratamento Térmico a 125 °C/3 h.

	Farelo de Mamona não tratado	Farelo de Mamona tratado a 125 °C/3h
Teor de Proteína Solúvel (mg/Ml)	8,84	1,83

Os resultados mostraram uma significativa redução do teor de proteína solúvel do farelo de mamona após o tratamento térmico, devido à desnaturação das proteínas termolábeis, entre as quais a ricina, responsável pela atividade tóxica do farelo de mamona. Os dados obtidos pareceram indicar ser o teor de proteína solúvel um bom parâmetro para ser correlacionado com a intensidade do tratamento térmico e com a atividade tóxica do farelo de mamona.

Tendo em vista a utilização do teor de proteína solúvel como parâmetro químico, indicativo de destoxificação térmica do farelo de mamona, mediu-se o teor de proteína solúvel dos farelos de mamona preparados no laboratório tratados a 125 °C a intervalos de tempo menores, ou seja, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos.

Os resultados da Tabela 16 e a Fig. 6 indicam uma variação significativa no teor de proteína solúvel do farelo de mamona tratado termicamente e o farelo que não sofreu nenhum tipo de tratamento, mostrando ter havido uma intensa desnaturação protéica pelo uso do calor. Já quando se compara os farelos tratados por 10, 20, 30, 45 e 60 minutos, o que se observa é uma variação muito pequena do teor de proteína solúvel, evidenciando que a quase totalidade da insolubilização das proteínas termolábeis do farelo de mamona ocorreu nos 10 minutos iniciais de tratamento térmico.

Tabela 16 - Proteína Solúvel dos Farelos de Mamona Preparados em Laboratório Antes e Depois do Tratamento Térmico a 125 °C.

	Tempo de Tratamento Térmico (min)	Teor de Proteína Solúvel (mg/Ml)
Farelo FL	0	24,9
	10	2,7
	20	2,6
	30	2,5
	45	2,4
	60	2,3
Farelo G	0	23,0
	10	3,1
	20	2,4
	30	2,3
	45	2,3
	60	2,3

Outro dado fornecido pelos resultados da Tabela 16 é que o Farelo FL e o Farelo G possuem teores de proteína solúvel diferentes. Como o Farelo FL e o Farelo G provêm de variedades diferentes de mamona, os resultados mostram que o teor de proteína

solúvel depende da variedade utilizada. Além disso, o fato do calor afetar outras proteínas termossensíveis além da ricina, faz com que o decréscimo de proteína solúvel do farelo não signifique necessariamente destoxificação do farelo de mamona.

Todas essas considerações levam a conclusão de que o teor de proteína solúvel não é um parâmetro adequado para detectar toxidez residual em farelos de mamona tratados termicamente.

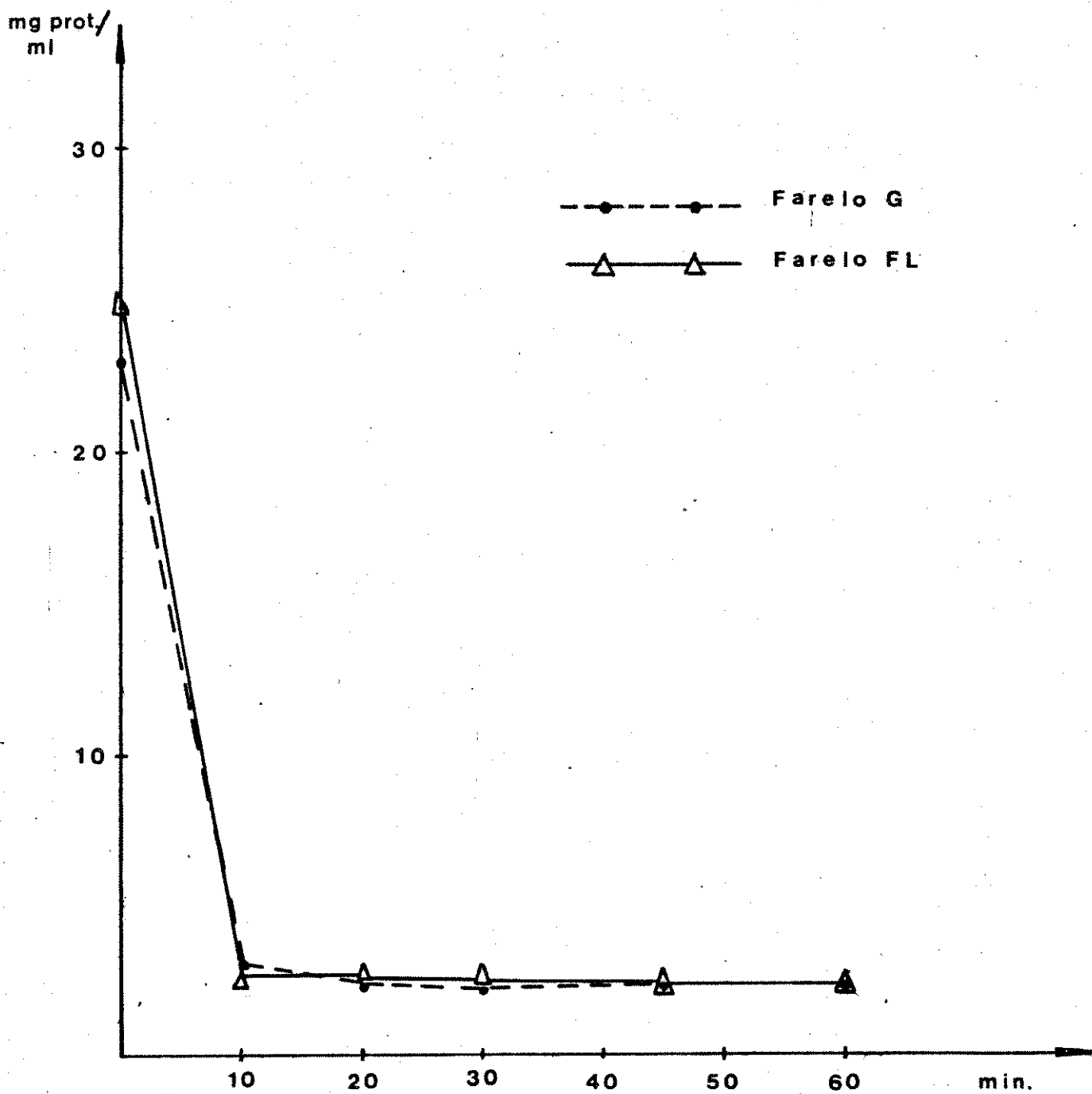


Figura 6 - Variação do Teor de Proteína Solúvel Durante o Tratamento Térmico a 125 °C no Extrato Proteico do Farelo de Mamona.



#### 4.2.6. Efeito do Tratamento Térmico Sobre os Aminoácidos do Extrato Proteico do Farelo de Mamona.

Amostras do farelo de mamona FL foram tratadas em autoclave a 125 °C por 10, 20 e 30 minutos e feita a extração da proteína solúvel como em 3.2.2.3.. As análises do teor de aminoácidos foram realizadas em analisador de aminoácidos Beckman 119-CL, como explicado em 3.2.1.11. e os resultados expressos em g de aminoácido/16 g nitrogênio, na Tabela 17.

Tabela 17 - Teor de Aminoácidos do Extrato Proteico do Farelo de Mamona Antes e Depois do Tratamento Térmico.

Farelo de Mamona Tratado a 125 °C				
	Sem Tratamen-	10	20	30
	to Térmico	min	min	min-
Ác. Aspártico	7,75	8,03	4,72	8,21
Treonina	3,13	1,47	1,82	1,69
Serina	5,81	4,40	5,86	5,95
Ác. Glutâmico	25,67	29,38	30,75	28,63
Prolina	3,15	7,80	9,68	2,62
Glicina	4,37	4,02	3,58	4,25
Alanina	4,02	2,35	3,06	2,96
1/2 Cistina	3,34	0,32	3,96	1,50
Valina	4,24	2,79	3,43	2,54
Metionina	1,54	1,03	1,09	0,97
Isoleucina	4,97	6,89	4,80	2,51
Leucina	6,73	3,67	3,51	3,49
Tirosina	3,27	2,37	2,33	2,43
Fenilalanina	3,45	1,17	1,17	1,65
Histidina	1,47	1,64	1,19	1,12
Lisina	4,04	6,15	4,62	5,99
Arginina	12,98	16,37	16,42	19,92

Os resultados indicaram que com o aumento do tempo de tratamento térmico, o teor de arginina aumentou (Figura 7). Tal resultado deve ser decorrente da desnaturação da ricina, proteína termolábil que contem cerca de 11% de arginina (72), enquanto que o CB-1A, o componente alergênico, estável ao calor, apresenta cerca de 26% de arginina em sua composição (131). Assim, é de supor que com o aumento da intensidade do tratamento térmico e a consequente desnaturação das proteínas sensíveis ao calor, a composição protéica solúvel do farelo de mamona muda para uma mistura de proteínas com um teor mais elevado de arginina, isto é, com uma composição mais rica em CB-1A, que segundo Gardner et alii (47) só é destruída por calor seco a 205 °C/125 min.

Os dados da Tabela 17 e o gráfico da Figura 7 mostram que houve um aumento significativo do teor de arginina quando o farelo foi tratado a 125 °C/10 min e que praticamente não houve mudança quando esse período de tratamento térmico foi estendido para 20 min. Já quando esse tratamento a 125 °C foi prolongado para 30 min, houve um aumento acentuado do teor de arginina. Esses resultados nos fazem supor que um tratamento térmico a 125 °C/10 min no farelo de mamona produz praticamente o mesmo efeito que a 125 °C/20 min.

Quanto aos outros aminoácidos, nenhum deles apresentou tendência de aumento significativo e constante com o aumento da intensidade do tratamento térmico a que foi submetido o farelo de mamona.

Portanto, a evolução do teor de arginina no extrato proteico do farelo de mamona pode ser um bom parâmetro químico para detectar a toxidez em farelo tratado termicamente.

por. Arg.

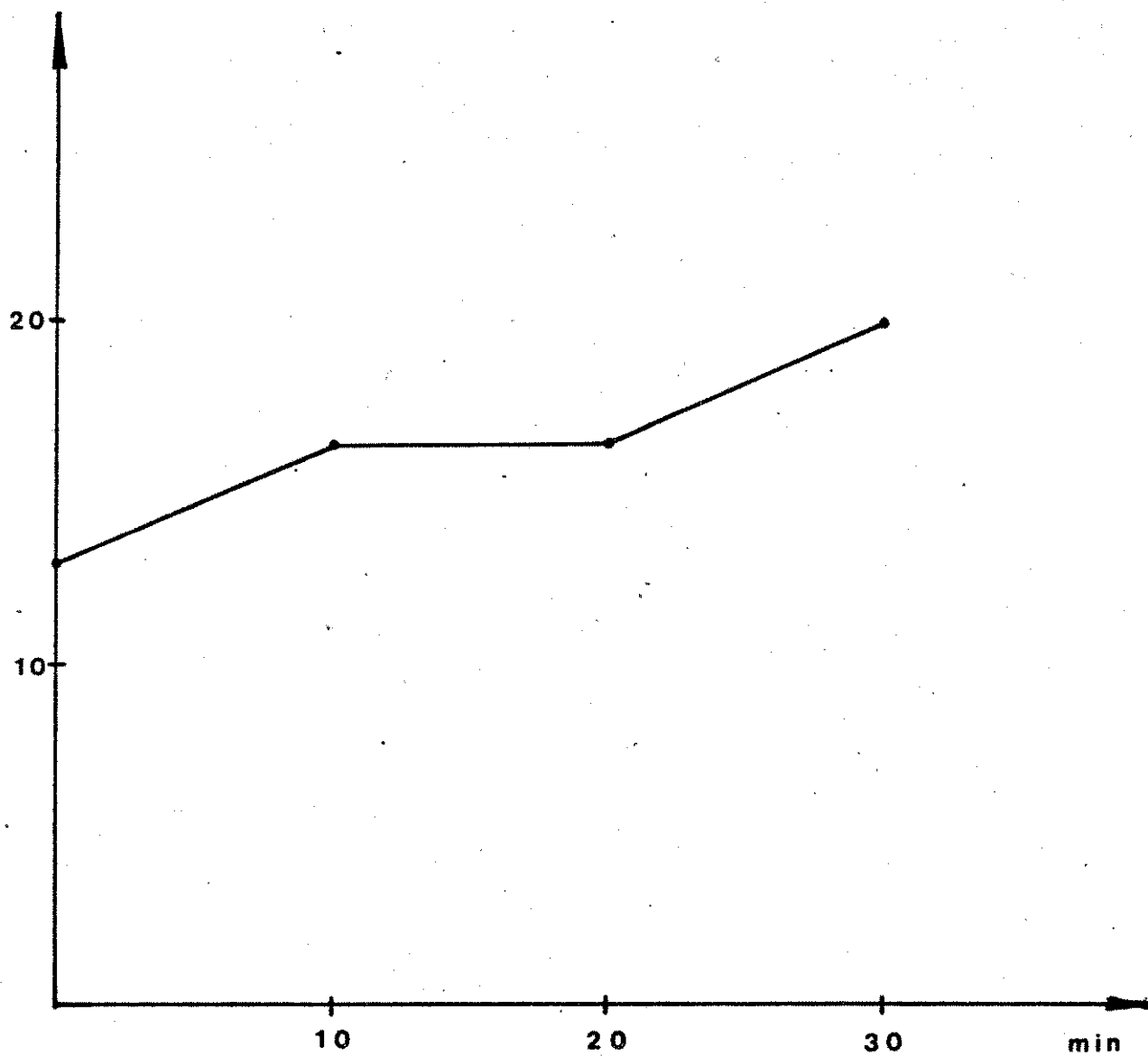


Figura 7 - Variação do Teor de Arginina Durante o Tratamento Térmico a 125 °C no Extrato Proteico do Farelo de Mamona.

#### 4.3. EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO NA TOXIDEZ DOS FARELOS

A alta toxidez do farelo de mamona é devido à ricina, uma proteína que pode ser inativada pelo calor. É de extrema importância conhecer as condições exatas de tratamento térmico suficientes para inativar a proteína tóxica, já que, apesar de existirem vários outros métodos de destoxificação, a aplicação prática se limita ao tratamento térmico. Além disso, é de grande interesse constatar se há o mesmo grau de toxidez nos farelos preparados a partir de variedades diferentes.

A toxidez dos farelos industriais e dos farelos preparados no laboratório foi avaliada por ensaios em porquinhos da Índia ou cobaias.

O experimento visou primeiramente descobrir a dose mínima de proteína extraível que matasse uma cobaia de 250 g em 4 dias, injetada intraperitonealmente, para cada extrato protéico de farelo. Foram usados 4 animais para cada teste(34). A tabela 18 mostra os resultados, para farelos de mamona que não foram submetidos a tratamento térmico, expressos em  $\mu\text{g/g}$  peso corporal.

Tabela 18 - Dose Mínima de Proteína Extraível de Farelo de Mamona sem Tratamento Térmico, injetada intraperitonealmente, suficiente para causar a morte do animal em 4 dias (DLM).

Farelo de Mamona	Dose Mínima de Proteína Extraível Injetada ( $\mu\text{g}/\text{g}$ peso corporal)	Efeito nos Animais (4 dias de observação) (c) (d)
G (a)	10,0	4 mortes / 1 dia
FL (a)	15,0	3 mortes / 1 dia e 1 morte / 2 dias
F1 (b)	10,0	4 mortes / 1 dia
F2 (b)	10,0	4 mortes / 3 dias
F3 (b)	10,0	4 mortes / 1 dia
F4 (b)	10,0	4 mortes / 1 dia

(a) Farelo de Laboratório.

(b) Farelo de Origem Comercial.

(c) Foram usados 4 animais para cada teste.

(d) Além dos 4 dias de observação válidos para o teste, os animais foram observados por mais 1 semana, mantendo-se os resultados obtidos.

É oportuno esclarecer que, na indústria, o farelo sofre primeiramente extração em "expeller", processo que implica em elevação substancial da temperatura (100 °C) e, em seguida, extração com hexana (60 °C) (62), enquanto que na preparação do farelo de laboratório, o material sofreu somente o aumento de temperatura resultante da extração com éter etílico (PE = 37 °C). Assim, era esperado que os farelos de laboratório apresentassem toxidez superior ou igual ao dos farelos industriais, já que alguns autores (80, 93 e 95) têm afirmado que a dessolventização dos farelos extraídos por solvente promove a destoxificação total da ricina, enquanto outros trabalhos (69) têm revelado que tais farelos apresentaram, sem exceção, alta toxidez. Os resultados obtidos neste experimento confirmam essa última assertiva.

Comparando-se os farelos preparados no laboratório G e FL, de variedades diferentes, notou-se que a dose letal mínima de proteína extraível do farelo FL foi maior que a do farelo G, revelando que o farelo FL possui atividade tóxica menor que a do farelo G. Tais resultados confirmam que a toxidez do farelo depende da variedade da semente de mamona utilizada para o seu preparo.

Já os farelos F1, F2, F3 e F4, apesar de sofrerem um tratamento térmico, inerente ao seu preparo, demonstraram sem exceção ainda possuir atividade tóxica residual. Tais resultados demonstram que é necessário um tratamento mais drástico que torne os farelos industriais inócuos. É interessante ressaltar que o



farelo F2 apresentou toxidez ligeiramente inferior quando comparado com os outros farelos industriais, expresso pela maior demora na morte das cobaias. Este dado é bastante interessante, quando se sabe que o farelo F2 é vendido comercialmente como atóxico, fato esse contrário aos nossos resultados que demonstram que o farelo é portador de sensível toxidez.

Todos os farelos, tanto os industriais como os de laboratório, foram autoclavados a 125 °C por tempos variados e sua toxidez avaliada por ensaios em cobaias. O objetivo foi correlacionar o tempo de tratamento térmico com a toxidez e descobrir o tempo necessário à temperatura de 125 °C, para promover a completa destoxificação do farelo de mamona. A morte das cobaias num período de 4 dias foi o parâmetro considerado para indicar a amostra como tóxica (39). Os resultados obtidos estão na Tabela 19.

Tabela 19 - Avaliação da Toxidez do Farelo de Mamona, Autoclavados a 125 °C, em cobaias, por via intraperitoneal.

Farelo de Mamona	Tempo de autoclavagem a 125 °C (min)	Dose de Proteína Extraível Injetada ( $\mu\text{g/g}$ peso corporal)	Efeito nos animais (4 dias de observação) (a)
Farelo de Laboratório	10	15	sobreviveram
Variedade	20	15	sobreviveram
Guarani	30	15	sobreviveram
Farelo de Laboratório	10	20	sobreviveram
Variedade	20	20	sobreviveram
FL	30	20	sobreviveram
Farelo Industrial	10	15	sobreviveram
	20	15	sobreviveram
F1	30	15	sobreviveram

Farelo	10	15	sobreviveram
Industrial	20	15	sobreviveram
F2	30	15	sobreviveram
		24	sobreviveram
Farelo	10	15	sobreviveram
Industrial	20	15	sobreviveram
F3	30	15	sobreviveram
Farelo	10	15	sobreviveram
Industrial	20	15	sobreviveram
F4	30	15	sobreviveram

(a) Os animais foram observados por mais uma semana, além dos 4 dias válidos para o teste. Os resultados foram mantidos.

Foram usadas doses maiores (20 g de proteína/g peso corporal) para o farelo de laboratório FL, em relação ao farelo de laboratório Guarani, por este primeiro possuir atividade tóxica menor do que o último.

De acordo com os resultados obtidos, o tratamento efetuado a 125 °C/10 min foi suficiente para inativar o fator tóxico dos farelos de mamona, sejam eles os de laboratório ou industriais.

Tabela 20 - Tratamento Térmico de Inativação do Fator Tóxico do Farelo de Mamona.

---

	Autoclavagem
Kodras (69)	125 °C/15 min
Funatsu et alii (46)	125 °C/15 min

---

Portanto, ao se comparar os resultados obtidos com os obtidos por outros autores, como mostra a Tabela 20, vê-se que ele é bastante similar ao obtido por Kodras (69) e Funatsu et alii (46).

Cabe aqui uma observação de que em nosso experimento não

foi computado o tempo necessário para o aquecimento da autoclave no tempo de tratamento térmico, bem como foi desprezado o tempo de resfriamento do equipamento, pois este dispunha de camisa de arrefecimento com água circulante, que proporcionava um rápido resfriamento do conjunto.

#### 4.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA SOLÚVEL PELO TESTE DE BIURETO

Dentre os muitos métodos usados para determinar a quantidade de proteína em alimentos, não há nenhum que seja melhor ou mais satisfatório que o outro. A escolha do método depende da natureza da proteína testada, da natureza de outros componentes presentes na amostra, da rapidez, acuracidade e sensibilidade desejada no ensaio (71).

Para se quantificar proteína em solução, os métodos colorimétricos mais frequentemente utilizados são o método de Lowry(83) e o teste de Biureto(73). O teste de Biureto trabalha com amostras na faixa de mg de proteína, tendo portanto uma sensibilidade bastante baixa, apesar de exibir alta precisão. Já o método de Lowry, cerca de 50 a 100 vezes mais sensível que o teste de Biureto, detecta  $\mu\text{g}$  de proteína, requerendo portanto espectrofotômetro mais sofisticado. Pelo tamanho da amostra utilizada em nossos experimentos, o método de Biureto é o mais adequado

pois se optássemos pelo método de Lowry, teríamos de fazer uso de diluições, o que aumentaria em muito o erro experimental. Além disso, a necessidade de um método químico simples, rápido e barato para ser utilizado na indústria, faz do teste de Biureto a opção mais conveniente pela sua alta precisão e fácil execução.

#### 4.5. DETERMINAÇÃO DE ARGININA COM O MÉTODO DE SAKAGUCHI (89) MODIFICADO

Para testar a validade de substituição do 2,4-dicloro  $\alpha$ -naftol pelo  $\alpha$ -naftol, no método de Sakaguchi adaptado, comparou-se os resultados obtidos com valores de literatura para porcentagem de arginina em caseína.

Tabela 21 - Comparação do teor de arginina em caseína pelo método de Sakaguchi(89) adaptado com valores de literatura.

	Arginina (%)	
	Literatura	Sakaguchi modificado
Caseína	4,0(59); 3,9(54 e 89)	3,9

Comparando-se o teor de arginina em caseína determinado pelo método de Sakaguchi(89) adaptado, notou-se que ele coincide perfeitamente com os valores de literatura.

#### 4.6. MÉTODO QUÍMICO PARA DETECÇÃO DE TOXIDEZ EM FARELO DE MAMONA

Como já foi dito anteriormente, dos vários métodos conhecidos de destoxificação do farelo de mamona, somente o tratamento térmico encontra aplicação prática. Como os dados obtidos anteriormente neste trabalho indicam, o tratamento térmico afetou mais significativamente o teor de proteína solúvel dentre os componentes do farelo de mamona e em particular, o teor de arginina dessas proteínas solúveis. Assim, nos pareceu que a relação teor de arginina/teor de proteína solúvel, expressa como S/10B (Sakaguchi/Biureto) ou porcentagem de arginina, seria um bom parâmetro para avaliar se o farelo de mamona, após tratamento térmico, foi ou não destoxificado.

A Tabela 22 lista esses resultados, relacionando-os com a toxidez residual do farelo e o tempo de tratamento térmico.

Tabela 22 - Avaliação por método químico da toxidez de farelos de mamona de várias origens, autoclavados a 125 °C por tempos diversos através da relação S/10B.

Amostra	Tempo de autoclavagem a 125 °C (min)	Proteína Solúvel (mg/Ml)* Biureto	Teor de Arginina (µg/Ml)* Sakaguchi	S/10B	Toxidez
Farelo de Laboratório FL (66,64% proteína Kjeldahl, N = 6,25)	0	24,9	1839	7,4	+
	10	2,7	352	13,0	-
	20	2,6	357	13,7	-
	30	2,5	377	15,1	-
	45	2,4	427	17,8	-
Farelo de Laboratório G (70,05%	60	2,3	425	18,4	-
	0	23,0	1877	8,2	+
	10	3,1	461	14,8	-
	20	2,4	415	17,3	-



proteína					
Kjeldahl,	30	2,3	454	19,7	-
N = 6,25					
	45	2,3	468	20,3	-
	60	2,3	465	20,2	-
-----					
Farelo F1	0	5,1	491	9,6	+
(51,56%					
-----					
proteína	10	2,7	369	13,7	-
Kjeldahl,					
N = 6,25)					
	30	1,9	266	14,0	-
-----					
Farelo F2	0	3,7	415	11,2	+
(39,44%					
-----					
proteína	10	2,0	266	13,3	-
Kjeldahl,					
N = 6,25)					
	30	1,7	249	14,6	-
-----					
Farelo F3	0	7,5	618	8,2	+
(43,30%					
-----					
proteína	10	2,4	312	13,0	-
Kjeldahl,					
N = 6,25)					
	30	2,0	268	13,4	-
-----					
Farelo F4	0	7,7	638	8,3	+
(35,59%					
-----					

proteína	10	2,2	295	13,4	-
Kjeldahl,					
N = 6,25	30	1,8	266	14,8	-

(\*) Média de 10 resultados.

Pelos resultados obtidos, pode-se observar que a relação Sakaguchi/Biureto, aumenta com o tempo de tratamento térmico. Para o tempo de 10 minutos, tempo de tratamento necessário para a destoxificação, os valores de Sakaguchi modificado/Biureto variaram de 13,0 a 14,8. Portanto, para os farelos analisados, pode-se inferir que valores de S/10B  $\geq$  13 indicam farelo destoxificado.

Para os farelos destoxificados, o teor de proteína solúvel ficou em torno de 2 a 3%, mesmo que o farelo tóxico tivesse cerca de 25% de proteína solúvel como nos farelos obtidos em laboratório ou cerca de 5% como nos farelos de origem industrial. Isso parece corroborar para que a autoclavagem por 10 minutos seja um tratamento térmico suficientemente intenso para desnaturar as proteínas termolábeis, inativando completamente a proteína tóxica.

## 5. CONCLUSÕES

5.1. O tratamento térmico inerente ao processamento de semente de mamona por extração industrial do óleo não é suficiente para produzir um resíduo destoxificado.

5.2. A autoclavagem a 125 °C por 10 minutos dos farelos de mamona testados, provou ser um tratamento térmico suficiente para inativar a proteína tóxica ricina.

5.3. A toxidez do farelo depende da variedade de semente de mamona utilizada no seu preparo bem como do processo de obtenção do mesmo.

5.4. O teor de arginina na proteína solúvel do farelo de mamona aumenta com a intensidade do tratamento térmico. Tal resultado parece indicar ser a estimacão do teor de arginina um bom parâmetro para avaliação da toxidez dos farelos de mamona.

5.5. Para os farelos de mamona estudados, a relação Sakaguchi/Biureto (S/10B) > 13 parece indicar que o farelo está plenamente destoxificado.

## 6. BIBLIOGRAFIA

001. AACC - Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis (10th ed., 1962).
002. ALILAIRE, E. (1914)  
"Ricin III. Hypersensibility to ricin".  
Ann. Inst. Pasteur, 28: 605.
003. AMBEKAR, V. R. and DOLE, K. K. (1957)  
"Detoxication of castor cake"  
Indian J. Dairy Sci., 10: 107-22.
004. ANCE, P. (1947) in JENKINS, F.P.(1963)  
"Allergenic and Toxic Components of Castor Bean Meal: Review of the literature and studies of the inactivation of these Components".  
J.Sci. Food Agric.14:773
005. ANDERSON, T. S. (1948) in RAO, K.H.(1970)  
"Toxic Factors and Their Detoxification in Castor"  
J. Food Sci. Tech. 7:77
006. AOCS - Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists Society. 3th. Illinois, 1979.

007. ASSIS, F. P.; NAUFEL, F.; TUNDISI, A. G. A.; ROCHA, G. L.; SIQUEIRA BRANCO, T.; BECKER, M. e CINTRA, B. (1962)  
Boletim da Indústria Animal, 20: n.5.
008. BAILEY'S INDUSTRIAL OIL AND FAT PRODUCTS  
Ed. by D. Swern - 3a. Ed.
009. BALINT, G. A. (1972)  
"Detoxification of Ricin".  
Kiserl. Orvostud 24(1): 96-100  
Chem. Abstr., 77: 44.086.
010. BALINT, G. A. (1973)  
"Detoxification of ricin"  
Toxicology, 1(3): 175-8.
011. BOLLEY, D. S. and HOLMES, R. L. (1958)  
"Inedible Oilseed Meals - Altschull, A. M. - Processed Plant Protein Foodstuffs"  
Academic Press Inc. Publishers, New York.
012. BORCHERS, R. (1949)  
"Castor bean oil meal. I. Destruction of the toxic factor"  
Poultry Sci., 28: 568-70.

013. BOYD, W. and SHAPLEIGH, E. (1954)  
"Specific precipitating activity of plants agglutinins (lectins)  
Science, 119: 419.
014. BUKHATCHENKO, S. L. (1973)  
"Determination of the toxic protein ricin in castor seeds"  
Chem. Abstr., 83:26.387.
015. CARRASCO, L.; FERNANDEZ-PUENTES, C. and VASQUES, D. (1975)  
"Effects of ricin on the ribosomal sites involved in the interaction of the elongation factors"  
Eur. J. Biochem., 54: 499-503.
016. CHARMICHAEL, E. B. (1929)  
"The influence of chemical and other agents upon toxicity and antigenic power of ricin. II. The detoxification of ricin by means of various agencies".  
Chem. Abstr., 23: 3981.
017. CHIEGO, B.  
"Detoxification and stabilization of castor bean"  
Chem. Abstr., 44: 10.214.
018. CLARK, C. L. and CLARCKE, E. G. C. (1947)  
"The action of iodine on the toxic and agglutinating factors of ricin"

Pharm. J., 158: 71,70.

019. CLEMENS, E. (1963) in JAFFÉ, W. G.

"Toxic Constituents of Plants Foodstuffs"

I. E. Liener ed., Chapt. 3, Academic Press, New York and London.

020. COULSON, E. J.; SPIES, J. R.; STEVENS, H. and SHIMP, J. H.

(1950)

"The Immunochemistry of Allergens"

J. Allergy, 21(1): 34.

021. DARZINS, E. (1960)

U.S. 2,920,963, Jan.12

Chem. Abstr., 54: 10,352.

022. DELGA, J. (1954)

"Resistance of ricin to various chemical agents"

Compt. Rend. Soc. Biol., 148: 302-4.

023. EDSON, B. (1888) in JENKINS, F.P. (1963)

"Allergenic and Toxic Components of Castor Bean Meal: Review of the literature and studies of the inactivation of these components".

J.Sci. Food Agric. 14:773

024. EPERJESSY, E. T.; BALINT, G. and THUTANSZKY, K. (1965)  
"The pyrogenic effect of ricin"  
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 33: 177.
025. FAO PRODUCTION YEARBOOK (1982)  
Index 34.
026. FIGLEY, K. D. and ELROD, R. H. (1928)  
"Endemic Asthma due to castor bean dust"  
J. Am. Med. Assoc., 90: 79.
027. FUCHS, L. and FALKENSAMMER, H. (1939)  
"The toxic and agglutination actions of ricin"  
Scientia Pharm., 10: 103-6.
028. FULLER, G.; WALKER, H. G.; MOTOLLA, A. C.; KUSMICKY, D. D.  
and KOHLER, G. O. (1971)  
"Potential for Detoxified Castor Meal"  
J. Am. Oil Chem. Soc., 48:616
029. FUNATSU, G. (1959) in MISE, T.; FUNATSU, G., ISHIGURO, M. and  
FUNATSU, M. (1977).  
"Isolation and Characterization of Ricin E from Castor  
Beans".  
Agric. Biol. Chem. 41(10):2041



030. FUNATSU, G. (1960) in UENO, S.; FUNATSU, G. and FUNATSU, M. (1977).  
"Reinvestigation of the Purification and Characterization of Castor Bean Hemagglutinin"  
Agric. Biol. Chem. 41(61): 1069
031. FUNATSU, G. and FUNATSU, M. (1977)  
"Biochemical Studies on Ricin. Part XIII. Separation of the two constituent polypeptide chains of Ricin D".  
Agr. Biol. Chem., 41(7): 1211-15.
032. FUNATSU, G.; KIMURA, M. and FUNATSU, M. (1979)  
"Biochemical studies on ricin. Part XXVI. Primary Structure of Ala Chain of ricin D".  
Agric. Biol. Chem., 43(10): 222-4.
033. FUNATSU, G.; MISE, T.; MATSUDA, H. and FUNATSU, M. (1978)  
"Biochemical studies on ricin. Part XIX. Isolation and characterization of two constituent polypeptide chains of ricin E".  
Agric. Biol. Chem., 42(4): 851.
034. FUNATSU, G.; MIYAUCHI, S. and FUNATSU, M. (1976)  
"Biochemical studies on ricin. Part X. Effect of the two constituent polypeptide chains of ricin D toward mouse sarcoma ascite tumor cells"  
Agric. Biol. Chem., 40: 639

035. FUNATSU, G.; UENO, S. and FUNATSU, M. (1977)  
"Subunit structure of castor bean hemagglutinin"  
Agr. Biol. Chem., 41: 1737.
036. FUNATSU, G.; UENO, S. and FUNATSU, M. (1977)  
"Hybridization between the heterologous chains of ricin D  
and Castor Bean Hemagglutinin"  
Agric. Biol. Chem., 41(9): 1797.
037. FUNATSU, G.; YOSHITAKE, S. and FUNATSU, M. (1977)  
"Biochemical studies on ricin. Part XVI. Isolation of tryptic peptides from the Ile chain of ricin D and sequences of some tryptic peptides including N- and O-terminal peptides"  
Agric. Biol. Chem. 41(7): 1225.
038. FUNATSU, G.; YOSHITAKE, S., IDE, M.; KIMURA, M. and FUNATSU, M. (1978)  
"Biochemical studies on ricin. Part XX. Cyanogen bromide cleavage of the two constituents polypeptide chains of ricin D"  
Agric. Biol. Chem., 42(6): 1253-60.
039. FUNATSU, M. (1972)  
"Structure and Function of Ricin, in Proteins: Structure and Function"  
Ed. by M. Funatsu, K. Hiromi, K. Imohori, T. Murachi and K. Narita

2: 103-40. New York, Wiley, 270 pp.

040. FUNATSU, M. and FUNATSU, G. (1959) in FUNATSU, M. (1977)  
"Proteins: Structure and Function"  
Ed. by M. Funatsu, K. Hiromi, K. Imori, T. Murachi and K.  
Narita, New York, Wiley, 270 pp.
041. FUNATSU, M.; FUNATSU, G., ISHIGURO, M. and HARA, K. (1971)  
"Structure and toxic function of ricin...III. Physical and  
physiological properties of subunits"  
Proc. Jap. Acad., 47(10): 786-90.
042. FUNATSU, M.; FUNATSU, G.; ISHIGURO, M. and HARA, K. (1973)  
"Properties of subunits of ricin D"  
Japan J. Med. Sci. Biol., 26(1): 30-2.
043. FUNATSU, M.; FUNATSU, G.; ISHIGURO, M.; NANNO, S. and HARA,  
K. (1971)  
"Structure and toxic function of Ricin.II. Subunit structu-  
re of ricin D"  
Proc. Jap. Acad., 47: 718.
044. FUNATSU, M.; HARA, K.; ISHIGURO, M.; FUNATSU, G. and KISHI-  
GAWA, R. (1973) in FUNATSU, G. and FUNATSU, M. (1977)  
"Separation of the Two Constituents Polypeptide Chains of  
Ricin D".

045. FUNATSU, M. and ISHIGURO, M. (1971)  
"Chemical Structures and toxicities of Ricinus proteins isolated from Ricinus communis"  
Kagaku To Seibutsu, 9(8): 490-7; Chem. Abstr. 76: 110.323 j.
046. FUNATSU, M.; MURASE, K.; MATSUOKA, M.; TAKAHASHI, T.; ISHIGURO, M.; OKAMOTO, S. and GOTO, I. (1963).  
"Investigations of evaluation of castor seed residues as cattle fodder. I. Detoxication of castor seeds residues"  
Chem. Abstr., 63: 10.584 h.
047. GARDNER, H. K.; D'AQUIN, E. L.; KOLTUM, S. P.; MC COURTNEY, E. J.; VIX, H. L. E. and GASTROCK, E. A. (1960)  
"Detoxification and Deallergenization of castor beans"  
J. Am. Oil Chem. Soc., 37(3): 142.
048. GASTANI, G. de and PISTORIO, R. (1929)  
"Proteolytic enzymes and ricin"  
Arch. Fisiol., 27: 1-7.
049. GONÇALVES, N. P.; KAKIDA, J.; BENDEZÚ, J. M. e LELES, W. D. (1981)  
"Cultivares de mamona"  
Informe Agropecuário, 82: 31.

050. GRECO, M. et alli (1974)  
Biochem. J., 142: 695-7.
051. GUERTLER, L. G. and HORSTMANN, H. J. (1973)  
"Subunits of toxin and agglutinin of *Ricinus communis*"  
Biochem. Biophys. Acta, 295(2): 582-94.
052. GUNN, T. A. (1922)  
"Agglutination by Ricin"  
Proc. Physiol. Soc., J. Physiol., 54: 1 XXXVIII.
053. HARA, K.; ISHIGURO, M.; FUNATSU, G. and FUNATSU, M. (1975)  
"Biochemical Studies on Ricin. Part VI. Physical, Chemical  
and Physiological properties of S-CM subunits of Ricin D"  
Agr. Biol. Chem. 39(8): 1631-37.
054. HIPPEL, N. J.; BASCH, J. J. and GORDON, W. G.  
Arch. Biochem. Biophys., 94: 35 (1961).
055. HOLASEK, A.; LIEB, H. and MERZ, W. (1955) in WALLER, G. R.;  
EBNER, K. E.; SCROGGS, R. A.; GUPTA, B. R. and CORCORAN, J.  
B. (1976).  
"Studies on the toxic action of ricin"  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121: 685.

056. ISHIGURO, M.; FUNATSU, G. and FUNATSU, M. (1971)  
"Biochemical studies on ricin. Part III. Purification of ricin"  
Agric. Biol. Chem., 35(5): 724-8.
057. ISHIGURO, M.; FUNATSU, G. and FUNATSU M. (1971)  
"Biochemical studies on ricin. IV. Aminoacid analysis, carboxyl and aminoterminal aminoacids of ricin D"  
Agr. Biol. Chem., 35(5): 729.
058. ISHIGURO, M.; TAKAHASHI, T.; HAYASHI, K. and FUNATSU, M. (1964)  
"Biochemical studies on ricin. II. Molecular weight and some physicochemical properties of crystalline ricin D"  
J. Biochem., 56(4): 325-7.
059. JAFFÉ, W. G. (1969)  
"Toxic Constituents of Plants Foodstuffs"  
I. E. Liener ed. Chapt. 3, Academic press, New York and London.
060. JAFFÉ, W. G. (1973)  
"Toxic proteins and Peptides in "Toxicants Occurring Naturally in Foods"  
Chapt. 5, Ed. by National Academy of Sciences, Washington, D. D., second ed.

061. JAKI, M. (1941)  
Hung 125.486, Dec. 2, 1940.  
Chem. Abstr., 35: 2354.
062. JANSON, H. (1973)  
"Castor bean processing"  
Oléagineux, 28(6): 307.
063. JENKINS, F. P. (1963)  
"Allergenic and toxic components of castor bean meal: review  
of literature and studies of the inactivation of these com-  
ponents"  
J. Sci. Food Agr., 14: 773.
064. JONES, D. B. (1947)  
"Proteins of the castor bean - their preparation, proper-  
ties and utilization"  
J. Am. Oil Chem. Soc., 24: 247.
065. KABAT, E. E.; HEILDEBERGER, M. and BEZER, A. E. (1947)  
"A Study of the purification and properties of ricin"  
J. Biol. Chem., 168: 629- 39.
066. KANEKO, I.; HAYATSU, H.; UKITA, T. (1975)  
"Quantitative assay for concanavalin A - and Ricinus Commu-

nis agglutinin - mediated agglutination of rat ascites hepatoma cells. Relation between concanavalin A binding and cell agglutination"

Biochem. Biophys. Acta, 392: 131.

067. KAREL, L. ; FRANKLIN, R. C. and CRANDELL, D. D. (1946)

"The quantitative determination of ricin by hemagglutination"

J. Cellular Comp. Physiol., 28: 349-63.

068. KIMURA, M.; FUNATSU, G. and FUNATSU, M. (1977)

"Biochemical studies on ricin. Part XVII. Isolation and amino acid sequences of small tryptic peptides from the oxidized Ala Chain of ricin D"

Agric. Biol. Chem., 41(9): 1733-6.

069. KODRAS, R.; WHITEHAIR, C. K. and MC VICCAR, R. (1949)

"Studies on the detoxification of castor seeds pomace"

J. Am. Oil Chem. Soc., 26: 641.

070. KRASIL'NIKOV, V. N., KOVALENKO, Y. T.; SLANEVSKII, A. V. (1974)

"Development of optimal conditions for the inactivation of ricin in the moist-heat treatment of castor bean oil cake"

Uses. Nauchno - Issled. Inst. Zhirov 1974, 31: 56

Chem. Abstr., 85: 122.092



071. KREAZE, G. B. (1983)  
"Methods for Protein Determination"  
"Methods of Enzymatic Analysis" Edited by Bergmeyer, J. and  
Grabl, M., eds, third ed., vol. 2, p. 84, Verlag Chemie,  
Weinheim.
072. KUNITZ, M. and MC DONALD, M. R. (1948)  
"Isolation of crystalline ricin"  
J. Gen. Physiol., 32: 25-31.
073. LAYNE, E. (1957)  
"Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring  
proteins"  
"Methods in Enzymology" (colowick and Kaplan, eds) Vol. 3,  
p. 450, Academic press, Inc., New York.
074. LAYTON, L. L.; MOSS, L. K. and DE EDS, F. (1961)  
"The Complex Nature of Castor Sensitivity"  
J. Am. Oil Chem. Soc., 38: 76.
075. LE BRETON, E. and GREGORY, P. (1950)  
"Treating castor bean press cake"  
U.S. 2,516,128, July 25, 1950.  
Chem. Abstr., 44: 10.213.
076. LE BRETON, E. and MOULÉ, Y. (1947)  
"The constitution and toxicity of pure ricin"

Compt. rend. 225: 152.

Chem. Abstr., 41: 6901.

077. LE BRETON, E. and MOULÉ, Y. (1947)

"The constitution and toxicity of pure ricin"

Compt. rend., 225: 152-4.

078. LE BRETON, E. and MOULÉ, Y. (1949)

"The constitution and toxicity of pure ricin"

Bull. Soc. Chem. Biol., 31: 94.

079. LEE, K. H.; HAN, I. K.; CHUNG, C. Y.; CHUNG, U. I.

"Studies on the nutritive values of locally produced oil meals. VIII. Studies on the detoxification of castor bean meal"

Chem. Abstr., 89: 22.518.

080. LIENER, I. E. (1974)

"Phytohemagglutinins: their nutritional significance", Symposium of Toxic proteins and peptides.

J. Agr. Food Chem., 22: 17.

081. LIENER, I. E. (1976)

"Phytohemagglutinins"

Ann. Rev. Plant Physiol., 27: 291-319, ed. by Winslow R. Briggs.

082. LIN, J.-Y.; LIU, K.; CHEN, C.-C.; TUNG, T.-C. (1971)  
"Effect of crystalline ricin on the biosynthesis of protein,  
RNA, and DNA in experimental tumor"  
Cancer Res., 31(7): 921.
083. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. and RANDALL, R.  
J. (1951)  
"Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent"  
J. Biol. Chem. 193: 265-267.
084. LUTSKY, M. D.; LUTSKY, A. A.; KIPRICINI, E. K. and KRUPKO,  
A. E. (1977)  
"The toxicity and antitumor activity of three individual  
fractions of lectins from Ricinus communis seeds"  
Neoplasma, 24(3): 341.
085. MACA, R. D.; HOAK, J. C. (1974) in LIENER, I. E. (1976)  
"Phytoemagglutinins - Annual Review of Plant"  
Physiology, 27: 291.
086. MASSART, S. and MASSART, A. (1942)  
Chem. Abstr., 36: 2950.
087. MELDRUM, W. P. (1900) in JENKINS, F. P. (1963)  
"Allergenic and toxic components of castor bean meal: review  
of the literature and studies of the inactivation of these  
components"

088. MENDES, S. e CINTRA, A. B. O (1953)  
"Etiologia da "asma epidêmica de Bauru"  
Revista Paulista de Medicina, 43(4): 29.
089. MESSINEO, L. (1966)  
"Modification of the Sakaguchi Reaction; Spectrofotometric Determination of Arginine in Proteins without Previous Hydrolysis"  
Archives of Biochem. and Biophys., 117: 510-531.
090. MISE, T.; FUNATSU, G.; ISHIGURO, M. and FUNATSU, M. (1977)  
"Biochemical studies on ricin. Part XVIII. Isolation and characterization of ricin E from castor beans"  
Agric. Biol. Chem., 41(10): 2041-6.
091. MONTANARO, L.; SPERTI, S.; MATTIOLI, A., TESTONI, G. and STIRPE, F. (1975)  
"Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro. Inhibition of the binding of elongation factor 2 and of adenosine diphosphate - ribosylated elongation factor 2 to ribosomes  
Biochem. J., 146: 127-31.  
Chem. Abstr. 82: 165.619g.
092. MONTANARO, L.; SPERTI, S.; STIRPE, F. (1973).

\*Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro. Ribosomes as the target of the toxin\*

Biochem. J., 136(3): 677-83.

Chem. Abstr. 80: 913.834r

093. MOTOLLA, A. C.; HENDRICKSON, A. P.; O'CONNELL, D. E.;  
PALTER, R. and KOHLER, G. O. (1968)

\*Pilot plant deactivation of castor meal antigen. Lime Process\*

J. Agr. Food Chem., 16: 725.

094. MOTOLLA, A. C.; MACKEY, B. and HERRING, V. (1971)

\*Castor Meal Antigen Deactivation - Pilot Plant Steam Process\*

J. Am. Oil Chem. Soc., 48: 510.

095. MOTOLLA, A. C.; MACKEY, B.; HERRING, V. and KOHLER, G. O.  
(1972)

\*Castor meal antigen deactivation - pilot plant ammonia process\*

J. Am Oil Chem. Soc., 49: 101.

096. MOTOLLA, A. C., MACKEY, B., WALKER, H. G. and KOHLER, G. O.

\*Castor meal antigen deactivation - pilot plant lime process\*

097 MOULÉ, Y. (1949)

"Preparation and toxicity of pure ricin"

Arch. Sci. Physiol., 5: 277.

098. MOULÉ, Y. (1951)

"The physicochemical properties and the mechanism of action of ricin"

Arch. Sci. Physiol., 5: 227-43.

099. MOURA, P. A. M. (1981)

"Aspectos econômicos das culturas oleaginosas - amendoim, mamona e girassol"

Informe Agropecuário, 82: 3.

100. MOURGUE, M.; BARET, R.; REYNAUD, J. and BELLINI, T. (1958)

"Study of proteins in seeds of Ricinus (Ricinus communis)"

II. Bull. Soc. Chem. Biol., 40: 1453-63.

101. MURASE, K.; KUSAKAWA, S.; YAMAGUCHI, C.; TAKAHASHI, T., FU-

NATSU, M.; GOTO, I.; KOYA, O. and OKAMOTO, S. J. (1966)

"Evaluation of castor seeds residues as cattle fodder. IV.

Toxicity of ricin in castor meal"

J. Agr. Chem. Soc. (Japan), 40: 61-66.

102. NANNO, S., ISHIGURO, M., FUNATSU, G. and FUNATSU, M. (1975)  
"Biochemical studies on ricin D"  
Agric. Biol. Chem., 39(8): 1645.
103. NANNO, S., ISHIGURO, M., FUNATSU, G. and FUNATSU, M. (1975)  
"Biochemical studies on ricin. IX. Mode of binding of carbohydrates in ricin D"  
Agric. Biol. Chem., 39 (8): 1651-4.
104. NICOLSON, G. L., BLAUSTEIN, J., ETZLER, M. (1974)  
"Characterization of two plants lectins from Ricinus Communis and their quantitative interaction with a murine lymphoma"  
Biochemistry, 13: 196-204. Chem. Abstr. 80: 94.078h
105. OLSNES, S., HEIBERG, R. and PIHL, A. (1973) in OLSNES, S., REFSNES, K. and PIHL, A. (1974):  
"Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin"  
Nature, 249: 627.
106. OLSNES, S. and PIHL, A. (1972)  
"Ricin. Potent inhibitor of protein synthesis"  
FEBS Lett., 20(3): 327-29. Chem. Abstr. 76: 149.447c.

107 OLSNES, S. and PIHL, A. (1972)

"Treatment of abrin and ricin with  $\beta$ -mercaptoethanol. Opposite effects on their toxicity in mice and their ability to inhibiting protein synthesis in cell-free system"

FEBS Lett., 28: 48-50.

108. OLSNES, S. and PIHL, A. (1973)

"Different biological properties of the two constituents polypeptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting"

Biochemistry, 12(16): 3121-6.

109. OLSNES, S. and PIHL, A. (1973)

"Isolation and properties of abrin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. Evidence for different biological functions of its two constituent peptide chains"

Eur. J. Biochem., 35: 179.

110. OLSNES, S. REFSNES, K. and PIHL, A. (1974)

"Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin"

Nature, 249: 627-31.

111. OLSNES, S. and SALVEDT, E. (1975)

"Conformation - dependent antigenic determinants in the toxic lectin ricin"

J. Immunol., 114: 1743-48. Chem. Abstr. 82: 153575J.



112. OLSNES, S.; SALVEDT, E. and PIHL, A. (1974)

"Isolation and comparison of galactose-binding lectins from  
Abrus precatorius and Ricinus Communis"

J. Biol. Chem., 249: 803-10. Chem. Abstr. 80: 106.739g

113. "OMEGA" (1923)

"Proteins of the Castor Beans - Their preparation, properties  
and utilization"

J. Am. Chem. Soc. 24: 247.

114. OSBORNE, T. B. (1962)

"Medical and Poisonous Plants of Lonthern and Eastern Africa".  
Ed. by J. M. Watte e M. G. Brayer - Brandwijk, 2nd. Ed.,  
E. S. Levingstone Ltda, Edinburgh and London.

115. OSBORNE, T. B.; MENDEL, L. B. and HARRIS, I. F. (1905) in  
KABAT, E. A.; HEIDELBERGER, M. e BEZER, A. E. (1947)

"A study of the purification and properties of Ricin"

J. Biol. Chem. 168: 629-39.

116. PAPPENHEIMER, A. M. Jr.; OLSNES, S.; HARPER, A. A. (1974):

"Lectins from Abrus Precatorius and Ricinus Communis I.  
Immunochemical relations between toxins and agglutinins"

J. Immunol., 113(3): 835-41. Chem. Abstr. 81: 118.422g

117. PERRONE, I. C.; IACHAN, A.; DUMONT, G. B.; DISITZER, L. V.; OSÓRIO e CASTRO, V. R.; ROITMAN, R. e GOMES, S. M. (1966)  
"Contribuição ao estudo da Torta de Mamona".

INT

118. PETROSYAN, E. and PONOMOROV, V. (1938)

"Use of castor cake for pig feeding"

Schweinezucht 4: 33 (1934).

Chem. Abstr. 31: 75542.

119. PIHL, A.; FOODSTAD, O. and OLSNES, S. (1980)

"Anti-cancer properties of the toxic lectins abrin and ricin"

Protides Biol. Fluids. 27th: 631-6.

120. RATNER, B. and GRUJELHL, H. L. (1929)

"Sensitizing dose in respiratory anaphylaxis (asthma)"

Amer. J. Hyg., 10: 236. Chem. Abstr. 23: 4257

121. RAUPP, D. S. (1983).

"Redução da atividade alergênica do farelo industrial de mamona (*Ricinus communis*) por processos Químico - Hidrotérmicos"

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre.

122. REFSNES, K.; OLSNES, S. and PIHL, A. (1974)

"Toxic proteins abrin and ricin. Their binding to and entry into Ehrlich ascite cells"

J. Biol. Chem., 249(11): 3557-62. Chem. Abstr. 81: 100.433j

123. RIGAS, D. A., JOHNSON, E. A.; JONES, R. T.; MC DERMED, J. D. and TISDALE, V. V. (1966) In JAFFÉ, W. G.

"Toxic Constituents of Plants Foodstuffs"

Edited by I. E. Liener, Chapt. 3, Academic Press, New York and London.

124. ROLIM, A. A. B. (1981)

"Óleos Vegetais: Usos Gerais"

Informe Agropecuário, 82: 17.

125. RUDOLPH, W.

Chem. Abstr., 37: 60.

126. RUDOLPH, W. (1942)

"Detoxication of castor pomace"

U.S. 2,297,503 - Sept. 29

Chem. Abstr., 37: 1620.

127. SCHÖNE, D. (1958)

Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 234: 233.

128. SPERTI, S.; MONTANARO, L.; MATTIOLI, A. and STIRPE, F. (1973)  
"Inhibition by ricin of protein synthesis invitro 60 S Ribosomal subunit as the target of the toxin"  
Biochem. J., 136(3): 813-15. Chem. Abstr. 80: 104.661j.
129. SPERTI, S.; MONTANARO, L.; MATTIOLI, A.; TESTONI, G. (1975)  
"Relation between elongation factor - I and elongation factor 2 -dependent guanosine triphosphatase activities of ribosomes. Inhibition of both activities by ricine".  
Biochem. J., 148: 447-51.
130. SPIES, J. R. and COULSON, E. F. (1943)  
"The chemistry of Allergens. VIII. Isolation and Properties of an Active Protein-polysaccharidic Fraction, CB-1A, from Castor Beans"  
J. Am. Chem. Soc., 65: 1720.
131. SPIES, J. R.; COULSON, E. J.; CHAMBERS, D. C.; BERNTON, H. S. and STEVENS, H. (1944)  
"The Chemistry of Allergens. IX. Isolation and Properties of an Active, Carbohydrate-Free protein from Castor Beans"  
J. Am. Chem. Soc., 66: 748.
132. SPIES, J. R.; COULSON, E. J. and WELLS, P. A. (1963)

- "Deallergenization and detoxification of castor bean pomace"  
J. Agr. Food Chem., 10: 140.
133. TAKAHASHI, T.; FUNATSU, G. and FUNATSU, M. (1962)  
"Castor bean hemagglutinin. I. Separation and purification"  
J. Biochem. (Tokio), 51: 288-92.
134. TAKAHASHI, T.; FUNATSU, G. and FUNATSU, M. (1962)  
"Castor bean hemagglutinin. Hemagglutinin separated from  
crystalline ricin and its molecular weight"  
J. Biochem. (Tokio), 52: 50-3.
135. TANG, H. (1938)  
"The feeding value of the extracted castor-oil meal"  
Kísérletügy közlemények 41: 69-72; Chem. Abstr., 33:7422
136. THOMPSON, J. F. (1950)  
"The mechanism of the toxic action of ricin"  
J. Pharmacol. Exptl. Therap., 100: 370-81.
137. TUSON, R. V. (1864) in EVANS, T. (1900)  
"A Preliminary Communication upon Ricinine"  
J. Am. Chem. Soc. 22:39
138. UENO, S.; FUNATSU, G. and FUNATSU, M. (1977)  
"Studies on castor bean hemagglutinin. Part III. Reinvesti-  
gation of the purification and characterization of castor

bean hemagglutinin"

Agr. Biol. Chem., 41(6): 1069,73.

139. VAN DE KAMER, J. H. and VAN GINKEL, L. (1952)

"Rapid determination of crude fiber in cereals"

Cereal Chem., 29: 239-51.

140. VAN WAUWE, J.-P.; LODNTIENS, F. G. and DE BRUYNE, C. K.  
(1973)

"Interaction of Ricinus communis hemagglutinin with polysaccharides and low molecular weight carbohydrates"

Biochem. Biophys. Acta, 313: 99-105.

141. VELLUZ, L. (1938)

"Inactivation of some toxins by papain"

Compt. Rend. Soc. Biol., 128: 132.

142. WALDSCHMIDT-LEITZ, E. and KELLER, L. Z. (1969)

"Seed proteins. XVIII. Purification of ricin and differentiation of its actions.

Physiol. Chem., 350: 503.

143. WALDSCHMIDT-LEITZ, E.; KELLER, L. and HOPPESEYLER'S, Z.

(1970)

Physiol. Chem., 351: 990.

144. WALLER, G. R. and NEGI, S. s. (1958)

"Isolation of ricin, ricinine and the allergenic fraction from castor seeds pomace from two different sources"

J. Am. Oil Chem. Soc., 35: 409.

145. WALLER, G. R.; EBNER, K. E.; SCROGGS, R. A.; DAS GUPTA, B. R. and CORCORAN, J. B. (1966)

"Studies on the toxic action of ricin"

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 121: 685.

146. WEISS, E. A. (1971)

"Castor, Sesame and Safflower"

Donard Hill Books, London.

147. YOSHITAKE, S.; FUNATSU, G. and FUNATSU, M. (1978)

"Biochemical studies on ricin. Part XXII. Isolation and sequences of peptic peptides, and the complete sequence of the Ile chain of ricin D"

Agric. Biol. Chem., 42(6): 1267-74.