UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

REDUÇÃO DA ATIVIDADE ALERGÊNICA DO FARELO INDUSTRIAL DE MAMONA (Ricinus communis) POR PROCESSOS QUÍMICO-HIDROTÉRMICOS

DORIVALDO DA SILVA RAUPP

Prof. DR. JAIME AMAYA-FARFÁN

Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

1983

Aos meus pais e irmãos

AGRADECIMENTOS

Ao Orientador deste trabalho, Prof. DR. JAIME AMAYA-FARFÁN.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. DR. MOYSÉS A. FUKS, Departamento de Imunologia do Instituto de Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ, pela assessoria na parte imunológica, e à Técnica Dona Terezinha Gomes Ribeiro.

À Eunice A. Kumagai, Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da FEA.

À Secção de Oleaginosas do Instituto Agronômico de Campinas.

Ao Instituto Butantan.

Aos Professores Dr. Emílio S. Contreras Guzmán, Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, Dr. Aloisio José Antunes, Dr. Valter Esteves e Dr. Fumio Yokoya, por terem gentilmente permitido o uso dos laboratórios e aparelhos.

Aos Técnicos e Funcionários da FEA.

À Profª Lenir Esmeralda dos Santos Simões.

Ao amigo Dr. Aldo Berndt.

Aos amigos Cunha, Daniel, Marcos, Geraldo, Susana, Flia Berndt e Flia Gonzales.

Aos demais colegas e amigos pelo estímulo e facilidades concedidas para a execução do trabalho.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMO	1
SUMMARY	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. CULTURA DA MAMONEIRA	4
2.2. INDUSTRIALIZAÇÃO DA SEMENTE DE MAMONA	5
2.3. FARELO DE MAMONA	7
2.3.1. ÓLEO RESIDUAL	9
2.3.2. FATORES TÓXICOS E ALERGÊNICOS	9
2.3.2.1. RICINA	9
2.3.2.2. RICININA	11
2.3.2.3. ALÉRGENO	12
2.3.2.3.1. SISTEMA IMUNOLÓGICO NOS ANIMAIS	12
2.3.2.3.2. CASOS DE ALERGIAS OU HIPERSENSIBILIDADE À MAMONA	15
2.3.2.3.3. IDENTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ALÉRGENO	17
2.3.3. USO DO FARELO DE MAMONA DESTOXICADO COMO RAÇÃO ANIMAL	20
2.3.4. DESALERGENIZAÇÃO DO FARELO DE MAMONA	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. AMOSTRAS	29
3.2. CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE MAMONA INDUSTRIAL	29
3.2.1. UMIDADE	29
3.2.2. CINZA	29
3.2.3. ÓLEO	29
3.2.4. FIBRA BRUTA	30

PÁGINA

3.2.5. PROTEÍNA 30

3.2.6. AMINOÁCIDOS 30

3.2.6.1. PREPARO DA AMOSTRA 31

3.2.6.2. MISTURA PADRÃO 31

3.2.6.3. ANÁLISE AUTOMATIZADA E CÁLCULOS 31

3.3. EXTRAÇÃO DO CB-1A (ALÉRGENO DA MAMONA) E PREPARO DO ANTI-SORO CB-1A 32

3.4. TRATAMENTO DO FARELO DE MAMONA INDUSTRIAL PARA INATIVAÇÃO DO ALÉRGENO 34

3.4.1. SIMPLES AUTOCLAVAGEM (COM CALOR ÚMIDO) 34

3.4.2. AUTOCLAVAGEM (COM CALOR ÚMIDO) CONJUGADA COM ÁCIDO CLORÍDRICO 34

3.4.3. AUTOCLAVAGEM (COM CALOR ÚMIDO) CONJUGADA COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO 35

3.5. PREPARO DO EXTRATO AQUOSO DO FARELO DE MAMONA 35

3.5.1. PROCEDIMENTO 35

3.5.2. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NO EXTRATO 35

3.6. MÉTODO PARA AVALIAR A TOXIDADE DO FARELO DE MAMONA 36

3.7. MÉTODOS PARA AVALIAR A ATIVIDADE DO ALÉRGENO NO FARELO DE MAMONA 36

3.7.1. MÉTODO DE DIFUSÃO DUPLA EM GEL DE AGAR (DDGA) 36

3.7.1.1. SOLUÇÕES ALERGÊNICAS PARA AVALIAÇÃO 37

A) EXTRATO AQUOSO DE FARELO DE MAMONA 37

B) CONDENSADO DO DESTILADO AO VAPOR 37

3.7.1.2. TÉCNICA DE ENSAIO 37

3.7.1.3. INTERPRETAÇÃO 38

3.7.2. MÉTODO DE ANAFILAXIA CUTÂNEA PASSIVA (ACP) 38

3.7.2.1. SOLUÇÕES ALERGÊNICAS PARA AVALIAÇÃO 39

PÁGINA

A) EXTRATO AQUOSO DE FARELO DE MAMONA 39

B) CONDENSADO DE DESTILADO AO VAPOR 39

3.7.2.2. TÉCNICA DE ENSAIO 39

3.7.2.3. INTERPRETAÇÃO 40

3.8. ENSAIO BIOLÓGICO 40

3.8.1. PREPARO DO FARELO DE MAMONA INDUSTRIAL PARA ALIMENTAÇÃO DE RATOS 41

3.8.2. PREPARO DAS DIETAS 41

3.8.3. AGRUPAMENTO E ALIMENTAÇÃO DOS RATOS 43

3.9. ARRASTE POR VAPOR D'ÁGUA DE COMPOSTOS ALERGÊNICOS DO FARELO DE MAMONA 44

3.9.1. PROCEDIMENTOS DE ARRASTE 44

3.9.2. TESTES QUÍMICOS PARA CARACTERIZAÇÃO DO CONDENSADO DE VAPOR D'ÁGUA 46

3.9.2.1. TESTE DA ANTRONA 46

3.9.2.2. REAÇÃO DO BIURETO 46

3.9.2.3. DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS 46

3.9.2.4. REAÇÃO DA NINIDRINA 47

3.9.2.5. DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL 47

4. RESULTADO E DISCUSSÃO 48

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE MAMONA INDUSTRIAL 48

4.1.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL 48

4.1.2. AMINOÁCIDOS TOTAIS 49

4.2. EFEITO DO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO NA TOXIDADE DO FARELO 49

4.3. EFEITO DO TRATAMENTO NA ATIVIDADE ANTIGÊNICA E ALERGÊNICA DO FARELO 51

4.3.1. SIMPLES AUTOCLAVAGEM (COM CALOR ÚMIDO) 52

4.3.2. AUTOCLAVAGEM (COM CALOR ÚMIDO) CONJUGADA COM ÁCIDO

PÁGINA

CLORÍDRICO 53

4.3.3. AUTOCLAVAGEM (COM CALOR ÚMIDO) CONJUGADA COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO 56

4.4. ENSAIO BIOLÓGICO COM FARELO DE MAMONA INDUSTRIAL 59

4.5. AVALIAÇÃO DO VAPOR D'ÁGUA APÓS CONTATO DIRETO COM FARELO DE MAMONA 65

4.5.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CONDENSADO DE VAPOR D'ÁGUA 65

4.5.2. COMPOSTOS NINIDRINA-POSITIVOS 66

4.5.3. ANTIGENICIDADE E ALERGENICIDADE DO CONDENSADO DE VAPOR D'ÁGUA 69

5. CONCLUSÕES 74

6. BIBLIOGRAFIA 76

ÍNDICE DE TABELAS

PÁGINA

TABELA 1. Composição centesimal da semente de mamona (com casca). 4

TABELA 2. Produção de semente de mamona nos principais países produtores nos anos de 1978 a 1980..... 5

TABELA 3. Quantidade de óleo de mamona exportado pelos principais países nos anos de 1977 a 1979..... 6

TABELA 4. Composição centesimal (%) de alguns farelos..... 8

TABELA 5. Composição centesimal (teórica) das dietas utilizadas para alimentação de ratos..... 42

TABELA 6. Componentes da mistura salina utilizada nos ensaios.... 42

TABELA 7. Componentes da mistura vitamínica utilizada nos ensaios 43

TABELA 8. Composição centesimal do farelo de mamona industrial... 48

TABELA 9. Conteúdo de aminoácidos totais de três farelos de mamona industrial procedentes de fontes diferentes..... 50

TABELA 10. Avaliação da toxidade do farelo de mamona em cobaias por via intraperitoneal..... 51

TABELA 11. Efeito da autoclavagem (com calor úmido) a 121 ºC na atividade imunoprecipitante do antígeno de farelo de mamona industrial..... 52

TABELA 12. Efeito da autoclavagem (com calor úmido) a 121 ºC na atividade anafilática do antígeno de farelo de mamona industrial..... 53

TABELA 13. Efeito da autoclavagem (com calor úmido) a 121 ºC conjugada com ácido clorídrico na atividade imunoprecipitante do antígeno de farelo de mamona industrial..... 54

TABELA 14. Efeito da autoclavagem (com calor úmido) a 121 ºC conjugada com ácido clorídrico na atividade anafilática do

PÁGINA

antígeno de farelo de mamona industrial..... 54

TABELA 15. Efeito da autoclavagem (c0m calor úmido) a 121 ºC conjugada com hidróxido de sódio na atividade imunoprecipitante do antígeno de farelo de mamona industrial..... 57

TABELA 16. Efeito da autoclavagem (com calor úmido) a 121 ºC conjugada com hidróxido de sódio na atividade anafilática do antígeno de farelo de mamona industrial..... 57

TABELA 17. Conteúdo de aminoácidos totais dos farelos de mamona industrial autoclavados a 121 ºC por 60 minutos com ácido ou álcali, respectivamente, e usados nas dietas para ratos..... 61

TABELA 18. Perda de alguns aminoácidos das proteínas de farelo de mamona industrial durante o tratamento de desalergenização..... 62

TABELA 19. Ensaio biológico com dietas contendo proteína de farelo de mamona industrial autoclavado (com calor úmido) a 121 ºC por 60 minutos na presença de 0,5 % (p/p) de ácido clorídrico..... 63

TABELA 20. Ensaio biológico com dietas contendo proteína de farelo de mamona industrial autoclavado (com calor úmido) a 121 ºC por 60 minutos na presença de 0,5 % (p/p) de hidróxido de sódio..... 63

TABELA 21. Dados obtidos nos ensaios biológicos com ratos Wistar, usando-se como fonte protéica diferentes combinações de farelo de mamona industrial tratado no laboratório e caseína comercial..... 64

TABELA 22. Resultado dos testes químicos aplicados no condensado de vapor d'água após contato direto com o farelo de ma-

PÁGINA

mona industrial..... 66

TABELA 23. Quantidade (em µg de ác. glutâmico) de compostos ninidrina-positivos arrastados do farelo de mamona por vapor d'água..... 67

TABELA 24. Quantidade (em µg de ác. glutâmico) de compostos ninidrina-positivos arrastados do farelo de mamona industrial por vapor d'água..... 67

TABELA 25. Atividade imunoprecipitante do vapor d'água mantido em contato direto com farelo de mamona industrial não-tratado no laboratório..... 70

TABELA 26. Atividade anafilática do vapor d'água mantido em contato direto com farelo de mamona industrial não-tratado no laboratório..... 70

TABELA 27. Atividade imunoprecipitante do vapor d'água mantido em contato direto com farelo de mamona industrial não-tratado no laboratório, e posteriormente condensado e concentrado no liofilizador..... 71

TABELA 28. Atividade anafilática do vapor d'água mantido em contato direto com farelo de mamona industrial não-tratado no laboratório, e posteriormente condensado e concentrado no liofilizador..... 71

TABELA 29. Atividade imunoprecipitante do vapor d'água mantido em contato direto com farelo de mamona industrial tratado no laboratório..... 72

TABELA 30. Atividade anafilática do vapor d'água mantido em contato direto com farelo de mamona industrial tratado no laboratório..... 72

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

FIGURA 1. Esquema de isolamento do CB-1A..... 33

FIGURA 2. Procedimentos para arraste de vapor..... 45

FIGURA 3. Concentração de compostos ninidrina-positivos por fração de 100 mL de destilado ao vapor, mantido em contato direto com farelo de mamona industrial tratado com NaOH e autoclavado a 121 ºC por 60 minutos..... 68

RESUMO

Foi comprovada a alergenicidade do farelo industrial de mamona (Ricinus communis). O farelo de mamona de origem industrial foi submetido a tratamento na autoclave para inativação do alérgeno, usando-se calor úmido simples ou combinado com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio em concentrações de 0,5 , 1,0 , 2,0 e 4,0 % (p/p). Para tanto, foram selecionados períodos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos a 121ºC. O grau de desalergenização foi avaliado por dois métodos imunológicos: difusão dupla em gel de agar e anafilaxia cutânea passiva em camundongos. Tratamento hidrotérmico combinado com HCl ou NaOH foi mais efetivo para inativar ambas as propriedades imunoprecipitante e anafilática. Embora tratamento hidrotérmico combinado com hidróxido de sódio tenha tido maior poder inativante sobre o alérgeno do que com o ácido, o último tratamento pareceu ser menos destruidor para as proteínas. Isto foi observado através de determinações de aminoácido total, as quais revelaram perdas de principalmente cisteína e lisina. Um teste de Protein Efficiency Ratio (PER) por 10 dias, em que a caseína foi parcialmente substituída pela proteína de mamona, confirmou um valor nutricional mais baixo para o farelo tratado com álcali. A presença de alérgeno foi detectada no condensado de vapor d'água usado para aquecimento do farelo industrial de mamona. Através de testes químicos simples, contudo, não se pode afirmar que tal alérgeno seja uma proteína ou carboidrato.

SUMMARY

In this study the allergenicity of castor bean (Ricinus communis) meal of industrial origin was verified. In order to evaluate some simple methods of the allergens the meal was subjected to heat treatment in an autoclave as follows: a) moist heat only b) moist heat in hydrochloric acid and c) moist heat in sodium hidroxide, both at 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 % (w/w). Autoclaving periods of 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutes at 121 ºC were selected. The degree of deallergenization of meals was assessed by both the agar-gel double diffussion and passive cutaneous anaphylaxis in mice. Moist heat with either HCl or NaOH was more effective in lowering both the immuno-precipitating and the anaphylactic properties. Although sodium hidroxide had greater inactivating power on the allergen than the acid, the latter treatment appeared to be less damaging to the protein. This was observed through total aminoacid determination which revealed losses of principally cysteine and lysine. A 10-day Protein Efficiency Ratio test in which casein was partially substituted for by the castor bean protein, confirmed the lower nutritional value of the alcali- treated meal. The presence of some allergen was detected in the condensed water vapors proceding from the heating of industrial castor bean meal. Through simple chemical tests, however, it cannot be said that such allergen is either a protein or a carbohydrate in nature.

1. INTRODUÇÃO

A semente de mamona in natura apresenta cerca de 40 a 50 % de óleo e aproximadamente 17 a 20 % de proteína. Da extração industrial do óleo de mamona obtem-se como subproduto o farelo de mamona, o qual contém cerca de 32 a 50 % de proteína.

A principal utilização do farelo de mamona de origem industrial, por tradição, tem sido como adubo orgânico, seja na aplicação direta ou na preparação de adubo misto. Devido ao elevado teor protéico, tanto no Brasil como em outros países, tem havido grande interesse na utilização desse subproduto para formulação de rações animais, porém com sérias limitações. A baixa utilização do farelo ocorre, aparentemente, por duas razões:

1) Devido ao elevado teor de fibra proveniente da casca, a qual tem sido incluída como auxiliadora no processo de extração do óleo, o farelo somente pode ser acrescentado às rações em quantidades limitadas para não diminuir a eficiência da mesma.

2) A presença de composto ou compostos alergênicos, que facilmente resistem aos tratamentos convencionais usados para a inativação da proteína tóxica ricina. Nos animais alimentados com farelo de mamona, o material alergênico acumula-se nos seus tecidos e pode ser repassado ao homem que venha a alimentar-se da carne desses animais.

Independentemente da modernização do processo de extração do óleo que eventualmente reduziria o teor de fibras, se faz necessário estudar a possibilidade de inativar ou eliminar o alérgeno presente no farelo de mamona industrial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CULTURA DA MAMONEIRA

A mamoneira é uma planta oleaginosa da família euforbiácea, gênero Ricinus, espécie Ricinus communis. São conhecidas cerca de vinte variedades da espécie. No Brasil, a planta é comumente conhecida como carrapateira, palma de cristo e rícino. Os frutos são cápsulas espinhosas contendo sementes oleaginosas (19). Na Tabela 1 é apresentada a composição centesimal da semente de mamona.

TABELA 1. Composição centesimal da semente de mamona(com casca).

COMPONENTE	(%)
Umidade	5,14
Cinza	2,73
Óleo	46,65
Proteína	17,88
Fibra	14,99
Carboidrato	12,61

JONES, D.B., 1947 (21).

A origem da cultura da mamoneira é duvidosa, sendo dada pela maioria como asiática ou africana e por alguns até mesmo como americana. No Brasil, é conhecida desde a época colonial, quando dela se extraiu o óleo para lubrificar os engenhos de cana-de-açúcar. É cultivada na maioria dos países tropicais e nos temperados mais quentes. No Brasil a planta aclimatou-se extraordinariamente, sendo encontrada em estado subespontâneo em grandes áreas do território nacional (37).

A produção mundial de semente de mamona e dos principais países produtores é mostrada na Tabela 2. O Brasil foi o maior produtor de semente de mamona nos anos de 1978, 1979 e 1980, sendo responsável por 37,2 , 36,0 e 33,2 % da produção mundial, respectivamente.

TABELA 2. Produção de semente de mamona nos principais países produtores nos anos de 1978 a 1980.

PAÍSES	PRODUÇÃO (TONELADAS)		
	1978	1979	1980
Brasil	317.000	327.000	281.000
Índia	217.000	236.000	233.000
China	98.000	115.000	120.000
Russia	43.000	62.000	58.000
Tailândia	43.000	37.000	26.000
Subtotal	718.000	767.000	718.000
Mundo	852.000	907.000	845.000

Tabela 30. FAO PRODUCTION YEARBOOK, 1980 (12).

2.2. INDUSTRIALIZAÇÃO DA SEMENTE DE MAMONA

A semente de mamona reveste-se de importância pelas várias aplicações de seu óleo no mundo moderno. Praticamente, toda a produção de semente de mamona é industrializada, obtendo-se como produto principal o óleo e como subproduto o farelo de mamona. A extração do óleo na indústria é feita com o uso de prensa e/ou lavagem com solvente (43).

O óleo de mamona, representando cerca de 40 a 50 % do peso da semente (21), contém como componente principal o ácido ricinolêico, o qual chega a atingir teores de até 90 % dos ácidos graxos totais e confere ao

óleo algumas características especiais como: solubilidade em etanol e em hexana quente, pouca solubilidade em éter de petróleo e alta viscosidade e reatividade química (15). O Brasil tem exportado entre 100.000 e 150.000 toneladas/ano de óleo de mamona, contribuindo com cerca de 72 , 86 e 65 % do total da exportação mundial nos anos de 1977 , 1978 e 1979, respectivamente (Tabela 3). Segundo o trabalho elaborado pelo Ministério das Relações Exteriores do Brasil, o consumo mundial deste óleo deverá elevar-se em 1987 para cerca de 400.000 toneladas (43).

TABELA 3. Quantidade de óleo de mamona exportado pelos principais países nos anos de 1977 a 1979.

PAÍSES	EXPORTAÇÃO (TONELADAS)		
	1977	1978	1979
Brasil	101.270	143.070	140.339
Índia	24.457	4.879	56.000
China	2.000	6.000	6.800
Equador	3.864	1.426	4.960
Alemanha Ocidental	2.904	3.332	4.680
Países Baixos	1.673	1.792	1.377
Subtotal	136.168	160.499	214.156
Mundo	139.741	165.289	217.123

MOURA, P.A.M., 1981 (37).

A utilização do óleo de mamona é voltada quase que totalmente para fins industriais. Existem aproximadamente 80 aplicações (43) para este óleo, algumas das quais são mencionadas a seguir:

LUBRIFICANTE: Há situações específicas em que somente o óleo de mamona pode ser utilizado, como por exemplo, onde ocorre grandes variações de temperatura. Neste caso ele é o único recomendado, pois não altera a viscosida

de entre as temperaturas de -30 a +270 ºC. Por isso, este óleo é muito utilizado na lubrificação de turbinas de aeronaves que percorrem regiões com variações bruscas na temperatura. Outras características específicas deste óleo são a sua alta aderência à superfícies e elevada viscosidade. Na Bahia, está sendo instalada uma indústria que vai produzir um lubrificante sintético com características superiores às dos lubrificantes derivados do petróleo, e que utilizará o óleo de mamona como matéria prima. O lubrificante sintético, se utilizado em motores a explosão, permitirá a troca do óleo de 50.000 em 50.000 km.

COMBUSTÍVEL: Com o advento da alta de preços do petróleo, o óleo de mamona passou a receber atenção especial, pois este óleo poderá ser utilizado em substituição ao óleo diesel, conforme pesquisas que estão sendo realizadas.

NA INDÚSTRIA QUÍMICA E FARMACÊUTICA: Devido a existência de diversos tipos de ácidos graxos em sua composição, o óleo de mamona proporciona uma série de utilizações, como por exemplo, na fabricação de plásticos, tintas, vernizes, impermeabilizantes, isolantes, corantes, anilinas, desinfetantes, colas, aderentes, germicidas, fungicidas, inseticidas, cosméticos, drogas farmacêuticas, etc.

NA INDÚSTRIA AUTOMOBILÍSTICA: Além dos usos indiretos, como nas tintas, por exemplo, o óleo de mamona é quase que o único componente dos fluidos hidráulicos dos freios dos veículos. É também o mais indicado para a pulverização dos chassis e motores após a lavagem, pois não proporciona o ressecamento das partes feitas de borracha ou plástico.

2.3. FARELO DE MAMONA

Da extração do óleo de sementes de mamona, obtém-se como subproduto industrial o farelo, que contém cerca de 32 a 45 % de ptoteínas (43). O Brasil produziu nos anos de 1978 , 1979 e 1980 em torno de

158.000 , 163.000 e 140.000 toneladas de farelo de mamona, respectivamente (cálculos estimados apartir dos dados da Tabela 1). Na Tabela 4 é apresentada a composição centesimal do farelo de mamona, e para comparação aparece também os farelos de amendoim, girassol e algodão .

TABELA 4. Composição centesimal (%) de alguns farelos.

COMPONENTE	MAMONA	AMENDOIM	GIRASSOL	ALGODÃO
Umidade	7,48	10,35	6,48	10,46
Cinza	7,65	5,19	7,50	9,82
Óleo	2,62	1,39	1,12	1,44
Proteína	45,00	50,87	31,47	37,91
Fibra	32,84	9,36	13,07	16,60
Extrato Não Nitrogenado	7,91	22,84	24,87	23,77

ROLIM, A.A.B., 1981 (43).

A principal aplicação do farelo de mamona ainda tem sido como adubo orgânico (51), seja na aplicação direta ou na preparação de adubos mistos. Como adubo, tem se mostrado bastante superior ao esterco de bovino, pois apresenta 3,77 , 1,62 , 1,12 e 6,41 % respectivamente de N , P , K e Ca contra 0,34 , 0,13 , 0,35 e 0,82 % dos mesmos elementos encontrados no esterco bovino (43).

Apesar de seu elevado teor protéico o uso do farelo de mamona como ingrediente para rações animais ainda tem sido limitado, principalmente, por duas razões: o teor de fibra proveniente da casca e a presença de material alergênico, que facilmente resistem aos tratamentos físicos e químicos usados com sucesso para inativação das substâncias tóxicas ricina e ricinina.

Considerando que, os métodos usados atualmente para a destoxi-

cação do farelo de mamona podem não ser completamente eficientes, seria de interesse incluir nesta revisão os efeitos que a ricina, a ricinina,o óleo residual e a fração alergênica podem ter sobre os animais que o consomem , bem como o valor biológico do farelo.

2.3.1. ÓLEO RESIDUAL

Contrário a idéia de que o ainda escasso óleo residual contido no farelo de mamona (cerca de 2 %) poderia causar problemas fisiológicos (21) ,tem sido demonstrado que o ácido ricinolêico presente no óleo não tem ação purgativa quando misturado com alimentos (15). A adição de 1 e 5 % de óleo de mamona não tem apresentado efeitos adversos em galinhas (15). É interessante observar que, o óleo de mamona tem sido consumido por pessoas ao ser usado como adulterante (10 %) de óleo comestível (15,43).

2.3.2. FATORES TÓXICOS E ALERGÊNICOS

2.3.2.1. RICINA

As antigas civilizações grega, egípcia, hebraica, romana e chinesa já tinham conhecimento da tocidade das sementes de mamona (14). Segundo JONES (21), foi DIXSON, em 1887, o primeiro a isolar uma fração tóxica da semente de mamona, e o nome ricina foi atribuído por STILLMARK em 1888, o qual demonstrou ter essa fração protéica a propriedade de aglutinar os glóbulos vermelhos de sangue humano e de animais. Em 1905, OSBORNE E COL., segundo JENKINS (22), purificaram uma albumina representando 1,5 % do farelo de mamona, com elevado peso molecular, alta toxidez e ação hemaglutinante, a qual foi identificada como sendo a ricina. WALLER E NEGI

(58) isolaram a ricina dos farelos comercial e preparado no laboratório, em quantidades de 0,10 e 0,99 %, respectivamente.

A ricina provoca a morte de um animal quando administrada por qualquer via em doses relativamente pequenas. A dose letal média da ricina bruta para o camundongo, por via intraperitoneal, é de 28 μg de nitrogênio por kilograma de peso corporal (55). Ricina provoca náuseas, diarréia, perda de apetite, prostração geral, convulção, hemorragia intestinal, e finalmente, parada dos sistemas respiratório e vasomotor (21,22).

Embora a ricina isolada não seja facilmente inativada quando seca, torna-se inócua quando aquecida com calor úmido (15). A toxidade da ricina é destruída quando uma solução aquosa desta albumina é aquecida até o ponto de fervura, ou até mesmo no ponto de coagulação da proteína (21).

A toxidez do farelo de mamona industrial, independente do processo de extração do óleo, tem sido demonstrada: a) injetando em animais de laboratório (cobaias,ratos), por via intraperitoneal e subcutânea, extrato protéico fisiológico do farelo (22,51); b) por teste de hemaglutinação (18,41); e c) através da alimentação de ratos e pintinhos com dietas contendo farelo de mamona (23). Contudo, o processamento da semente de mamona por prensagem tem resultado num farelo com menor toxidade,em comparação com o processo de extração com solvente (23). Isto se deve provavelmente, ao envolvimento de temperaturas mais elevadas na extração por prensagem, as quais provocam a desnaturação da ricina.

Vários tratamentos tem sido aplicado no farelo de mamona industrial para extração ou inativação do componente tóxico ricina. Segundo KODRAS E COL. (23), a autoclavagem com calor úmido a 125 ºC por 15 minutos, mostrou ser eficiente para destoxicar completamente o farelo, como evidenciado pelos testes de alimentação de ratos e pintinhos. Outros tra

tamentos físicos e químicos foram igualmente eficientes para destoxicação do farelo.

2.3.2.2. RICININA

Um alcalóide apresentando também atividade tóxica, denominado ricinina, tem sido encontrado na semente e farelo de mamona (23,58). Este composto é solúvel em água e álcool, mas pouco solúvel em éter e benzeno (58).

Segundo FONSECA (14), a ricinina foi isolada pela primeira vez por TUSON em 1864, e teve sua estrutura determinada por HENRY em 1949. WALLER (58) encontrou 0,02 % de ricinina no farelo de mamona industrial e 0,1 % no farelo preparado no laboratório. Já FULLER E COL. (15) encontraram 0,3 % no farelo industrial.

A ricinina, por ser considerada apenas como medianamente tóxica e estar presente no farelo em quantidades muito pequenas, não é considerada nociva, desde que seja usada nas rações em níveis moderados (18, 33). KODRAS E COL. (23) alimentando ratos e pintinhos com farelo de mamona autoclavado, não observaram qualquer evidência de intoxicação atribuível a ricinina. Segundo FULLER E COL. (15), pesquisadores japoneses demonstraram que a ricinina inibe o crescimento de pintinhos, quando são alimentados com grandes quantidades de farelo de mamona. Nas suas próprias investigações, FULLER E COL. (15) também evidenciaram o efeito adverso da ricinina no crescimento de pintinhos, demonstrando que o crescimento dos mesmos é retardado, quando doses elevadas de ricinina pura são incluídas nas suas dietas. Em pintinhos alimentados com ração contendo farelo de mamona, o efeito nocivo devido a ricinina somente foi evidenciado naqueles cujas rações continham níveis elevados de farelo, acima de 10 a 15%.

2.3.2.3. ALÉRGENO

2.3.2.3.1. SISTEMA IMUNOLÓGICO NOS ANIMAIS

Durante muitos anos a resposta imunológica foi vista como inteiramente favorável para o organismo vivo. Mais recentemente, numerosas observações mostraram que nem sempre uma reação imunológica era favorável ao organismo, pelo contrário, muitas vêzes prejudicava-o. Esse tipo de reação imunológica lesiva ao organismo denomina-se atualmente, reação de hipersensibilidade ou reação alérgica. O organismo, tecido ou célula capaz de apresentar uma reação de hipersensibilidade diz-se estar sensibilizado (5,42).

As reações alérgicas sendo reações imunológicas são extremamente específicas. O organismo sensibilizado reage exclusivamente com o determinante antigênico usado como imunógeno ou com estruturas semelhantes.

Um antígeno é definido como uma substância que apresenta duas características fundamentais (5,42):

a) capacidade de induzir a resposta imune num organismo vivo, que se denomina de imunogenicidade;

b) capacidade de reagir especificamente com os anticorpos ou linfócitos sensibilizados resultantes da sensibilização in vivo ou in vitro, que se denomina de antigenicidade ou especificidade antigênica.

O antígeno responsável pela reação alérgica ou reação de hipersensibilidade é frequentemente referido como alérgeno. Alergenicidade ou especificidade alergênica é a propriedade que tem o alérgeno de reagir especificamente com os anticorpos previamente sensibilizados (5,42).

Haptenos são substâncias que só induzem a resposta imune quan

do conjugados com outras substâncias imunogênicas. Substâncias complêxas, como polissacarídeos e várias substâncias de pequeno peso molecular e de estrutura muito simples, que, por sí só não são imunogênicas, podem funcionar como haptenos quando conjugadas quimicamente com proteínas. Quando o conjugado é injetado em animais, estes respondem com a síntese de anticorpos que reagem não apenas com o conjugado (hapteno-proteína) original, mas também com conjugados da mesma substância (hapteno) com outras proteínas, e mesmo com o hapteno isolado (5,42).

Os trechos da molécula antigênica ou antígeno aos quais os anticorpos se combinam são denominados determinantes antigênicos. Provavelmente, os determinantes antigênicos de proteínas naturais contem apenas 4 a 5 aminoácidos, ocupando somente uma diminuta fração do volume da molécula inteira (5,42).

A capacidade discriminadora dos anticorpos é de tão alto grau como igualmente as enzimas nas reações enzimáticas. A interação antígeno-anticorpo depende de forças intermoleculares não covalentes que se exercem eficazmente a distâncias muito curtas. Assim, a perfeição do encaixe do determinante antigênico com o sítio combinatório do anticorpo depende da complementariedade espacial de suas estruturas. Quanto mais perfeita a complementariedade, maior a área de contato entre as duas moléculas e maior a afinidade da combinação.

Imune-soro a um antígeno qualquer é o soro que reage especificamente contra aquele antígeno.

Por sugestão de HEREMANS, todas as proteínas que exibem atividade de anticorpo ou que se relacionam antigenicamente às moléculas de anticorpo são, hoje, designadas coletivamente de imunoglobulinas e, por proposta de um grupo de peritos da Organização Mundial da Saúde designam-se abreviadamente por Ig. As imunoglobulinas são classificadas em IgG, IgA,

IgM, IgD e IgE (5).

Os anticorpos da classe IgE são responsáveis pelos fenômenos anafiláticos em várias espécies e particularmente no homem. A molécula IgE é formada como resultado da sensibilização de linfócitos B pelo alérgeno. Os linfócitos B sensibilizados se diferenciam histologicamente, formando células plasmáticas secretoras de IgE. A IgE, como as demais imunoglobulinas, é formada de duas regiões: a região Fab, que é o sítio combinatório para o antígeno, e a região Fc, através da qual a imunoglobulina se liga ao mastócito ou basófilo. Num segundo contato haverá ligação do alérgeno com as regiões Fab das imunoglobulinas fixadas às células, fato que desencadeia uma série de modificações de membrana e reações bioquímicas, que culminam na liberação de grânulos contendo substâncias farmacologicamente ativas, como a histamina e serotonina. Estes mediadores induzem contração da musculatura lisa, vasodilatação e aumento da permeabilidade dos capilares (5,42).

A anafilaxia pode se apresentar como um fenômeno geral que atinge todo o organismo, como acontece sempre que o alérgeno é injetado por via intavenosa ou também como um fenômeno localizado, em que o alérgeno atinge determinado orgão ou tecido, por vias extravasculares. No primeiro caso denomina-se anafilaxia sistêmica (ou choque anafilático) e no segundo anafilaxia local. Mais frequentemente a anafilaxia se revela por fenômenos localizados, podendo instalar-se na pela, no aparelho respiratório ou no tubo digestivo (5).

A atopia é uma doença alérgica do tipo anafilática, provavelmente controlada geneticamente, existente em determinadas pessoas que se sensibilizam muito fácil e expontaneamente a um grande número de alérgenos presentes na natureza (5,42).

A anafilaxia cutânea passiva(ACP) é uma doença alérgica ou de hipersensibilidade localizada na pele,que consiste em sensibilizar uma pe

quena área da mesma com injeção intradérmica de anti-soro e, após um período de sensibilização adequado, injeta-se o alérgeno por via intravenosa juntamente com um corante, como o azul de Evans para facilitar a leitura da reação. O alérgeno atinge rapidamente o local sensibilizado, reage com o anticorpo IgE ligado aos mastócitos do tecido local, provocando a liberação de substâncias farmacologicamente ativas, tais como a histamina e serotonina, que produzem aumento da permeabilidade capilar local evidenciada pelo azulecimento da área (5,40).

2.3.2.3.2. CASOS DE ALERGIAS OU HIPERSENSIBILIDADE À MAMONA

Segundo SPIES (45) e JENKINS (22), foi ALILARE, em 1914, o primeiro a observar a hipersensibilidade humana à mamona. ALILARE teve de abandonar suas pesquisas com mamona devido a violência dos sintomas por ela causados, descritos pelo autor como coceira dos olhos, fotofobia, vermelhidão e edema da conjutiva, abundante lacrimejamento, fortes espirros, tosses, dispnéia, coceira e erupção da pele.

São numerosos os casos existentes na literatura médica e científica atribuindo ao farelo de mamona o aparecimento de centenas de sensibilizações alérgicas. Em 1923, foi relatado por BERNTON, um caso de sensibilidade ocupacional à semente de mamona, isto é, pessoas cujo trabalho consistia no manuseio da semente de mamona tornaram-se sensíveis a mesma (22).

FIGLEY E ELROD (13), em 1928, demonstraram que os sintomas asmáticos de 30 moradores de Toledo, Ohio, eram causados pelo pó de farelo lançado na atmosfera por uma fábrica de extração de óleo de mamona, instalada nas proximidades daquela cidade. A sensibilização ao alérgeno da semente de mamona pela inalação do pó foi demonstrada experimentalmente por

RATNER E GRUEHL, em 1929 (21).

Em 1930, VAUGHAN também julgou ter sido o alérgeno da mamona o agente causador de vários casos de asma em que as pessoas ficaram expostas a um fertilizante contendo farelo de mamona (21,47). Em 1945, foi relatado por BERNTON um caso de alergia intensa acometida por uma pessoa que a indispos para o trabalho por duas semanas, tendo como agente sensibilizante a proteína de semente de mamona (21).

Em 1949, KODRAS E COL. (23) registraram em seu trabalho sobre "Destoxicação do Farelo de Mamona" que vários funcionários do laboratório ficaram sensibilizados, necessitando de precauções especiais para o manuseio do farelo.

MENDES E COL. (30) no trabalho publicado em 1953, descreveram a ocorrência de um surto epidêmico extremamente grave de asma brônquica em agosto de 1952, na cidade de Bauru, estado de São Paulo, que causou 9 óbitos dos 150 casos notificados às autoridades sanitárias. Havia na cidade uma indústria de extração de óleo de mamona e o surto epidêmico coincidiu com as modificações introduzidas no método de extração do óleo para um maior aproveitamento. A modificação consistia em lavar a torta com o solvente hexana após a prensagem final. Esta modificação tornou mais fácil a formação e dispersão do pó durante o manuseio do farelo. Trinta pacientes foram submetidos a exames laboratoriais e ficou comprovado que o alérgeno da mamona era o agente etiológico daquele surto epidêmico.

ORDMAN descreveu um surto epidêmico de asma brônquica no sul da África, em que o pó de farelo de mamona eliminado de uma fábrica de processamento de óleo afetou 200 moradores da região (22).

FULLER E COL. (15), em 1971, relataram em seu trabalho que, muitas das pessoas residentes nas áreas onde o farelo de mamona estava sendo manuseado ficaram sensibilizadas ao pó proveniente do mesmo, com tal in-

tencidade que chegaram a apresentar efeitos respiratórios graves.

2.3.2.3.3. IDENTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ALÉRGENO

A atividade alergênica da mamona foi atribuída erroneamente por ALILAIRE, em 1914, à toxalbumina ricina. Porém, a presença de um agente alergênico distinto da ricina foi demonstrado em 1929, por RATNER E GRUEHL. Um ano depois, BARNARD preparou um extrato alergênico, não tóxico, cujo alérgeno mostrava-se solúvel em água, precipitável em álcool, estável ao calor e não dialisável. Uma fração alergênica e não tóxica foi isolada da semente de mamona por GRABAR E KONTSEFF em 1934, apresentando as mesmas propriedades descritas anteriormente por BARNARD,com exceção de que era dialisável. GRABAR E KONTSEFF mostraram que a casca, o caule e a folha da planta também continham alérgeno (21,22,45).

Uma fração glicoprotéica altamente alergênica e não tóxica denominada CB-1A (Castor Bean - Método 1A usado para o algodão), foi isolada do farelo de mamona desengordurado e destoxicado no laboratório por SPIES E COULSON (45). O rendimento desta fração foi igual a 1,8 % e apresentava as seguintes propriedades: solúvel em água, solúvel em etanol a 25 %, mas insolúvel neste mesmo solvente a 75 %, não precipitável com acetato básico de chumbo, parcialmente dialisável e estável em água fervente. A especificidade antigênica e alergênica do CB-1A é atribuída ao componente proteína (9).

Vários foram os trabalhos desenvolvidos na tentativa de fracionar o CB-1A e várias foram as investigações realizadas sobre a antigenicidade e alergenicidade das frações. Segundo DAUSSANT (10), em 1958,MOURGUE E COL. separaram as proteínas totais de sementes de mamona não germinadas, extraídas em pH 6,4 a 7,5 por eletroforese em papel e obtiveram sete fra-

ções, das quais quatro foram catódicas e três anódicas. BERRENS, em 1971, comparou a migração eletroforética de vinte-seis diferentes alérgenos e concluiu que os alérgenos atópicos eram glicoproteínas anódicas de movimento rápido, mas as proteínas alergênicas básicas das sementes de mamona constituiam uma exceção a este padrão geral. BERRENS também afirmou que o ponto isoelétrico das proteínas alergênicas das sementes de mamona estão situadas na faixa de pH básico. SOBOLEV E COL., em 1972, fracionaram extratos de sementes de mamona madura em cerca de nove bandas, pela combinação da eletroforese em gel de poliacrilamida e imunodifusão.

Uma fração glicoprotéica livre de glicídeos foi obtida do CB-1A, a qual ainda continha a especificidade antigênica ou antigenicidade, embora tivesse diminuído em onze vêzes a sua capacidade de sensibilização ou imunogênica (8,46). A mistura de proteínas livre de carboidratos obtida da fração CB-1A foi fracionada em quatro bandas pela eletroforese em gel de poliacrilamida e a análise de difusão em gel mostrou que todas as bandas continham um antígeno principal comum (31).

LAYTON E COL. (26) obtiveram da fração CB-1A seis frações distintas através da cromatografia em coluna de DEAE celulose, e que pelo teste de Schultz-Dale mostraram ser alergênicas. Através da eletroforese em papel, LAYTON E COL. (27) encontraram um mínimo de seis bandas, que se mostraram alergênicas no teste de anafilaxia cutânea passiva (ACP) aplicado em cobaias, mas apenas cinco bandas mostraram ser alergênicas para o homem.

SPIES E COULSON (52) encontraram dez sub-unidades na fração CB-1A, através da cromatografia de troca iônica e eletroforese em acetato de celulose. Todas as frações separadas apresentaram atividade antigênica, e embora quimicamente distintas possuiam uma especificidade antigênica principal comum para todas as frações. Com relação a atividade alergênica, houve evidências de que a especificidade antigênica principal comum em

todas as frações seja também o principal alérgeno, embora seja possível que cada antígeno quimicamente diferente funcione como um alérgeno diferente. Um mínimo de oito antígenos foi encontrado por SPIES (54) pelo teste de difusão em gel nas bandas eletroforéticas do CB-1A. SPIES E BARRON (53) obtiveram seis frações através da análise eletroforética em acetato de celulose do CB-1A, sendo que quatro destas frações apresentaram uma especificidade antigênica principal comum ou idêntica. O antígeno principal foi estimado em 85 % do complexo total obtido do primeiro fracionamento eletroforético do CB-1A.

DAUSSANT E COL. (10) identificaram pelo menos sete antígenos principais num extrato protéico total fisiológico de mamona madura não germinada, mediante análise imunoeletroforética. A fração CB-1A foi identificada no extrato protéico total e continha um antígeno principal e pelo menos dois antígenos menores. Alguns antígenos das sementes de mamona dormentes desapareceram significantemente após seis dias de germinação, mas o antígeno principal do CB-1A continuava ainda presente.

TRUGO (56) fracionou o CB-1A em sete frações usando coluna de Sulfopropil Sephadex e sistema tampão em gradiente de pH. Todas as frações apresentaram atividade alergênica no teste de anafilaxia cutânea passiva (ACP).

GARCIA (17) isolou e purificou da fração CB-1A um componente chamado por ela de CB-11a1 SF3, usando cromatografia de troca iônica, eletroforese e eletrofocalização em gel de poliacrilamida. Esse componente se mostrou alergênico no teste de anafilaxia cutânea passiva (ACP), e apresentou uma linha de precipitação no teste de imunodifusão em gel com antisoro CB-1A de coelho.

O CB-1A é definido como uma mistura complêxa de proteínas de baixo peso molecular e proteínas complexadas com diversas proporções de po

lissacarídeos e que contém pelo menos um componente alergênico principal. Os componentes da fração CB-1A são imunologicamente diferentes de outros antígenos da semente de mamona (8,45,46,48).

A fração CB-1A tem induzido a formação de anticorpos no homem, e em alguns casos induziu a formação temporária de anticorpos do tipo reagina e causou sensibilização cutânea (50). Reações cutâneas positivas foram obtidas em pessoas sensibilizadas à mamona com solução a 1 % de CB-1A diluída em 1 : 10^6. Reações de transferência passiva positiva foram induzidas em pessoas não sensibilizadas à mamona com 10^{10} g de CB-1A (45).

As proteínas da fração CB-1A são caracterizadas pela ausência do aminoácido triptofano e a presença de proporções relativamente altas de arginina e ácido glutâmico (48). No que se refere ao conteúdo do CB-1A no farelo de mamona encontrou-se diferença nos dados apresentados na literatura, os quais dependem da espécie e variedade da semente, do procedimento de extração do óleo e do método usado para avaliar o seu teor. SPIES E COULSON (45) isolaram o CB-1A do farelo de mamona preparado no laboratório apartir da variedade doméstica, obtendo rendimento de 1,8 %. Usando o mesmo procedimento para isolamento do CB-1A, SPIES E COL. (47) alcançaram rendimento de 0,45 % a partir de farelo de mamona comercial. WALLER E NEGI (58), em 1958, obtiveram conteúdo de 1 % para farelo preparado no laboratório e 0,5 % para farelo comercial. COULSON E COL. (9) reportaram conteúdo de 6 a 9 % para farelos destoxicados preparados no laboratório e 0,09 a 4,2 % para farelos comerciais.

2.3.3. USO DO FARELO DE MAMONA DESTOXICADO COMO RAÇÃO ANIMAL

Vários métodos tem sido empregados visando remover ou inativar os componentes tóxicos da mamona. Segundo KODRAS E COL. (23) e PERRONE E

COL. (41), vários tratamentos foram sugeridos por diversos pesquisadores entre os anos de 1934 a 1957 visando a destoxicação do farelo de mamona.

Nos testes de alimentação de ratos e pintinhos, KODRAS E COL. (23) demonstraram que as proteínas de farelo de mamona destoxicado são de baixo valor biológico. Aqueles autores observaram que, tanto os ratos como os pintinhos não apresentaram crescimento normal quando o farelo de mamona destoxicado foi a principal fonte protéica da ração, concluindo ser as proteínas de mamona de baixa qualidade.

RAIMO, em 1958 (citado por LAUN E COSTA, 24), estudou a possibilidade de se utilizar o farelo de mamona destoxicado até o máximo de 15 % do total da ração destinada para a alimentação de pintos. Além deste limite, RAIMO constatou crescimento retardado e elevada mortalidade nos pintos. O autor atribuiu como causa do retardamento no crescimento dos pintos o alto teor de fibras das rações que é incluída no farelo de mamona. A elevada mortalidade dos pintos o autor atribuiu como sendo possivelmente à intoxicação progressiva ocasionada pela ingestão de farelo de mamona destoxicado apenas parcialmente.

GADÊLHA E COL. (16) em estudos sobre a substituição parcial de concentrado comercial por farelo de mamona atoxicado em rações de frango de corte, observaram que a eficiência alimentar das rações melhorou proporcionalmente com o aumento de farelo de mamona até um máximo de 8 %, a partir do qual o efeito foi negativo. Foi observado também que o custo de produção da ração abaixou em mais de 13 % com a inclusão de 8 % de farelo de mamona atoxicado. Os autores concluiram que o nível de farelo a ser acrescentado nas rações avículas depende, principalmente, do teor de fibra dos outros ingredientes.

LAUN E COSTA (24) estudaram o emprego do farelo de mamona destoxicado na alimentação de galinhas poedeiras em quantidades de 5 , 10 e

15 % da ração. Os autores verificaram que mesmo com somente 15 % de farelo de mamona destoxicado a postura foi sensivelmente reduzida, embora sem diminuição do peso vivo das galinhas ao final do experimento. Porém, com 10 e 15 % de farelo de mamona destoxicado, além de menor postura ocorreu também pequena diminuição do peso vivo. Os autores atribuiram tal fato como sendo, aparentemente, devido ao elevado teor de fibras do farelo de mamona. Em vista dos resultados apresentados não é aconselhável incluir farelo de mamona na preparação de rações para galinhas poedeiras. Estes mesmos autores mencionaram que, em experimentos anteriores, farelo de mamona destoxicado foi usado em percentagens de 2,5 a 10 % em rações para pintos, e os resultados foram comparáveis ao da ração controle do experimento. Elevando os níveis de farelo de mamona, porém, foi observado decréscimo da eficiência, atribuída pelos autores à elevação do teor de fibra na ração.

Segundo VILHJALMSDOTTIR E FISHER (57), farelo de mamona destoxicado tem sido usado no nível de 10 % em rações destinadas ao gado bovino de corte e nenhum efeito doentio foi observado, mas quando usado no mesmo nível como fonte protéica complementar para gado leiteiro, a manteiga produzida do leite destas vacas apresentou viscosidade ligeiramente aumentada e teor de iodo reduzido. Contudo, o gado bovino de corte alimentado com ração contendo 10 % de farelo de mamona ingeriu menor quantidade de ração que o gado alimentado com ração contendo o mesmo nível de farelo de algodão, e o crescimento foi correspondentemente menor.

Estudos comparativos do uso do farelo de mamona atoxicado, de soja e de algodão como fonte protéica para gado leiteiro foram realizados por NAUFEL E COL. (39). O experimento foi realizado com doze vacas em lactação, por um período de 84 dias, sendo usadas rações contendo o mesmo nível protéico. Os animais foram mantidos em estabulação permanente, recebendo feno de Jaraguá como alimento volumoso e as rações contendo farelo

de mamona, de soja e de algodão como concentrados, em quantidade ajustada semanalmente de acordo com a produção de leite, na base de 1 kg por 2,5 kg de leite produzido. Os animais foram submetidos a duas ordenhas diárias e pesagens semanais. Os resultados obtidos indicaram que, pelo menos em períodos de curta duração, como neste experimento, o farelo de mamona atoxicado pode ser utilizado como fonte proéica em igualdade de condições com os farelos de algodão e de soja, na alimentação de vacas em lactação. Durante todo o experimento não foram observados fenômenos de natureza tóxica nem de recusa dos animais para qualquer dos três farelos estudados.

Experimentos semelhantes com vacas leiteiras foram realizados por ASSIS E COL. (3,4), em que o farelo de mamona foi comparado com os farelos de amendoim e algodão. O tempo de duração do experimento foi de 56 dias, durante os quais não foi observado nenhum fenômeno tóxico. Os resultados do consumo de alimentos, da variação do peso vivo e da produção de leite, interpretados estatisticamente, revelaram não ter ocorrido diferenças significantes entre os três farelos estudados, evidenciando que o farelo de mamona atoxicado pode ser utilizado como suplemento protéico na alimentação de vacas leiteiras.

2.3.4. DESALERGENIZAÇÃO DO FARELO DE MAMONA

Que o alérgeno da mamona pode ser repassado dos animais para o homem foi demonstrado em estudos com peixe. LAYTON (29), em 1977, detectou a presença de antígeno alergênico em músculos de peixes alimentados com ração contendo até 50 % de farelo de mamona comercial, quantidade considerada suficiente para provocar manifestações alérgicas envolvendo o aparelho respiratório em pessoas já sensibilizadas através do pó do farelo de

mamona.

Em 1960, foi publicado por GARDNER E COL. (18), os resultados do primeiro trabalho visando não somente a destoxicação, mas também, a desalergenização do farelo de mamona. Os autores desenvolveram métodos práticos de tratamento que poderiam ser combinados com os processos convencionais de extração do óleo por solvente. Os tratamentos envolveram cozimento da semente moída crua ou do farelo, sob várias condições de temperatura e umidade, com ou sem substâncias químicas como hidróxido de sódio, ácido clorídrico, hipoclorito de sódio, formaldeído, amônia, sulfato de amônia, permanganato de potássio, uréia e com várias combinações desses agentes químicos. Foram feitos ainda tratamentos biológicos incluindo fermentação aeróbica e digestão enzimática. Os autores apontaram como mais efetivos na redução do teor do alérgeno os seguintes tratamentos:

1. Aquecimento à seco do farelo a 205 ºC por 125 minutos.

2. Cocção da semente moída úmida (16 %) a 80 ºC por 15 minutos com 2 % de hidróxido de sódio e 10 % de formaldeído.

3. Cocção da semente moída úmida (16 %) a 80 ºC por 4 minutos, com 0,9 % de ácido clorídrico e 3 % de formaldeído.

4. Cocção da semente moída úmida (20 %) na autoclave a 125 ºC por 15 minutos, com 2 % de hidróxido de sódio.

5. Cocção da semente moída úmida (16 %) a 100 ºC por 15 minutos, com 1 % de hidróxido de sódio.

As correspondentes percentagens de redução do conteúdo do alérgeno para os cinco tratamentos mais eficientes mencionados acima foram de 100 , possivelmente 100 , 100 , 100 e 98,4 % respectivamente, segundo o teste de imunoprecipitação. Quando avaliado pelo teste Schultz-Dale os mesmos tratamentos resultaram em reduções de possivelmente 100 , 99,9 , 99,9 e 100 % respectivamente, não sendo mencionada a percentagem de redu-

ção para o último tratamento. Embora considerando o teste Schultz-Dale como razoavelmente acurado, GARDNER E COL. (18) sugerem que os testes finais indicativos da presença ou ausência de alérgeno residual no farelo de mamona tratado sejam feitos com seres humanos.

A SANBRA (Sociedade Algodoeira do Nordeste Brasileiro) (44), um dos principais produtores de óleo de mamona, a partir de 1960, apresentou ao mercado brasileiro um produto denominado "Lex Protéico", que é um farelo de mamona destoxicado e desalergenizado (7,41). O Lex protéico segundo a SANBRA é tratado com calor úmido, contudo não são mencionadas as condições de tratamento, nem os graus de inativação.

No tratamento do isolado alergênico (CB-1A)E e do farelo de mamona com diferentes concentrações de $Ca(OH)_2$, SPIES E COL. (51) determinaram as condições necessárias de temperatura, tempo e pH para inativar o alérgeno da mamona. O grau de desalergenização foi medido através dos testes de imunoprecipitação, anafilaxia cutânea passiva e teste cutâneo direto, os quais são usados para avaliar a perda das propriedades do alérgeno de imunoprecipitação, capacidade de neutalizar a reagina e reatividade cutânea direta, respectivamente. No aquecimento a 100 ºC de uma solução a 10 % de isolado alergênico (CB-1A)E com uma concentração 0,028 M de $Ca(OH)_2$, 4 minutos foram suficientes para inativar a propriedade imunoprecipitante do antígeno, porém as propriedades alergênicas de reatividade cutânea direta e capacidade de neutralizar a reagina foram inativadas somente aos 32 minutos de tratamento. Quando o aquecimento da solução a 10 % de isolado alergênico (CB-1A)E com igual concentração de $Ca(OH)_2$ foi feito a 120 ºC, a propriedade imunoprecipitante continuou a ser inativada após 4 minutos, porém 8 e 16 minutos foram requeridos para inativar as propriedades alergênicas de neutralização da reagina e reatividade cutânea, respectivamente. No tratamento a 100 ºC por 32 minutos de uma mistura de

farelo em água (26 %), foram necessárias concentrações de 8 e 16 % de $Ca(OH)_2$ (calculado sobre o peso do farelo) para inativar, respectivamente, as propriedades imunoprecipitante e reatividade cutânea. O aquecimento de igual mistura farelo-água em temperatura mais alta igual a 120 ºC, inativou a propriedade de reatividade cutânea do alérgeno em tempo mais curto de 8 minutos e menor concentração de $Ca(OH)_2$ igual a 8 %.

MOTTOLA E COL. (32) alcançaram bons resultados em 11 dos 54 diferentes processos estudados, utilizando o hidróxido de cálcio combinado com calor úmido e pressão para tratamento do farelo de mamona. O teste de avaliação por eles empregado foi a anafilaxia cutânea passiva (ACP), em cobaias, injetando o antígeno por via intravenosa. Todos os extratos protéicos dos onze farelos tratados eficientemente deram ACP 1+ ou menos, equivalendo a uma redução parcial do conteúdo de antígeno de 0,0001 ou menos em relação ao farelo não-tratado. O tratamrnto em que se usou 8 % (p/p) de $Ca(OH)_2$ e autoclavagem a 140 ºC por 60 minutos e uma mistura de farelo-água 1 : 3 (p/v) foi recomendado pelos autores como sendo o mais seguro. Contudo, os autores não declararam decisivamente que, com estes tratamentos os farelos estariam totalmente desalergenizados para o homem.

Mais tarde, MOTTOLA E COL. (36), reproduzindo as condições de tratamento do trabalho anterior (32), obtiveram semelhante desalergenização do farelo em condições mais moderadas de tratamento, especificadas como segue: 4 % de hidróxido de cálcio (p/p) e autoclavagem a 120 ºC por 15 minutos, usando uma mistura farelo-água na proporção de 1 : 2 (p/v). Os autores atribuiram tal ocorrência ao uso de uma técnica de anafilaxia cutânea passiva mais sensível e reproduzível (33), que consistia em injetar o antígeno por via intradérmica, ao invés da via intravenosa empregada no trabalho anterior.

Em 1971, MOTTOLA E COL. (34) avaliaram o efeito de tratamentos

hidrotérmicos sobre uma mistura de farelo de mamona-água na proporção de 2 : 1 (p/v). O efeito de tratamentos a 114, 125 , 140 e 161 ºC por tempos de 15 , 30 e 60 minutos, foi avaliado mediante teste de ACP em cobaias. Todos os farelos tratados apresentaram atividade anafilática, embora tenha sido observada a diminuição parcial desta propriedade em comparação com o farelo não-tratado. Alguns anos antes, JENKINS (22) havia também estudado o efeito do tratamento hidrotérmico sobre os compostos alergênico e tóxico do farelo de mamona. Os testes usados para avaliar a alergenicidade do farelo de mamona tratado indicaram que, o tratamento a 100 ºC por 60 e 105 minutos destruiu as propriedades do alérgeno de produzir sensibilização e choque anafilático em cobaias. Num teste de alimentação foi mostrado que, ratos alimentados com uma dieta contendo caseína e proteína de farelo de mamona (1 : 1) tratado a 89 ºC por 90 minutos apresentavam-se em boas condições após 4 semanas de ensaio. Porém, a taxa de crescimento e o ganho de peso foram significantemente mais baixos em relação a dieta controle. A toxidade do farelo tratado a 100 ºC por 60 minutos foi reduzida parcialmente, contudo o nível de toxidade do farelo usado no teste de alimentação não foi determinado.

No tratamnto do farelo de mamona com hidróxido de amônia, MOTTOLA E COL. (35) observaram que o grau de destruição do antígeno obtido por este processo era comparável com àqueles obtidos com calor úmido e pressão (34).

O efeito dos diversos tratamentos sobre os aminoácidos essenciais das proteínas de farelo de mamona também foi avaliado por MOTTOLA E COL.. Todos os tratamentos (32,34,35,36) afetaram em diferentes graus os aminoácidos cistina, serina, treonina, arginina, metionina e lisina. A arginina foi parcialmente convertida em ornitina durante a autoclavagem combinada com hidróxido de cálcio. O efeito da simples autoclavagem combina-

da com hidróxido de cálcio sobre os aminoácidos foi maior que o tratamento com amônia. MOTTOLA E COL., apesar de considerarem a ACP aplicada em animais de laboratório como um bom teste imunológico para avaliar a perda de atividade do alérgeno no farelo tratado, sugerem que os testes alérgicos finais sejam feitos diretamente em pessoas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS

1) Farelo de mamona (Ricinus communis L.) de origem industrial, subproduto da indústria de extração de óleo de mamona. O farelo denominado nº 2 (Tabela 11) foi escolhido aleatoriamente para os tratamentos de inativação dos compostos alergênicos.

2) Farelo de mamona (Ricinus communis L.) preparado no laboratório. As sementes foram fornecidas pela Secção de Oleaginosas do Instituto Agronômico de Campinas.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE MAMONA INDUSTRIAL

3.2.1. UMIDADE

A umidade do farelo de mamona industrial foi determinada pelo método Bd 2-52 da AOCS (1).

3.2.2. CINZA

Foi determinada pelo método Ba 5-49 da AOCS (1).

3.2.3. ÓLEO

A determinação do óleo foi feita no aparelho Goldfish usando-se o método Bd 3-52 da AOCS (1).

3.2.4. FIBRA BRUTA

Na determinação da fibra bruta usou-se o método Ba 6-61 da AOCS (1).

3.2.5. PROTEÍNA

O método utilizado foi o Kjeldhal modificado Ba 4-38 da AOCS (1). O fator de conversão de nitrogênio total para proteína foi 6,25 , recomendado para proteína de mamona.

3.2.6. AMINOÁCIDOS

As determinações de aminoácidos totais foram realizadas em Analisador de Aminoácidos Beckman 119-CL com as seguintes características de operação:

Comprimento da coluna de vidro: 6 x 460 mm

Comprimento da resina: 220 mm

Tipo de resina: H3 (Beckman)

Tampões: pH 3,25 0,20 N Na^+, contendo 1 % de 2-propanol

pH 3,95 0,20 N Na^+

pH 6,40 1,00 N Na^+

Taxas de fluxo: 44 mL/h - tampões

22 mL/h - ninidrina

Temperaturas da coluna: 50 ºC - inicial

65 ºC - final

Tempo de análise: 92 minutos, incluindo a limpeza da coluna.

3.2.6.1. PREPARO DA AMOSTRA

Foram passadas amostras de farelo contendo aproximadamente 25 mg de proteínas, em tubo pirex, acrescentando ácido clorídrico 6 N (1/1000 p/v) de modo a eliminar todo o ar do tubo. A hidrólise foi realizada a 110 ± 1 ºC por 22 horas. Após o tempo de hidrólise ter-se completado, as amostras foram esfriadas e filtradas em funil de vidro sinterizado superfino, completando-se o volume para 100 mL. Deste volume retirou-se uma alíquota de 20 mL, a qual foi evaporada duas vêzes para eliminação do ácido clorídrico, em rota-evaporador. 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 para serem injetadas no analisador automático.

3.2.6.2. MISTURA PADRÃO

Foi utilizada uma mistura de calibração obtida da Beckman Instruments contendo 0,05 μmol/100 μL dos seguintes aminoácidos: L-lisina, L-histidina, sulfato de amônia, L-arginina, ácido L-aspártico, 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 da L-cistina foi de 0,025 μmol/100 μL.

Para quantificação todas as análises foram monitoradas pela mistura padrão.

3.2.6.3. ANÁLISE AUTOMATIZADA E CÁLCULOS

Alíquotas de 100 μL de hidrolizado, previamente filtradas em membrana Millipore 0,2 μm, foram injetadas no analisador automático Beck-

man 120-CL. A mistura de aminoácidos foi eluída com sistema de três tampões de citrato de sódio pH 3,25 , 3,95 e 6,40 , respectivamente, em forma descontínua e formando um gradiente de concentração de Na^+ de 0,2 até 1 N. O programa de eluição automática teve uma duração de 90 minutos. As áreas dos picos dos aminogramas gerados foram integrados manualmente e as concentrações de cada aminoácido calculadas por comparação com um aminograma padrão obedecendo a relação

$$\frac{Cx}{Cp} = \frac{Ax}{Ap} ,$$

onde Cx e Cp são as concentrações de um aminoácido qualquer na solução problema e na solução padrão, respectivamente, e, Ax e Ap as áreas sob os picos correspondentes.

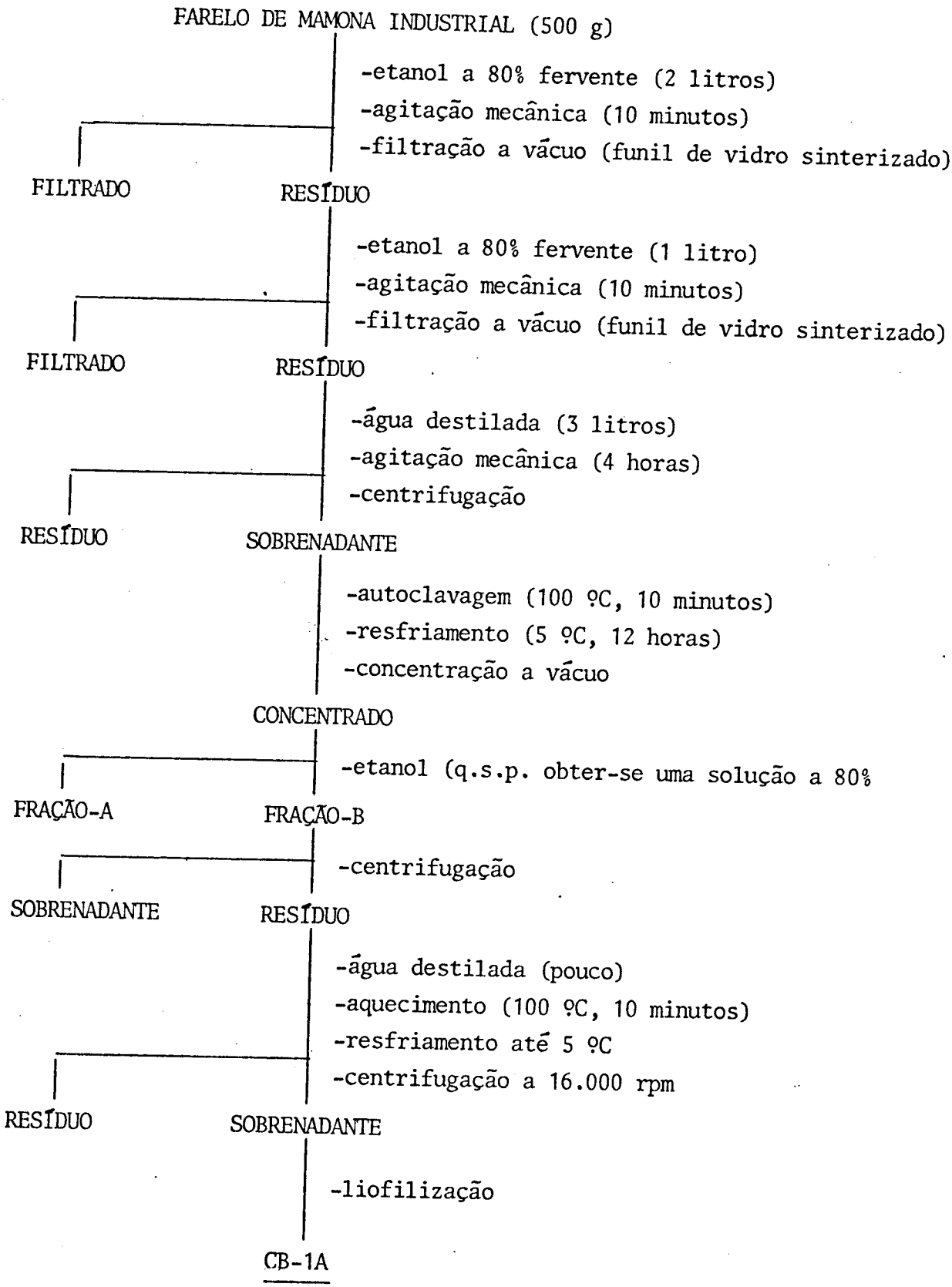
Com a finalidade de se expressar os resultados em termos de gramas de aminoácido por 16 gramas de nitrogênio total, foi necessário determinar nitrogênio total nessas amostras específicas, como indicado no ítem 3.2.5..

3.3. EXTRAÇÃO DO CB-1A (ALÉRGENO DA MAMONA) E PREPARO DO ANTI-SORO CB-1A

O CB-1A foi extraído do farelo de mamona de origem industrial por E. A. Kumagai em nosso laboratório da FEA, segundo a técnica de SPIES E COULSON (45) desenvolvida com base nas propriedades do alérgeno de ser estável à fervura em água, solúvel em etanol a 25 % mas insolúvel a 75 %, e não precipitável por acetato básico de chumbo. Esta fração, que contém os principais alérgenos da semente de mamona (8,45,46,48) foi denominada por SPIES E COULSON de CB-1A. Na Figura 1 apresenta-se o esquema geral para isolamento do CB-1A .

O anti-soro CB-1A, fornecido pelo Prof. Dr. Moysés A. Fuks do

FIGURA 1. Esquema de isolamento do CB-1A (45).



Instituto de Microbiologia da UFRJ, foi preparado num lote de quatro coelhos, inoculando-se uma suspensão do alérgeno CB-1A a 2 % e coadjuvante Freund por via sub-cutânea. Todos os coelhos foram submetidos a uma prova em branco antes de iniciadas as inoculações.

3.4. TRATAMENTO DO FARELO DE MAMONA INDUSTRIAL PARA INATIVAÇÃO DO ALÉRGENO

Amostras de farelo de mamona industrial foram submetidas a tratamentos hidrotérmicos conjugados ou não com ácido ou álcali para inativar o alérgeno do farelo. O teor de umidade em todas as amostras foi ajustado para 20 % com água destilada antes do tratamento hidrotérmico.

3.4.1. SIMPLES AUTOCLAVAGEM (COM CALOR ÚMIDO)

Amostras de farelo de mamona foram autoclavadas na temperatura constante de 121 ºC,variando-se o tempo de autoclavagem, como segue: 10 , 20 , 30 , 40 , 50 e 60 minutos.

3.4.2. AUTOCLAVAGEM (COM CALOR ÚMIDO) CONJUGADA COM ÁCIDO CLORÍDRICO

Amostras de farelo de mamona industrial foram tratadas com quantidades diferentes de ácido clorídrico (p/p) e autoclavadas após 24 horas em temperatura constante de 121 ºC, variando-se o tempo de autoclavagem. As condições desses tratamentos são mostradas a seguir:

Ácido clorídrico (p/p): 0,5 , 1,0 , 2,0 e 4,0 %.

Autoclavagem: Temperatura de 121 ºC.

Tempos de: 10 , 20 , 30 , 40 , 50 e 60 minutos.

3.4.3. AUTOCLAVAGEM (COM CALOR ÚMIDO) CONJUGADA COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO

Amostras de farelo de mamona industrial foram tratadas com quantidades diferentes de hidróxido de sódio (p/p) e autoclavadas após 24 horas em temperatura constante, variando-se o tempo de autoclavagem. As condições desses tratamentos estão a seguir:

Hidróxido de sódio (p/p): 0,5 , 1,0 , 2,0 e 4,0 %.

Autoclavagem: Temperatura de 121 ºC.

Tempos de: 10 , 20 , 30 , 40 , 50 e 60 minutos.

3.5. PREPARO DO EXTRATO AQUOSO DO FARELO DE MAMONA

3.5.1. PROCEDIMENTO

Uma quantidade (5 g) de farelo de mamona foi misturada com 50 mL de água destilada e agitada continuamente durante 1 hora em pH constante igual a 7. Posteriormente, a mistura foi passada duas vêzes em papel de filtro comum, e no filtrado obtido adicionou-se cloreto de sódio q.s.p. formar um extrato aquoso fisiológico (0,85 %) e conservante azida sódica q.s.p. obter-se uma concentração de 100 p.p.m..

Para o ajuste do pH durante a homogenização da mistura farelo-água, foram usadas soluções de ácido clorídrico 0,5 N e 6 N e soluções de hidróxido de sódio 0,5 N e 6 N. Todos os extratos foram congelados e assim mantidos até o momento dos testes de avaliação.

3.5.2. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NO EXTRATO

Em todos os extratos obtidos das amostras de farelo de mamona

foram feitas determinações de proteína total, usando-se o método Kjeldhal (%N . 6,25) modificado Ba 4-38 da AOCS (1). As determinações foram feitas antes da adição do cloreto de sódio e conservante azida sódica, e usou-se 10 mL de extrato.

3.6. MÉTODO PARA AVALIAR A TOXIDADE DO FARELO DE MAMONA

A toxidade do farelo de mamona foi avaliada em cobaias, injetando-se por via intraperitoneal extrato aquoso preparado de acordo com o ítem 3.5., em doses de 10 , 15 e 24 μg de proteína/g de peso do animal. Usou-se animais adultos para o teste e o volume de extrato injetado não foi superior a 1 mL. As aplicações foram feitas com seringa de 1 mL e agulhas de bisel curto.

Interpretou-se como tóxicas aquelas amostras que mataram os animais durante um período de 7 dias (22).

3.7. MÉTODOS PARA AVALIAR A ATIVIDADE DO ALÉRGENO NO FARELO DE MAMONA

3.7.1. MÉTODO DE DIFUSÃO DUPLA EM GEL DE AGAR (DDGA)

É um método imunoquímico desenvolvido por Ouchterlony que avalia a presença de um antígeno numa determinada amostra em função de sua propriedade imunoprecipitante, que é a capacidade que tem o antígeno de precipitar soros imunes específicos. A capacidade imunoprecipitante é uma propriedade denominada antigênica ou de antigenicidade (5,42).

Segundo este método o antígeno e anticorpo colocados em escavações feitas no gel de agar se difundem um contra o outro, formando linhas de precipitação visíveis quando são atingidas as proporções ótimas de an-

tígenos e anticorpos (5,42).

3.7.1.1. SOLUÇÕES ALERGÊNICAS PARA AVALIAÇÃO

A) EXTRATO AQUOSO DE FARELO DE MAMONA

Foi preparado um extrato aquoso inicial contendo 2 mg de proteína (%N . 6,25) por mL. A partir desse extrato procedeu-se o preparo de onze diluições em séries na proporção de 1 : 2 (uma parte do extrato para uma parte do diluente). Usou-se como diluente uma solução salina fisiológica contendo 100 p.p.m. de conservante azida sódica.

B) CONDENSADO DO DESTILADO AO VAPOR

Os condensados obtidos no ítem 3.9.1. foram usados diretamente no teste de difusão dupla em gel de agar.

3.7.1.2. TÉCNICA DE ENSAIO

Gel de agar a 3 % foi previamente preparado, cortado em cubos de mais ou menos 7 mm de lado e lavado em água destilada durante 30 dias, trocando-se a água de lavagem de 5 em 5 dias. Após esse período, a água de lavagem foi removida e o gel guardado a seco na temperatura de geladeira para ser usado quando necessário. No momento de execução do teste, o gel de agar foi diluído para 1,5 % com água destilada, em água fervente. Acrescentou-se cloreto de sódio q.s.p. 0,85 % (solução salina fisiológica) e conservante azida sódica q.s.p. 100 p.p.m., e aplicou-se sobre lâminas de vidro de 26 x 76 mm, dentro de câmara úmida na temperatura ambiente.

Decorridos mais ou menos 20 minutos, foram escavados no gel três orifícios circulares periféricos e um orifício central de cerca de três milímetros (3 mm) de diâmetro, com o auxílio de um aparelho perfurador.

No orifício central foi aplicado um volume de 20 μL de anti-soro CB-1A, preparado conforme descrição no ítem 3.3., e também 20 μL da amostra a ser testada nos três orifícios periféricos. A seguir, as lâminas foram colocadas em câmara úmida na temperatura ambiente. A leitura foi feita 24 horas após o enchimento das lâminas.

3.7.1.3. INTERPRETAÇÃO

A presença de uma ou mais linhas de precipitação, detectada(s) a olho nu com o auxílio de um foco de luz, foi considerada como indicação de reação entre o antígeno e o anticorpo específico, revelando a presença de antígeno na amostra analisada. Contudo, embora a combinação antígeno-anticorpo revele a atividade do antígeno in vitro, não podemos concluir que este ainda esteja biologicamente ativo e capaz de causar efeitos fisiológicos nocivos ao organismo vivo. Além disso, esse teste não informa se o antígeno detectado é ou não alérgeno (5,42).

3.7.2. MÉTODO DE ANAFILAXIA CUTÂNEA PASSIVA (ACP)

A anafilaxia cutânea passiva (ACP) é uma reação alérgica ou reação de hipersensibilidade cutânea do tipo imediato, que consiste em sensibilizar uma pequena área da pele do animal com injeção intradérmica de anti-soro e injetar, após um período de sensibilização adequado, o alérgeno (antígeno) por via intravenosa, juntamente com um corante para facilitar a leitura da reação. O alérgeno (antígeno) atinge rapidamente o local

sensibilizado e reage com o anticorpo imunoglobulina E (Ig E) específico ligado aos mastócitos do tecido local, provocando a liberação de substâncias farmacologicamente ativas como a histamina e sorotonina, as quais produzem aumento da permeabilidade capilar local evidenciada pelo azulecimento da área (5,40,42).

A propriedade anafilática é uma propriedade denominada de alergênica ou de alergenicidade, específica dos antígenos chamados alérgenos (5,28,32,40,42).

O animal de teste foi o camundongo e para sensibilizá-lo usou-se anti-soro CB-1A preparado em coelhos, conforme descrito no ítem 3.3..

3.7.2.1. SOLUÇÕES ALERGÊNICAS PARA AVALIAÇÃO

A) EXTRATO AQUOSO DE FARELO DE MAMONA

Foi preparado um extrato aquoso contendo 2 mg de proteína (%N. 6,25) por mL. Usou-se solução salina fisiológica contendo 100 p.p.m. de conservante azida sódica como diluente.

B) CONDENSADO DO DESTILADO AO VAPOR

Os condensados obtidos no ítem 3.9.1. foram usados diretamente no teste de anafilaxia cutânea passiva (ACP).

3.7.2.2. TÉCNICA DE ENSAIO

No dorso do animal, raspado 24 horas antes, foi injetado intradermicamente 0,05 mL de anti-soro CB-1A obtido conforme ítem 3.3.. Após

um período de sensibilização de 3 horas, foi injetado por via intravenosa 0,6 mL de uma mistura composta de 0,3 mL de amostra e 0,3 mL da solução de corante azul de Evans 0,5 % em salina fisiológica. O animal foi sacrificado 30 minutos depois, deslocada imediatamente a pele da região de prova e, finalmente, foi medido o diâmetro da mancha de corante no lado interno da pele (5,28,32,40,42).

3.7.2.3. INTERPRETAÇÃO

A presença de manchas azuladas na parte interna da pele do dorso do animal, nos pontos de injeção de anti-soro CB-1A, foi considerada como reação ACP positiva, indicando ter havido reação alérgica do tipo anafilática naquele local da pele do animal. A positividade da reação revela a presença do alérgeno (antígeno da mamona) na amostra, e que o mesmo se encontra biologicamente ativo (5,28,32,40).

Os resultados desse teste foram representados po cruzes, adotando-se a seguinte convenção (40):

(-) ausência de mancha;

(±) mancha com diâmetro igual ou inferior a 4,9 mm;

(+) mancha com diâmetro de 5 a 9,9 mm;

(++) mancha com diâmetro de 10 a 14,9 mm;

(+++) mancha com diâmetro de 15 a 19,9 mm;

(++++) mancha com diâmetro igual ou superior a 20 mm;

sendo tomada a média de três medições em cada caso.

3.8. ENSAIO BIOLÓGICO

Duas das amostras de farelo de mamona industrial tratadas no

laboratório respectivamente com ácido clorídrico e hidróxido de sódio, e posteriormente autoclavadas, foram selecionadas para serem usadas como fonte protéica complementar da caseína em dietas destinadas para alimentação de ratos nos ensaios biológicos.

3.8.1. PREPARO DO FARELO DE MAMONA INDUSTRIAL PARA ALIMENTAÇÃO DE RATOS

Quantidades suficientes de farelo de mamona industrial destinadas à alimentação de ratos foram trituradas no moedor de café Braun durante 30 segundos e passadas em peneira Tyler 28. Com esse procedimento eliminou-se aproximadamente 41 % de resíduo, constituído principalmente por fragmentos das cascas das sementes de mamona que resistiram ao processo de moagem.

Posteriormente, porções distintas de farelo de mamona industrial moído e peneirado foram tratadas com 0,5 % (p/p) de ácido clorídrico e 0,5 % (p/p) de hidróxido de sódio, respectivamente, ajustada a umidade para aproximadamente 20 % com água destilada e autoclavadas a 121 ºC por 60 minutos (ítem 3.4.). Após o tratamento, ajustou-se o pH de ambos os farelos para a neutralidade, usando-se soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio. Em seguida, os farelos foram secados na estufa a 80 ºC durante 20 minutos. O teor protéico total dos farelos,preparados como descrito anteriormente, foi determinado pelo método de Kjeldhal modificado Ba 4-38 da AOCS (1).

3.8.2. PREPARO DAS DIETAS

A composição teórica de cada dieta e das misturas salina e vi-

tamínica estão reproduzidas nas Tabelas 5, 6 e 7.

Três dietas contendo níveis diferentes de proteína de farelo de mamona industrial tratado como descrito anteriormente, foram preparadas pára cada uma das amostras tratadas. Usou-se como fonte protéica comple-

TABELA 5. Composição centesimal (teórica) das dietas utilizadas para alimentação de ratos.

COMPONENTES	(%)
Proteína (Farelo de Mamona Industrial + Caseína Comercial)	10
Gordura (Óleo de Milho Comercial)	8
Sais Minerais	5
Mistura Vitamínica	2
Sacarose (Açucar Refinado Comercial)	25
Amido (Amido de Milho Comercial)	50

AOAC, 1980 (2).

TABELA 6. Componentes da mistura salina utilizada nos ensaios.

COMPONENTES	(%)
Carbonato de Cálcio	29,97
Fosfato de Potássio	32,22
Fosfato de Monocálcio	7,49
Sulfato de Magnésio	10,19
Cloreto de Sódio	16,74
Citrato Férrico	2,75
Iodeto de Potássio	0,08
Sulfato de Magnésio	0,50
Sulfato de Cobre	0,30
Cloreto de Zinco	0,02

HEGSTED E COL., 1941 (20).

TABELA 7. Componentes da mistura vitamínica utilizada nos ensaios.

COMPONENTES		mg/100 g DE DIETA
Vitamina A*		1982,40
Vitamina D*		220,26
Tocoferol		11,00
Menadiona		4,96
Colina (HCl)		165,00
Ácido p-Amino Benzóico		11,00
Inositol		11,00
Niacina		9,90
Pantotenato de Cálcio		6,60
Riboflavina		2,20
Tiamina (HCl)		2,20
Piridoxina (HCl)		2,20
Ácido Fólico		0,20
Biotina		0,04
Cianocobalamina		0,003
Ácido Ascórbico		99,00
Glucose	q.s.p.	1000,00

AOAC, 1980 (2). * U.I.

mentar a caseína comercial, afim de que, o teor protéico total de cada dieta permanecesse em torno de 10 %. Uma dieta contendo somente caseína comercial como fonte protéica (controle) e uma dieta aprotéica foram também preparadas.

3.8.3. AGRUPAMENTO E ALIMENTAÇÃO DOS RATOS

Para os ensaios foram utilizados ratos machos e fêmeas, recém-desmamados da raça Wistar. Durante o período de adaptação (3 dias) forne-

ceu-se dieta comercial e água a vontade. Após a pesagem, 8 grupos de 7 ratos foram formados. Em cada grupo colocou-se 4 machos e 3 fêmeas, todos com idade inicial de 30 dias. Seis grupos foram alimentados com dietas contendo como fonte protéica uma combinação de farelo de mamona industrial e caseína comercial. Os dois outros grupos foram alimentados, respectivamente, com uma dieta contendo caseína comercial como única fonte protéica (controle) e uma dieta aprotéica. Durante os ensaios os animais permaneceram em gaiolas individuais de aço inox e tela, fornecendo-se alimento e água a vontade. O tempo de duração dos ensaios foi de 10 dias.

Os índices "NPR" (Net Protein Retention) e "PER" (Protein Efficiency Ratio) calculados para cada grupo de ratos foram usados como medidas da qualidade nutricional das proteínas em cada dieta (38).

3.9. ARRASTE POR VAPOR D'ÁGUA DE COMPOSTOS ALERGÊNICOS DO FARELO DE MAMONA

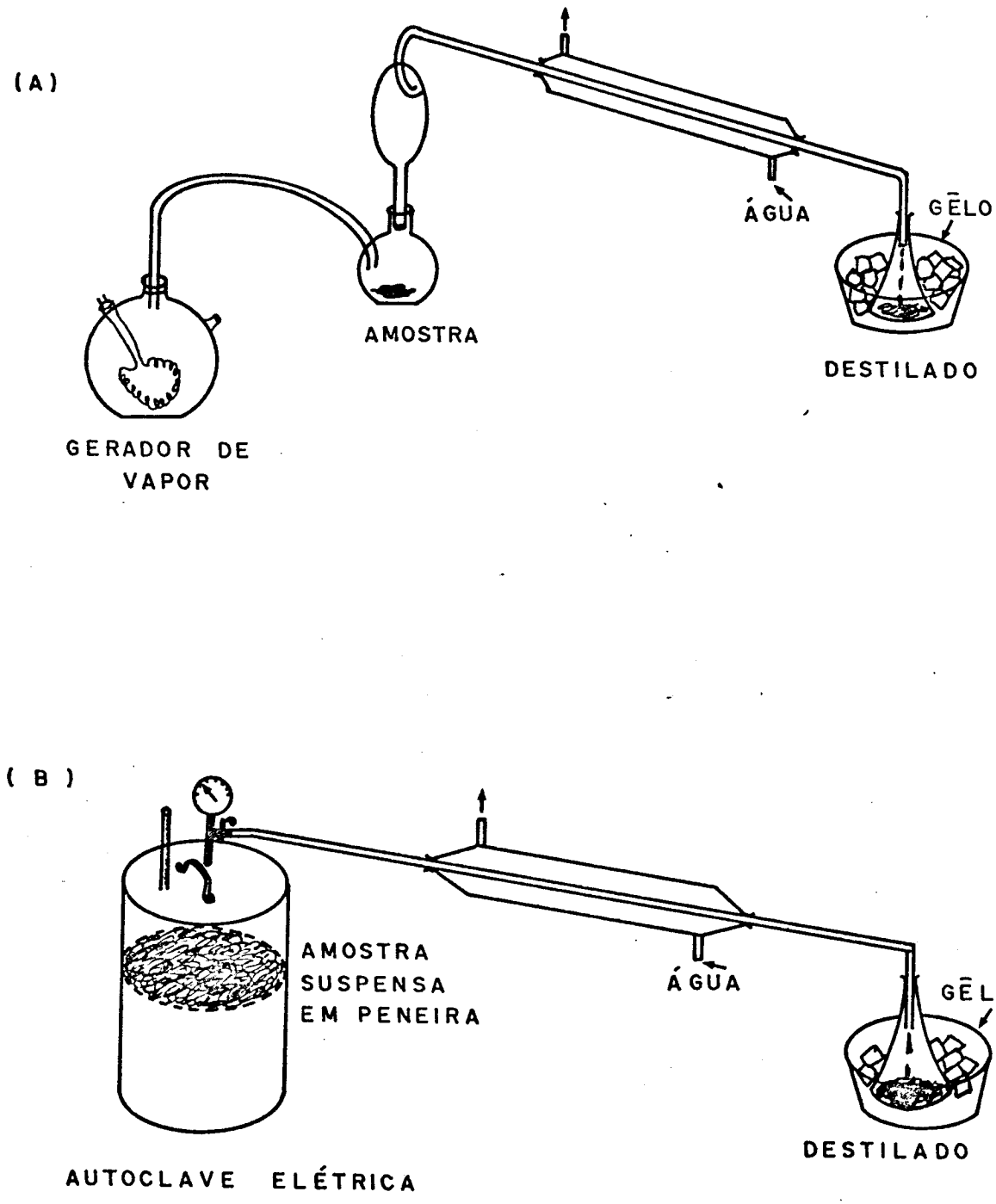
3.9.1. PROCEDIMENTOS DE ARRASTE

Compostos destiláveis ao vapor foram obtidos do farelo de mamona industrial através de dois procedimentos diferentes:

No primeiro, passou-se vapor produzido externamente através de uma suspensão de farelo. O vapor foi posteriormente condensado e recolhido em erlemyer resfriado com gelo (Figura 2A).

O segundo procedimento foi realizado na autoclave (Figura 2B). Dois condensadores foram adaptados, em série, na válvula de segurança da autoclave, para resfriar e condensar o vapor d'água eliminado. O vapor d'água, antes de ser eliminado, passou através do farelo suspenso por uma peneira e envolvido em pano, dentro da autoclave. A temperatura registrada no termômetro da autoclave foi mantida entre 110 e 115 ºC.

FIGURA 2. Procedimentos para arraste de vapor.



Os condensados de vapor d'água obtidos por ambos os procedimentos foram estocados em geladeira até serem usados.

3.9.2. TESTES QUÍMICOS PARA CARACTERIZAÇÃO DO CONDENSADO DE VAPOR D'ÁGUA

3.9.2.1. TESTE DA ANTRONA

Em tubo de ensaio, foram colocados 0,3 mL da amostra e adicionados 2 mL do reagente (0,002 g de antrona Riedel Haenag p.a. para cada 2 mL de ácido sulfúrico concentrado) pelas paredes do tubo, sendo feita a detecção visual após 3 minutos de reação. Desta forma os carboidratos são detectados, pelo aparecimento de uma cor verde que lentamente se torna verde-azulada (59).

3.9.2.2. REAÇÃO DO BIURETO

Em tubo de ensaio, colocou-se 1 mL da amostra e adicionou-se 4 mL do reagente biureto, misturou-se e deixou-se reagir durante 30 minutos. A leitura foi feita a 540 nm, usando o tubo com zero proteína como branco. Qualquer proteína ou peptídeo contendo pelo menos duas ligações peptídicas (3 aminoácidos) pode formar complexos de coloração tipo quelato, que varia do vermelho até o azul (máximo de absorção entre 540 e 560 nm) (25).

3.9.2.3. DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

As determinações de aminoácidos livres e totais nos condensados de vapor d'água foram realizadas de acordo com o ítem 3.2.6.. Para determinar os aminoácidos livres, o condensado foi passado diretamente no

analisador de aminoácidos (ítem 3.2.6.3.).

3.9.2.4. REAÇÃO DA NINIDRINA

Em tubo de ensaio com tampa, colocou-se 1 mL da amostra e sem causar agitação foram acrescentados 3 mL do reagente ninidrina (Merck). Com o tubo fechado, a solução foi homogenizada, cuidando-se para não produzir turbulência, e aquecida em banho maria em ebulição por 10 minutos. Após a reação, as amostras foram resfriadas, afrouxadas as tampas e agitadas vigorosamente, produzindo turbulência. A ninidrina reage com todas as aminas primárias, inclusive a amônia e seus sais, produzindo uma cor azul-violeta com um máximo de absorção entre 570 e 585 nm (49).

Uma escala de concentrações de 20 a 240 nanomoles de ácido glutâmico contidos em 1 mL de água foi preparada para uma curva padrão.

3.9.2.5. DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL

Determinou-se o nitrogênio total no condensado pelo método de Kjeldhal modificado Ba 4-38 da AOCS (1), e usou-se 10 mL da amostra.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE MAMONA INDUSTRIAL

4.1.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

As composições centesimais dos três farelos de mamona industrial de diferents origens são apresentadas na Tabela 8. As composições aqui apresentadas concordam com a relatada por ROLIM (43) e mostrada na Tabela 4. Comparando-se a composição centesimal dos três farelos de mamona industrial com a de outras oleaginosas como amendoim, girassol e algodão (Tabela 4), podemos observar que o farelo de mamona apresenta quantidades de cinza, óleo e proteína equivalente às demais oleaginosas. Porém, a quantidade de fibra bruta é significativamente mais elevada no farelo de mamona, chegando a apresentar cerca de duas e três vêzes mais que a quantidade de fibra do algodão e amendoim, respectivamente. A elevada quantidade de fibra no farelo de mamona industrial é um fator limitante de seu uso para formulação de rações destinadas a alimentação de animais.

TABELA 8. Composição centesimal do farelo de mamona industrial

COMPONENTES	(%)		
	FARELO-1	FARELO-2	FARELO-3
Umidade	9,37	8,10	8,60
Cinza	6,39	9,00	7,60
Óleo	1,80	2,70	1,70
Proteína (%N . 6,25)	46,97	37,61	42,38
Fibra Bruta	30,50	31,60	29,50
Carboidrato (Por Diferença)	4,03	10,01	10,22

AOCS, 1979 (1).

4.1.2. AMINOÁCIDOS TOTAIS

De um modo geral, os três farelos de mamona industrial analisados apresentaram a mesma composição de aminoácidos totais (Tabela 9). Observa-se que os teores de cistina e metionina, aminoácidos sulfurados relativamente escassos nas oleaginosas, encontram-se em taxas normais na proteína de mamona. A lisina, leucina e treonina são os três aminoácidos essenciais limitantes no farelo de mamona industrial, enquanto que no farelo de soja aparecem como limitantes os sulfurados e a treonina. A lisina é o primeiro aminoácido essencial limitante no farelo de mamona, aparecendo em segundo e terceiro níveis a leucina e treonina, respectivamente.

Os resultados aqui apresentados, especialmente no que se refere aos aminoácidos essenciais, concordam com o encontrado por outros autores (15,32,34).

4.2. EFEITO DO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO NA TOXIDADE DO FARELO

A toxidez devida a ricina residual do farelo de mamona industrial foi avaliada injetando-se em cobaias, por via intraperitoneal, extrato aquoso (0,85 % NaCl) do farelo. O resultado está apresentado na Tabela 10.

Ambos os farelos de mamona, industrial e preparado no laboratório, que não receberam tratamento na autoclave se mostraram tóxicos para cobaias, porém, o farelo industrial mostrou ser menos tóxico em relação ao farelo preparado no laboratório, como era de se esperar. Tratamento do farelo industrial na autoclave (com calor úmido) a 121 ºC por 10 , 20 e 30 minutos mostrou que, um período entre 10 e 20 minutos pareceu já ser suficiente para inativar a substância tóxica.

TABELA 9. Conteúdo de aminoácidos totais de três farelos de mamona industrial procedentes de fontes diferentes.

AMINOÁCIDO	g AMINOÁCIDO/100 g PROTEÍNA TOTAL				
	FARELO-1	FARELO-2	FARELO-3	FARELO DE SOJA (a)	PERFIL FAO (b)
Ácido Aspártico	9,84	10,68	9,86		
Treonina	3,65	3,95	3,81	3,80	4,00
Serina	5,52	6,00	6,06		
Ácido Glutâmico	20,81	20,72	21,08		
Prolina	3,68	3,78	3,84		
Glicina	4,26	4,33	4,43		
Alanina	4,43	4,46	4,47		
Cistina (c)	2,54	1,90	2,70	2,90	3,50(d)
Metionina	1,55	1,58	1,40		
Valina	5,27	5,28	5,37	5,00	5,00
Isoleucina	4,62	4,60	4,72	4,80	4,00
Leucina	6,62	6,68	6,30	7,30	7,00
Tirosina	2,87	2,57	2,87	7,80	6,00(d)
Fenilalanina	4,29	4,30	4,12		
Histidina	2,44	2,40	2,15		
Lisina	3,52	3,32	3,52	5,80	5,50
Amônia	2,05	1,90	1,77		
Arginina	12,55	11,93	12,07		
% Proteína (%N . 6,25)	46,97	37,61	42,38		

(a) Tabela 1. FULLER, G. E COL., 1971 (15).

(b) Tabela 21. FAO, 1973 (11).

(c) Cistina é parcialmente perdida durante a análise e foi corrigida em + 25 %.

(d) Aminoácidos sulfurados e aromáticos considerados conjuntamente.

TABELA 10. Avaliação da toxidade do farelo de mamona em cobaias por via intraperitoneal (a).

FARELO DE MAMONA	AUTOCLAVAGEM A 121 ºC POR	DOSE DE PROTEÍNA (%N.6,25) EXTRATÁVEL INJETADA (µg/g PESO)	Nº DE ANIMAIS	EFEITO NOS ANIMAIS (7 DIAS DE OBSERVAÇÃO)
Preparado no Labor.	(Não Tratado)	2	2	Morte em 2 dias.
Industrial (Nº 2)	(Não Tratado)	10	4	Morte em 3 dias.
		15	4	Morte em 3 dias.
	10 minutos	10	2	Sobreviveram.
		15	2	Sobreviveram.
		24	2	Uma morte em 2 dias.
	20 minutos	10	2	Sobreviveram.
		15	2	Sobreviveram.
		24	2	Sobreviveram.
	30 minutos	10	4	Sobreviveram.

(a) Controle com salina fisiológica.

4.3. EFEITO DO TRATAMENTO NA ATIVIDADE ANTIGÊNICA E ALERGÊNICA DO FARELO

Ensaios preliminares mostraram que tratamentos hidrotérmicos a temperaturas superiores a 121 ºC foram excessivamente drásticos, já que conferiram ao produto características físicas indesejáveis (torrados), e foram portanto descartados.

O farelo de mamona industrial foi submetido a vários tratamentos para inativação do alérgeno, que consistiu na aplicação de simples autoclavagem e autoclavagem combinada com tratamento ácido ou álcali. O grau de desalergenização do farelo foi avaliado in vitro e in vivo pelos testes de difusão dupla em gel de agar (DDGA) e anafilaxia cutânea passiva (ACP),

respectivamente. No teste de DDGA avaliou-se a perda da atividade imunoprecipitante, uma propriedade referida como antigênica, e no teste de ACP avaliou-se a perda da atividade anafilática, uma propriedade referida como alergênica.

4.3.1. SIMPLES AUTOCLAVAGEM (COM CALOR ÚMIDO)

Os tratamentos com simples autoclavagem a 121 ºC por diversos tempos, praticamente não alteraram a atividade imunoprecipitante e anafilática do farelo de mamona industrial, como poderá ser apreciado nas Tabelas 11 e 12.

A capacidade imunoprecipitante do antígeno, uma propriedade antigênica, não apresentou qualquer alteração com 10 minutos de autoclavagem. A partir de 20 minutos, porém, observou-se uma diminuição de 50 %, que permaneceu constante até os 60 minutos de tratamento em comparação com o farelo de mamona industrial não-tratado (Tabela 11). Quanto a propriedade

TABELA 11. Efeito da autoclavagem (com calor úmido) a 121 ºC na atividade imunoprecipitante do antígeno de farelo de mamona industrial.

TEMPO DE AUTOCLAVAGEM (min)	ATIVIDADE IMUNOPRECIPITANTE RESIDUAL (a) (%)
0 (Controle)	100
10	100
20	50
30	50
40	50
50	50
60	50

(a) Determinada em triplicata no extrato aquoso do farelo pelo método de DDGA, usando-se anti-soro CB-1A de coelho.

TABELA 12. Efeito da autoclavagem (com calor úmido) a 121 ºC na atividade anafilática do antígeno de farelo de mamona industrial.

TEMPO DE AUTOCLAVAGEM (min)	ATIVIDADE ANAFILÁTICA RESIDUAL (a) (cruzes)
0 (Controle)	(++++)
10	(++++)
30	(+++)
60	(++++)

(a) Determinada no extrato aquoso do farelo pelo método de ACP em camundongos, usando-se anti-soro CB-1A de coelho. Média de cinco manchas.

anafilática do antígeno, nenhuma alteração foi detectada, mesmo após 60 minutos de autoclavagem (Tabela 12).

A ineficiência do tratamento com calor úmido e pressão na destruição da propriedade anafilática do alérgeno foi observada por MOTTOLA E COL. (34), em 1971.

4.3.2. AUTOCLAVAGEM (COM CALOR ÚMIDO) CONJUGADA COM ÁCIDO CLORÍDRICO

A inclusão de ácido clorídrico no tratamento do farelo de mamona industrial com calor úmido a 121 ºC na autoclave tornou este processo mais eficiente na redução das atividades imunoprecipitante e anafilática do antígeno, no farelo. Nenhum dos tratamentos destruiu totalmente as atividades imunoprecipitante e anafilática do antígeno, como pode ser visto nas Tabelas 13 e 14.

A redução máxima da atividade imunoprecipitante para 12,5 % foi alcançada no tratamento com 0,5 e 1,0 % (p/p) de ácido clorídrico, após 40 minutos de autoclavagem. No tratamento com 2 % (p/p) de ácido, a mes-

TABELA 13. Efeito da autoclavagem (com calor úmido) a 121 ºC conjugada com ácido clorídrico na atividade imunoprecipitante do antígeno de farelo de mamona industrial.

TEMPO DE AUTOCLAVAGEM (min)	% ATIVIDADE IMUNOPRECIPITANTE RESIDUAL (a) HCl (p/p)				
	0,0%	0,5%	1,0%	2,0%	4,0%
0	100				
10		50	50	50	50
20		25	25	50	50
30		25	50	50	50
40		12,5	12,5	50	50
50		12,5	12,5	25	25
60		12,5	12,5	12,5	25

(a) Determinada em triplicata no extrato aquoso do farelo pelo método de DDGA, usando-se anti-soro CB-1A de coelho.

TABELA 14. Efeito da autoclavagem (com calor úmido) a 121 ºC conjugada com ácido clorídrico na atividade anafilática do antígeno de farelo de mamona industrial.

TEMPO DE AUTOCLAVAGEM (min)	ATIVIDADE ANAFILÁTICA RESIDUAL (cruzes) (a) HCl (p/p)				
	0,0%	0,5%	1,0%	2,0%	4,0%
0	(++++)				
10		(+++)	(+++)	(++++)	(++++)
30		(+++)	(++++)	(++++)	(+++)
60		(++)	(++++)	(++++)	(++)

(a) Determinada no extrato aquoso do farelo pelo método de ACP em camundongos, usando-se anti-soro CB-1A de coelho. Média de cinco manchas.

ma redução foi atingida somente após 60 minutos de autoclavagem. Com 4,0 % (p/p) de ácido a atividade imunoprecipitante foi abaixada somente para o mínimo de 25 % após 50 minutos de tratamento (Tabela 13).

O efeito do calor úmido e pressão conjugados com o ácido na atividade anafilática do antígeno aparece na Tabela 14. A diminuição máxima dessa propriedade para duas cruzes foi observada somente após 60 minutos de autoclavagem com 0,5 e 4,0 % (p/p) de ácido clorídrico. Tratamento com concentrações intermediárias de 1,0 e 2,0 % (p/p) de ácido, porém, não resultou em diminuição da atividade anafilática do antígeno de farelo de mamona industrial.

A diminuição das atividades imunoprecipitante e anafilática do antígeno durante o tratamento com calor úmido e pressão conjugados com ácido (Tabelas 13 e 14), pode ser explicada do seguinte modo: o calor úmido e pressão conjugados com ácido desnaturam e hidrolisam parcialmente a molécula antigênica (proteína) modificando a sua conformação ativa. Dessa forma, as moléculas antigênicas sofrem alterações reversíveis e irreversíveis, perdendo a capacidade de combinarem-se com seus anticorpos específicos tanto na reação de imunoprecipitação em gel como na reação de anafilaxia cutânea em animais de laboratório.

Houve um aumento aparente das atividades imunoprecipitante e anafilática estimulado pelo ácido clorídrico, como pode ser observado nas Tabelas 13 e 14. Na Tabela 11, por exemplo, foi apresentada a diminuição da atividade imunoprecipitante do antígeno para 50 % mediante o uso de simples autoclavagem. Quando o tratamento hidrotérmico foi acoplado ao uso de uma concentração fixa de HCl (Tabela 13), a atividade imunoprecipitante foi também reduzida em função do tempo. Porém, verificou-se uma resistência aparente à inativação causada pelo ácido, isto é, para um determinado tempo, a atividade pareceu aumentar com a concentração do ácido. Desta

forma, autoclavagem por 50 minutos na presença de 4 % de ácido produziu a mesma redução aparente que um tratamento mais brando de 20 minutos com 0,5 % de ácido.

Esta aparente incoerência é mais provavelmente devida a manifestação de um processo simultâneo de ativação e inativação do antígeno durante a sua desnaturação. Desse modo, durante o fenômeno de desnaturação alguns determinantes antigênicos são modificados irreversivelmente, perdendo a sua capacidade de combinarem-se com anticorpos específicos. No entanto, outros podem sofrer modificações reversíveis, permanecendo assim potencialmente ativos e perdem transitoriamente a capacidade de combinação com os anticorpos apenas por estarem encobertos. A própria hidrólise ácida, um fator capaz de conduzir à inativação irreversível, poderia também produzir a liberação ou desmascaramento dos determinantes antigênicos, antes da desnaturação se traduzir na perda permanente de atividade.

Dos dados apresentados nas Tabelas 11 a 14 desprende-se a hipótese de que com tratamentos hidrotérmicos na presença de HCl pode ocorrer, primeiro um desarranjo da estrutura terciária seguido da liberação hidrolítica de regiões moleculares contendo os determinantes antigênicos.

4.3.3. AUTOCLAVAGEM (COM CALOR ÚMIDO) CONJUGADA COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO

O efeito do tratamento com calor úmido e pressão conjugados com hidróxido de sódio nas atividades imunoprecipitante e anafilática do antígeno (Tabelas 15 e 16) foi mais efetivo em comparação com o mesmo tratamento conjugado com ácido clorídrico (Tabelas 13 e 14). Ambas as propriedades foram inativadas gradativamente com tempos de tratamento e quantidades progressivamente mais altas de hidróxido de sódio, como pode ser observado nas Tabelas 15 e 16. Os tratamentos com 0,5 e 1,0 % (p/p) de hi

TABELA 15. Efeito da autoclavagem (com calor úmido) a 121 ºC conjugada com hidróxido de sódio na atividade imunoprecipitante do antígeno de farelo de mamona industrial.

TEMPO DE AUTOCLAVAGEM (min)	% ATIVIDADE IMUNOPRECIPITANTE RESIDUAL (a) NaOH (p/p)				
	0,0%	0,5%	1,0%	2,0%	4,0%
0	100				
10		12,5	12,5	6,25	1,56
20		12,5	12,5	6,25	0,39
30		12,5	6,25	6,25	0,39
40		6,25	6,25	3,12	0,00
50		6,25	6,25	1,56	0,00
60		6,25	6,25	1,56	0,00

(a) Determinada em triplicata no estrato aquoso do farelo pelo método de DDGA, usando-se anti-soro CB-1A de coelho.

TABELA 16. Efeito da autoclavagem (com calor úmido) a 121 ºC conjugada com hidróxido de sódio na atividade anafilática do antígeno de farelo de mamona industrial.

TEMPO DE AUTOCLAVAGEM (min)	ATIVIDADE ANAFILÁTICA RESIDUAL (cruzes) (a) NaOH (p/p)				
	0,0%	0,5%	1,0%	2,0%	4,0%
0	(++++)				
10		(+++)	(+++)	(-)	(-)
30		(++)	(++)	(-)	(-)
60		(++)	(++)	(-)	(-)

(a) Determinada no extrato aquoso do farelo pelo método de ACP em camundongos, usando-se anti-soro CB-1A de coelho. Média de cinco manchas.

dróxido de sódio reduziram a atividade imunoprecipitante do antígeno para 12,5 % após 10 minutos de autoclavagem e para o mínimo de 6,25 % após 40 e 30 minutos, respectivamente. No tratamento com 2,0 % (p/p) de hidróxido de sódio, após 10 minutos a atividade imunoprecipitante foi reduzida para 6,25 % e o mínimo de 1,56 % foi atingido após 50 minutos de autoclavagem. Finalmente na autoclavagem conjugada com 4,0 % (p/p) de hidróxido de sódio a atividade imunoprecipitante foi reduzida após 20 minutos para o mínimo de 0,39 %. A partir de 40 minutos de tratamento com 4 % de NaOH, a atividade imunoprecipitante não foi detectada em extratos com concentração de 2 mg/mL de proteína, porém, em extratos 4 a 5 vêzes mais concentrados esta propriedade ainda continuou a ser detectada.

A atividade anafilática do antígeno também não foi detectada em estratos de alguns farelos tratados com hidróxido de sódio conjugado com calor úmido e pressão (Tabela 16). Na autoclavagem com 2,0 e 4,0 % (p/p) de NaOH, 10 minutos foram suficientes para uma completa inativação da propriedade anafilática do antígeno, determinada em extratos do farelo com concentração de 2 mg/mL de proteína, porém, em extratos 4 a 5 vêzes mais concentrados esta propriedade ainda continuou a ser detectada. Nos tratamentos com 0,5 e 1,0 % (p/p) de NaOH, somente uma redução mínima de duas cruzes foi alcançada após 30 minutos de autoclavagem.

O decréscimo consistente das atividades imunoprecipitante e anafilática, tanto em função do tempo de autoclavagem como da concentração de álcali, sugere que os processos de inativação por ácido e por álcali são fundamentalmente diferentes. Sem dúvida, o tratamento alcalino é mais destrutivo do que o tratamento com ácido. Além da cisão de ligações peptídicas, o álcali promove: 1) a hidrólise de aminoácidos com grupos eletrofílicos; 2) a formação de ligações cruzadas com produção de lisinoalanina, ornitoalanina, etc; e 3) a racemização dos aminoácidos.

Comparando os resultados das Tabelas 15 e 16 pode-se verificar que a propriedade anafilática do antígeno mostrou-se mais sensível ao tratamento do que a propriedade imunoprecipitante. Esta observação é consonante com a sugestão de SPIES E COL. (51) de que o alérgeno pode as vêzes perder as propriedades alergênicas sem perder totalmente as suas propriedades antigênicas.

Em virtude das considerações anteriores, o teste de ACP parece ser o mais indicado quando for desejado detectar a atividade alergênica do produto tratado.

4.4. ENSAIO BIOLÓGICO COM FARELO DE MAMONA INDUSTRIAL

O efeito do tratamento hidrotérmico a 121 ºC conjugado respectivamente com ácido ou álcali sobre o valor nutricional das proteínas de farelo de mamona industrial foi avaliado neste trabalho através de ensaios biológicos realizados com animais de laboratório. Dois tratamentos foram selecionados, levando-se em conta o seu efeito nas atividades imunoprecipitante e anafilática e o aspecto físico aparente do farelo. Ambos os tratamentos consistiram na autoclavagem do farelo a 121 ºC por 60 minutos em combinação com 0,5 % (p/p) de ácido clorídrico ou 0,5 % (p/p) de hidróxido de sódio, respectivamente.

O farelo de mamona industrial foi especialmente preparado para o ensaio biológico de alimentação de ratos, como descrito no ítem 3.8.1. de Material e Métodos. O farelo moído e peneirado apresentou teor protéico (%N . 6,25) de 51,61 %, e os farelos tratados com ácido ou álcali apresentaram teores de 36,08 e 39,27 %, respectivamente.

O conteúdo de aminoácidos totais dos farelos autoclavados respectivamente com ácido ou álcali e do farelo não-tratado estão apresenta-

dos na Tabela 17. A autoclavagem a 121 ºC por 60 minutos conjugada com 0,5 % (p/p) de ácido clorídrico abaixou o nível dos aminoácidos ácido aspártico, treonina, serina, glicina, alanina, cistina, leucina e histidina, enquanto que, a autoclavagem com 0,5 % (p/p) de hidróxido de sódio abaixou o nível dos aminoácidos treonina, prolina, alanina, cistina, leucina, tirosina e lisina. A Tabela 18 mostra a percentagem de perda desses aminoácidos em ambos os tratamentos. No tratamento hidrotérmico com ácido,os três aminoácidos essenciais cistina, treonina e leucina foram parcialmente destruídos em 18,03 , 12,30 e 2,93 %, respectivamente. Por outro lado, no tratamento hidrotérmico conjugado com álcali foram destruídos parcialmente cinco aminoácidos essenciais: cistina, lisina, leucina, tirosina e treonina em 31,69 , 6,39 , 5,12 , 2,98 e 1,31 %, respectivamente. A cistina foi o aminoácido mais intensamente destruído em níveis diferentes por ambos os tratamentos.

Não considerando o triptofano, o farelo de mamona possui três aminoácidos essenciais limitantes, apresentando a seguinte ordem: lisina, leucina e treonina (Tabela 9). Embora tenham sido encontrados os mesmos aminoácidos essenciais limitantes após o procedimento de preparação envolvendo a moagem e peneiramento do farelo, a ordem do segundo e terceiro limitantes se mostraram invertidas (Tabela 17). No farelo moído e peneirado autoclavado com 0,5 % (p/p) de ácido clorídrico não se observou mudança nos aminoácidos limitantes nem na sua ordem, em comparação com o farelo moído e peneirado não-tratado (Tabela 17), embora a treonina e leucina tenham sido parcialmente destruídos em 12,30 e 2,93 % (Tabela 18), respectivamente. Com relação à lisina, não ocorreu nenhuma destruição, ao contrário, houve até mesmo um leve aumento de seu nível. No farelo autoclavado com 0,5 % (p/p) de hidróxido de sódio ,além desses aminoácidos, os sul-

TABELA 17. Conteúdo de aminoácidos totais dos farelos de mamona industrial autoclavados a 121 ºC por 60 minutos com ácido ou álcali, respectivamente, e usados nas dietas para ratos.

AMINOÁCIDOS	g AMINOÁCIDO/100 g PROTEÍNA TOTAL			
	NÃO-TRATADO	0,5 % HCl	0,5 % NaOH	FAO (a)
Ácido Aspártico	11,48	10,67	11,84	
Treonina	3,82	3,35	3,77	4,00
Serina	6,11	5,60	6,14	
Ácido Glutâmico	20,55	20,92	21,54	
Prolina	3,59	3,75	3,50	
Glicina	4,31	4,27	4,47	
Alanina	4,69	4,65	3,30	
Cistina (b)	1,83	1,51	1,25	3,50(c)
Metionina	1,69	1,99	1,77	
Valina	5,66	5,85	5,81	5,00
Isoleucina	4,43	4,98	4,52	4,00
Leucina	6,83	6,63	6,48	7,00
Tirosina	3,02	3,07	2,93	6,00(c)
Fenilalanina	3,98	4,18	4,10	
Histidina	2,26	2,12	2,26	
Lisina	3,13	3,37	2,93	5,50
Amônia	1,98	2,19	2,33	
Arginina	11,11	11,11	11,21	
% Proteína(%N . 6,25)	51,61	36,08	39,27	

(a) Tabela 21. FAO, 1973 (11).

(b) Cistina é parcialmente perdida durante a análise e foi corrigida em + 25 %.

(c) Aminoácidos sulfurados e aromáticos considerados conjuntamente.

furados também se mostraram limitantes, sendo a ordem final: lisina, sulfurados, leucina e treonina (Tabela 17), os quais foram destruídos em quantidades de 6,39 , 31,69 , 5,12 e 1,31 % (Tabela 18), respectivamente.

TABELA 18. Perda de alguns aminoácidos das proteínas de farelo de mamona industrial durante o tratamento de desalergenização.

AMINOÁCIDOS	% DE PERDA DURANTE AUTOCLAVAGEM A 121 ºC POR 60 min	
	COM 0,5 % HCl	COM 0,5 % NaOH
Ácido Aspártico	7,06	0,00
Treonina	12,30	1,31
Serina	8,35	0,00
Prolina	0,00	2,51
Glicina	0,93	0,00
Alanina	0,21	29,64
Cistina	18,03	31,69
Leucina	2,93	5,12
Tirosina	0,00	2,98
Histidina	6,19	0,00
Lisina	0,00	6,39

A qualidade nutricional das proteínas do farelo de mamona industrial tratado na autoclave respectivamente com ácido ou álcali foi medida pelos índices "NPR" (Net Protein Retention) e "PER" (Protein Efficiency Ratio) num estudo de 10 dias de alimentação de ratos da raça Wistar, no qual as proteínas dos farelos foram avaliadas em quatro níveis, a saber: 0 , 2 , 4 e 6 %, em substituição à caseína da dieta. As Tabelas 19 e 20 mostram os resultados desses índices calculados para cada fonte protéica. Na avaliação dos resultados apresentados naquelas Tabelas observa-se:

1) que a substituição de caseína por farelo de mamona autocla-

TABELA 19. Ensaio biológico (a) com dietas contendo proteína de farelo de mamona industrial autoclavado (com calor úmido) a 121 ºC por 60 minutos na presença de 0,5 % (p/p) de ácido clorídrico.

PROPORÇÃO TEÓRICA (%) DE PROTEÍNA		% PROTEÍNA FINAL NA DIETA (%N . 6,25)	NPR	PER
FARELO DE MAMONA INDUSTRIAL (b)	CASEÍNA COMERCIAL (c)			
0	10	10,60	4,32	3,28
2	8	9,72	4,29	3,09
4	6	9,39	4,10	2,94
6	4	9,90	3,71	2,46

(a) Ensaio de 10 dias.

(b),(c) Contêm 36,08 e 78,89 % de proteína (%N . 6,25), respectivamente.

TABELA 20. Ensaio biológico (a) com dietas contendo proteína de farelo de mamona industrial autoclavado (com calor úmido) a 121 ºC por 60 minutos na presença de 0,5 % (p/p) de hidróxido de sódio.

PROPORÇÃO TEÓRICA (%) DE PROTEÍNA		% PROTEÍNA FINAL NA DIETA (%N . 6,25)	NPR	PER
FARELO DE MAMONA INDUSTRIAL (b)	CASEÍNA COMERCIAL (c)			
0	10	10,60	4,32	3,28
2	8	9,60	4,23	3,03
4	6	9,40	4,24	2,96
6	4	10,35	3,58	2,36

(a) Ensaio de 10 dias.

(b),(c) Contêm 39,27 e 78,89 % de proteína (%N . 6,25), respectivamente.

vado tanto com ácido como álcali produz uma diminuição dos índices NPR e PER. Isso já era esperado devido a limitância de alguns aminoácidos essenciais em ambos os farelos tratados, como discutido anteriormente.

2) A tendência geral é de diminuir os índices NPR e PER com as percentagens crescentes de substituição da caseína por farelo.

3) Nas dietas com menor e maior teor de proteína (2 e 6 %) de farelo, observou-se que o tratamento alcalino foi ligeiramente mais prejudicial ao valor nutricional da proteína do que o tratamento ácido. Que o tratamento ácido é menos nocivo à proteína, pode ser confirmado com os resultados apresentados na Tabela 21. Naquela Tabela observa-se que as dietas com farelo tratado com ácido renderam pesos ganhos superiores aos obtidos com farelo tratado com álcali.

TABELA 21. Dados obtidos nos ensaios biológicos com ratos Wistar, usando-se como fonte protéica diferentes combinações de farelo de mamona industrial tratado no laboratório e caseína comercial.

PROPORÇÃO TEÓRICA (%) DE PROTEÍNA DE FARELO DE MAMONA INDUSTRIAL (a)	PROTEÍNA DE CASEÍNA COMERCIAL (b)	GANHO PESO POR RATO (g)	PROTEÍNA CONSUMIDA POR RATO (g)
0,5 % HCl (c)			
2	8	+30,00	9,72
4	6	+29,44	10,03
6	4	+23,03	9,37
0,5 % NaOH (d)			
2	8	+29,36	9,70
4	6	+27,07	9,15
6	4	+22,69	9,61
Controle			
0	10	+36,97	11,27
Aprotéica			
0	0	-11,69	0,16

(a) Autoclavado (com calor úmido) a 121 ºC por 60 minutos conjugado com 0,5 % (p/p) de ácido clorídrico ou de hidróxido de sódio, respectivamente.

(b),(c),(d) Contém 78,89 , 36,08 e 39,27 % de proteína (%N . 6,25), respectivamente.

4.5. AVALIAÇÃO DO VAPOR D'ÁGUA APÓS CONTATO DIRETO COM FARELO DE MAMONA

As experiências laboratoriais com vapor d'água mantido em contato prévio com o farelo de mamona industrial foram motivadas por informações iniciais provenientes do setor industrial de que, alguns operários que trabalhavam no processamento da semente para extração do óleo, passaram a apresentar determinados sintomas como regiões avermelhadas na pele e coceira. Suspeitou-se então que, o vapor d'água eliminado pelos maquinários durante o processamento industrial poderia estar arrastando o composto ou compostos alergênicos presentes nas sementes de mamona, os quais poderiam estar sensibilizando os operários e causando os sintomas descritos.

Em nosso laboratório, vapor d'água obtido por dois procedimentos diferentes de arraste (Figuras 2A e 2B) foi condensado e submetido a testes químicos e imunológicos, após ter permanecido em contato direto com o farelo de mamona industrial.

4.5.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CONDENSADO DE VAPOR D'ÁGUA

Alguns testes químicos foram aplicados no condensado de vapor d'água e os resultados estão apresentados na Tabela 22. Detectou-se a presença de compostos aminados e amônia no condensado de vapor d'água mantido em contato direto com o farelo de mamona industrial. Os testes qualitativos para carboidratos, peptídeos e aminoácidos indicaram a ausência desses compostos. O nitrogênio total foi quantificado em 0,65 mg por 100 mL de condensado normal e 9,37 mg por 100 mL de condensado parcialmente concentrado (14 vêzes) por liofilização.

TABELA 22. Resultado dos testes químicos aplicados no condensado de vapor d'água após contato direto com o farelo de mamona industrial.

NATUREZA DO TESTE	DETECÇÃO DE	CONDENSADO	
		NORMAL	PARCIALMENTE LIOFILIZADO (a)
pH	-	6,0 a 6,5	6,0 a 6,5
Antrona	Carboidratos	Negativo	Negativo
Reação do Biureto	Peptídeos	Negativa	Negativa
Analisador de Aminoácidos (b)	Aminoácidos e NH_4^+	Não detectados (Presença de NH_4^+)	Não detectados (Presença de NH_4^+)
Reação da Ninidrina	Aminas Primárias, Aminoácidos e NH_3	Positiva	Positiva
Kjeldhal (b)	Nitrogênio	0,65 mg/100 mL	9,37 mg/100 mL

(a) Concentrado 14 vêzes.

(b) Testes aplicados somente no condensado de vapor obtido através do procedimento da Figura 2B.

4.5.2. COMPOSTOS NINIDRINA-POSITIVOS

O farelo de mamona industrial, o farelo preparado no laboratório e as cascas das sementes de mamona eliminaram compostos por arraste de vapor que deram reação positiva com a ninidrina (Tabela 23). Ambos os farelos eliminaram maior quantidade desses compostos do que a casca separadamente, sendo que o farelo industrial eliminou 35 % a mais que o farelo preparado no laboratório.

A autoclavagem (com calor úmido) do farelo de mamona industrial pareceu promover a liberação de compostos ninidrina-positivos, e a liberação foi maior nos tempos de autoclavagem mais prolongados (Tabela 24).

TABELA 23. Quantidade (em ug de ác. glutâmico) de compostos ninidrina-positivos arrastados do farelo de mamona por vapor d'água (a).

AMOSTRA USADA NO ARRASTE (2g)	COMPOSTOS NINIDRINA-POSITIVOS (b) (µg ÁC. GLUTÂMICO/400 mL)
Farelo Industrial (com Casca)	12,0
Farelo Preparado no Laboratório (com Casca)	7,8
Casca de Sementes	5,4

(a) Procedimento da Figura 2A.
(b) Média de três testes com o reagente ninidrina.

TABELA 24. Quantidade (em ug de ác. glutâmico) de compostos ninidrina-positivos arrastados do farelo de mamona industrial por vapor d'água (a).

AUTOCLAVAGEM DO FARELO DE MAMONA INDUSTRIAL USADO NO ARRASTE (2g)		COMPOSTOS NINIDRINA-POSITIVOS (b) (µg ÁC. GLUTÂMICO/400 mL)
121 ºC	30 min	8,4
	90 min	9,3
	180 min	16,5
150 ºC	30 min	21,6

(a) Procedimento da Figura 2A.
(b) Média de três testes com o reagente ninidrina.

Adição prévia de hidróxido de sódio em quantidades de 0,25 ,

0,50 , 0,75 e 1,00 % (p/p) ao farelo de mamona industrial estimulou progressivamente a liberação dos compostos ninidrina-positivos, com exceção da concentração mais alta, como pode ser observado na Figura 3. Conside-

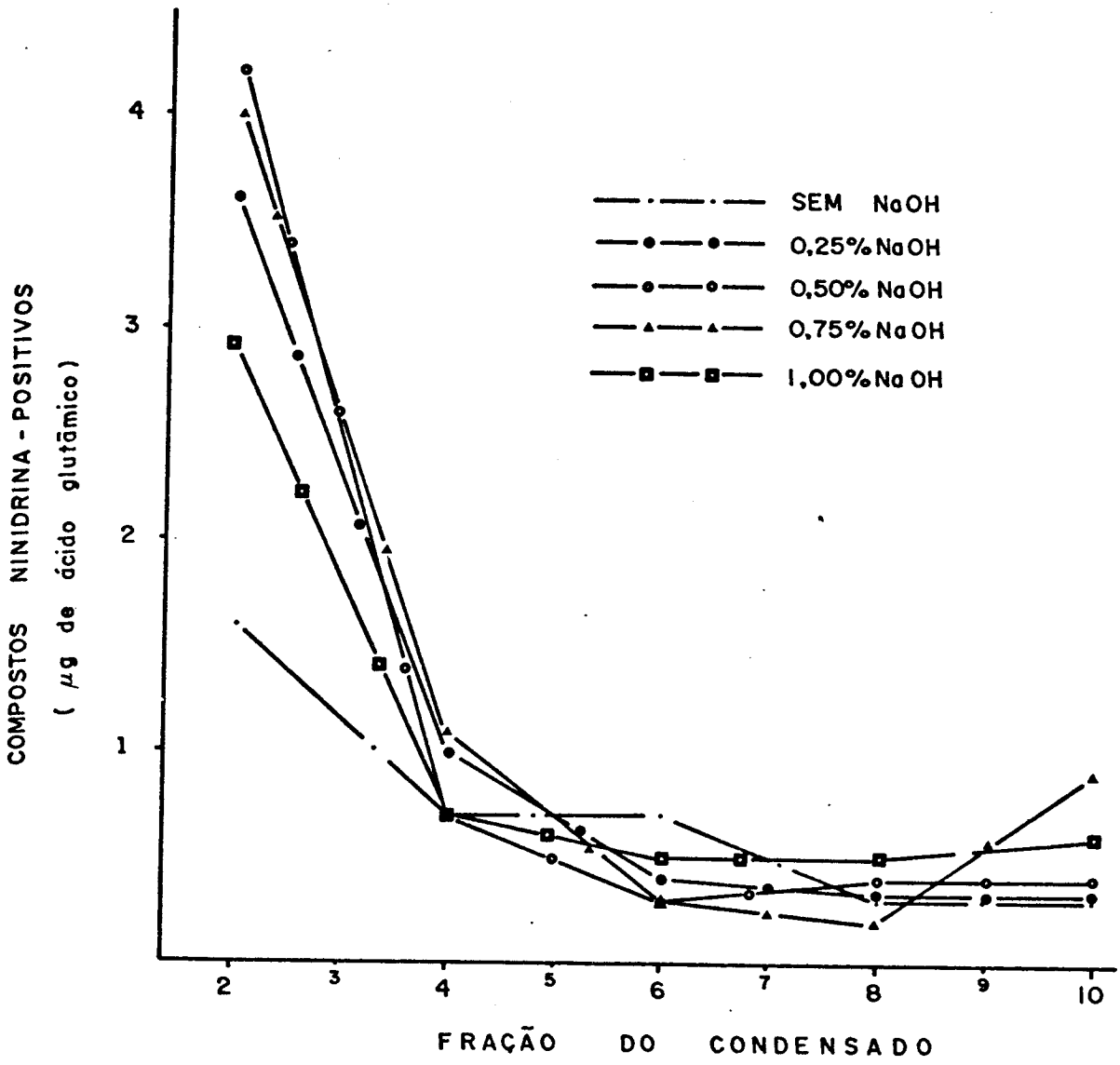


FIGURA 3. Concentração de compostos ninidrina-positivos por fração de 100 mL de destilado ao vapor, mantido em contato direto com farelo de mamona industrial tratado com NaOH e autoclavado a 121ºC por 60 minutos.

rando a concentração desses compostos versus tempo de destilação, verificou-se que a liberação dos compostos ninidrina-positivos foi decrescente tendendo a uma extinção final.

4.5.3. ANTIGENICIDADE E ALERGENICIDADE DO CONDENSADO DE VAPOR D'ÁGUA

O vapor d'água mantido em contato direto com o farelo de mamona industrial foi avaliado quanto às suas propriedades imunoprecipitante e anafilática, através dos respectivos testes de difusão dupla em gel de agar e anafilaxia cutânea passiva.

O condensado de vapor obtido por ambos os procedimentos de arraste das Figuras 2A e 2B apresentou atividade anafilática no teste de ACP em camundongos (Tabela 26), mas não se mostrou imunoprecipitante no teste de DDGA (Tabela 25). O condensado manteve a atividade anafilática após ser concentrado 14 vêzes no liofilizador, e também quando totalmente liofilizado e rediluido para 5 ml com solução salina fisiológica (Tabela 28). Nestas condições a atividade imunoprecipitante continuou não sendo detectada (Tabela 27).

Quando o farelo de mamona industrial foi submetido a tratamento hidrotérmico no laboratório antes da operação de arraste, já não foi possível detectar a atividade anafilática no destilado mantido em contato direto com estes farelos (Tabela 30). A atividade imunoprecipitante também não foi detectada, como já era esperado (Tabela 29).

Aparentemente, não existe correlação entre a atividade anafilática e os compostos ninidrina-positivos no destilado condensado. A propriedade anafilática do destilado condensado mantido em contato direto com o farelo industrial é inativada pelo tratamento prévio do farelo com calor úmido na autoclave (Tabela 30), enquanto que a liberação dos compostos

TABELA 25. Atividade imunoprecipitante do vapor d'água mantido em contato direto com farelo de mamona industrial não-tratado no laboratório.

PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DE CONDENSADO DE VAPOR	TESTE: DIFUSÃO DUPLA EM GEL DE AGAR (a)
Sol. 0,2 % de CB-1A (Controle)	Positivo
Figura 2A (5 g de Farelo)	Negativo
Figura 2B (200 g de Farelo)	Negativo

(a) Em triplicata, usando-se o anti-soro CB-1A de coelho.

TABELA 26. Atividade anafilática do vapor d'água mantido em contato direto com farelo de mamona industrial não-tratado no laboratório.

PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DE CONDENSADO DE VAPOR	TESTE: ANAFILAXIA CUTÂNEA PASSIVA (a)			
	Nº ENSAIO	POSITIVO	NEGATIVO	AVALIAÇÃO
Sol. 0,2 % de CB-1A (Controle)	3	3	0	Positivo
Figura 2A (5 g de Farelo)	3	2	1	Positivo
Figura 2B (200 g de Farelo)	3	2	1	Positivo

(a) Usou-se o anti-soro CB-1A de coelho.

ninidrina-positivos parece ser estimulada pelo mesmo tratamento aplicado no farelo (Tabela 24).

Os resultados do teste de anafilaxia cutânea passiva (Tabelas 26 e 28), ao contrário do teste de difusão dupla em gel de agar (Tabelas 25 e 27), sugerem que algum composto (ou compostos alergênicos) presente no farelo de mamona industrial pode ser arrastado por vapor d'água durante tratamento hidrotérmico brando. Cabe acrescentar aqui que, durante as operações de arraste com vapor no laboratório, o autor teve a oportunidade de

TABELA 27. Atividade imunoprecipitante do vapor d'água mantido em contato direto com farelo de mamona industrial não-tratado no laboratório, e posteriormente condensado e concentrado no liofilizador.

LIOFILIZAÇÃO DO CONDENSADO OBTIDO NA AUTOCLAVE (FIG. 2B)	TESTE: DIFUSÃO DUPLA EM GEL DE AGAR (a)
Sol. 0,2 % de CB-1A (Controle)	Positivo
Parcial (Concentrado 14 Vêzes)	Negativo
Total (e Rediluído para 5 ml com Sol. Salina Fisiológ.)	Negativo

(a) Em triplicata, usando-se anti-soro CB-1A de coelho.

TABELA 28. Atividade anafilática do vapor d'água mantido em contato direto com farelo de mamona industrial não-tratado no laboratório, e posteriormente condensado e concentrado no liofilizador.

LIOFILIZAÇÃO DO CONDENSADO OBTIDO NA AUTOCLAVE (FIG. 2B)	TESTE: ANAFILAXIA CUTÂNEA PASSIVA (a)			
	Nº ENSAIO	POSITIVO	NEGATIVO	AVALIAÇÃO
Sol. 0,2 % de CB-1A (Controle)	3	3	0	Positivo
Parcial (Concentrado 14 Vêzes)	3	1	2	Positivo
Total (e Rediluído para 5 ml com Sol. Salina Fisiológ.)	2	1	1	Positivo

(a) Usou-se o anti-soro CB-1A de coelho.

experimentar o desconforto de reações locais, nos olhos e narinas, como descritas anteriormente.

Esses dados permitem concluir que, os vapores que entram em contato com farelos industriais não arrastam compostos de natureza protéica ou glicídica em quantidades suficientes para serem detectados em nosso sistema analítico. No entanto, outros compostos de poder alergênico (tipo

TABELA 29. Atividade imunoprecipitante do vapor d'água (a) mantido em contato direto com farelo de mamona industrial tratado no laboratório.

AUTOCLAVAGEM (COM CALOR ÚMIDO) TEMPERATURA (ºC)	TEMPO (min)	TESTE: DIFUSÃO DUPLA EM GEL DE AGAR (b)
Sol. 0,2 % de CB-1A (Controle)		Positivo
121	10	Negativo
	20	Negativo
	30	Negativo
	40	Negativo
	50	Negativo
	60	Negativo
150	30	Negativo

(a) Procedimento da Figura 2A.

(b) Em triplicata, usando-se anti-soro CB-1A de coelho.

TABELA 30. Atividade anafilática do vapor d'água (a) mantido em contato direto com farelo de mamona industrial tratado no laboratório.

AUTOCLAVAGEM (COM CALOR ÚMIDO) TEMPERATURA (ºC)	TEMPO (min)	TESTE: ANAFILAXIA CUTÂNEA PASSIVA (b)
Sol. 0,2 % de CB-1A (Controle)		Positivo
121	10	Negativo
	20	Negativo
	30	Negativo
	40	Negativo
	50	Negativo
	60	Negativo
150	30	Negativo

(a) Procedimento da Figura 2A.

(b) Três ensaios em três animais diferentes, usando-se anti-soro CB-1A de coelho.

hapteno) estão co-destilando com o vapor d'água, após contato deste último com os subprodutos industriais da mamona. O fato da substância alergênica presente nos vapores possuir atividade anafilática mas não imunoprecipitante (Tabelas 25 e 26), concorda também com a possibilidade de que a mesma seja de natureza haptênica, e não protéica ou glicídica.

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho, que objetivou explorar métodos rápidos e econômicos para desalergenizar o farelo de mamona industrial, foram apresentados resultados que permitem concluir o seguinte:

Para obter-se uma desalergenização parcial do farelo de mamona industrial precisa-se aplicar condições de tratamento muito drásticas, especialmente quando comparadas às condições que destroem os princípios tóxicos deste subproduto.

A autoclavagem conjugada com hidróxido de sódio mostrou ser mais eficiente para desalergenizar o farelo de mamona em comparação com igual autoclavagem conjugada com ácido clorídrico.

Possíveis desalergenizações do farelo de mamona industrial foram alcançadas na auticlavagem (com calor úmido) a 121 ºC conjugada com hidróxido de sódio.

Os aminoácidos essenciais das proteínas de farelo de mamona industrial foram mais intensamente destruídos na autoclavagem a 121ºC por 60 minutos conjugada com 0,5 % (p/p) de NaOH do que igual autoclavagem conjugada com 0,5 % (p/p) de HCl. O farelo autoclavado com álcali apresentou quatro aminoácidos essenciais limitantes, a lisina, os sulfurados, a leucina e a treonina, enquanto que, no farelo autoclavado com ácido constatou-se apenas três aminoácidos essenciais limitantes, a lisina, a treonina e a leucina.

Através de ensaios biológicos dos produtos que sofreram tratamentos desalergenizantes razoavelmente brandos, verificou-se que o valor biológico da proteína foi ligeiramente mais baixo para o produto tratado com álcali do que com ácido.

Foi constatada a atividade alergênica de compostos ainda não

identificados (talvez do tipo hapteno) extraído pela ação do vapor d'água sobre o farelo de mamona, fenômeno que pode ser extrapolado aos processos de destoxicação e/ou desalergenização industrial.

Obter-se 100 % de desalergenização pelos métodos aqui testados apresenta-se como um objetivo ainda distante, especialmente considerando que se busca a preservação das propriedades biológicas das proteínas. A necessidade de pesquisa posterior é aparente, especificamente devido a importância da destruição da totalidade dos alérgenos para a saúde do animal que se destina a ração e, em última instância, do homem.

6. BIBLIOGRAFIA

1. A.O.C.S. - Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists's Society. 3th. Illinois, 1979.
2. A.O.A.C. - Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13th. Washington, 1980.
3. ASSIS, F.P.; NAUFEL, F.; TUNDISI, A.G.A.; ROCHA, G.L.; BRANCO, T.S.; BECKER, M. e CINTRA, B. Valor do farelo de torta de mamona atoxicada na alimentação de vacas leiteiras, em comparação com os farelos de torta de algodão e amendoim. Bol. Indústria Animal 20: 35, 1962.
4. ASSIS, F.P.; NAUFEL, F.; ROCHA, G.L.; BECKER, M.; PALESTINO, F.; MEDINA, P.; KALIL, E.B. e VIEIRA, D.M.L. Emprego do farelo de mamona atoxicada em rações para vacas leiteiras. Bol. Indústria Animal, 20: 39, 1962.
5. BIER, O.G.; MOTA, I.; SILVA, W.D. e VAZ, N.M. Imunologia Básica Aplicada. Guanabara Koogans, Rio de Janeiro, 1982.
7. CORRAL, P.F.P. Obtenção de isolados protéicos a partir de farelo de sengordurado de mamona (Ricinus communis). Tese (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Unicamp. Campinas, São Paulo, 1975.
8. COULSON, E.J.; SPIES, J.R.; STEVENS, H. and SHIMP, J.H. The immunochemistry of allergens. X. Anaphylactogenic properties of allergenic fractions from castor beans. J. Allergy 21: 34, 1950.
9. COULSON, E.J.; SPIES, J.R. and STEVENS, H. The allergen content of

10. DAUSSANT, J.; ORY, R.L. and LAYTON, L.L. Characterization of proteins and allergens in germination castro seeds by immunochemical Techniques. J. Agric. Food Chem. 24 (1): 103, 1976.

11. FAO/WHO - ENERGY AND PROTEIN REQUIREMENTS. World Health Organization Techmical Report Series nº 522. Geneva, 1973.

12. FAO PRODUCTION YEARBOOK. Index 34, 1980.

13. FIGLEY, K.D. and ELROD, R.H. Endemic Asthma due to castor bean dust. J. Am. Med. Assoc. 90: 79, 1928.

14. FONSECA, M. Estudo da inativação dos alérgenos da mamona. Tese (Mestrado). Departamento de Bioquímica do Instituto de Quimica,UFRJ. Rio de Janeiro, 1975.

15. FULLER, G. Potential for detoxified castor meal. J. Am. Oil Chem. Soc. 48: 616, 1971.

16. GADÊLHA, J.A.; SILVA, A.V. e FREIRE, M.F.M. Substituição parcial de concentrado comercial por torta de mamona atoxicada, em rações de frango de corte. Bol. Cear. Agron. 10: 17. Fortaleza,Ceará, 1969.

17. GARCIA, M.A.T. Isolamento, purificação e caracterização de um alérgeno de Ricinus communis. Tese (Mestrado). Departamento de Bioquimica do Instituto de Química, UFRJ. Rio de Janeiro, 1981.

18. GARDNER JR., H.K.; D'ANQUIN, E.L.; KOLTUN, S.P.; McCOURTNEY, E.J.; VIX, H.L.E. and GASTROCK, E.A. Detoxification and deallergenization of castor beans. J. Am. Oil Chem. Soc. 37: 142, 1960.

19. GONÇALVES, N.P.; KAKIDA, J.; BENDEZÚ, J.M. e LELES, W.D. Cultivares de mamona. Informe Agropecuário 82: 31, 1981.

20. HEGSTED, D.M.; MILLS, R.C.; ELVEHJEM, C.A. and HART, E.B. Choline in the nutrition of chicks. J. Biol. Chem. 138: 459, 1941.

21. JONES, D.B. Proteins of the castor bean - their preparation, properties and utilization. J. Am. Oil Chem. Soc. 24: 247, 1947.

22. JENKINS, F.P. 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, 1963.

23. KODRAS, R. Studies on the detoxication of castor seed pomace. J. Am. Oil Chem. Soc. 26: 641, 1949.

24. LAUN, G.F. e COSTA, B.L. Emprego da torta de mamona detoxicada na alimentação de poedeiras. Instituto de Zootecnia, Publicação nº 46. Ministério da Agricultura, Brasil, 1962.

25. LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in Enzymology 3: 450. Edited by Colowick and Kaplan, New York, 1957.

26. LAYTON, L.L.; MOSS, L.K. and DeEDS, F. The complex nature of castor sensitivity. J. Am. Oil Chem. Soc. 38: 76, 1961.

27. LAYTON, L.L.; DANTE, B.T.; MOSS, L.K.; DYE, N.H. and DeEDS, F. Electrophoretic fractionation of soluble antigenic proteins from the seed of ricinus communis (castor bean). J. Am. Oil Chem. Soc. 38: 405, 1961.

28. LAYTON, L.L.; LEE, S.; DANTE, B.T. and DeEDS, F. Passive cutaneous anaphylaxis in detection of seed antigens of ricinus communis (castor bean). J. Am. Oil Chem. Soc. 38: 597, 1961.

29. LAYTON, L.L. Castor bean allergens in tissues of catfish reared on a diet containing castor bean pomace. J. Sci. Food Agric. 28:399, 1977.

30. MENDES, S. e CINTRA, A.B.U. Etiologia da "asma epidêmica de Bauru". Revista Paulista de Medicina 43 (4): 29, 1953.

31. MORRIS, R.S.; SPIES, J.R. and COULSON, E.J. The chemistry of allergens. XVII. Disc Electrophoresis and gel diffusion of the carbohydrate-free allergenic protein, CB-65A, from castor beans. Archieves of Biochemistry and Biophysics 110: 300, 1965.

32. MOTTOLA, A.C.; HENDRICKSON, A.P.; O'CONNELL, D.E.; PALTER, R. and KOHLER, G.O. Pilot plant deactivation of castor meal antigen. Lime process. J. Agric. Food Chem. 16 (5): 725, 1968.

33. MOTTOLA, A.C.; ELDRIDGE, L.; HERRING, V. and KOHLER, G.O. A comparison of passive cutaneous anaphylaxis guinea pig responses using an intravenous or intradermal route for antigen challenge. J. Am. Oil Chem. Soc. 47: 458, 1970.

34. MOTTOLA, A.C.; MACKEY, B. and HERRING, V. Castor meal antigen deactivation - Pilot plant steam process. J. Am. Oil Chem. Soc. 48: 510, 1971.

35. MOTTOLA, A.C.; MACKEY, B.; HERRING, V. and KOHLER, G.O. Castor meal antigen deactivation - pilot plant ammonia process. J. Am. Oil Chem. Soc. 49: 101, 1972.

36. MOTTOLA, A.C.; MACKEY, B.; WALKER, H.G. and KOHLER, G.O. Castor meal antigen deactivation - pilot plant lime process. J. Am. Oil Soc. 49: 662, 1972.

37. MOURA, P.A.M. Aspectos Econômicos das culturas de oleaginosas - amendoim, mamona e girassol. Informe Agropecuário 82: 3, 1981.

38. MULLER, H.G. and TOBIN, G. Nutrition and Food Processing. The Avi Publishing Company, INC., Westport, Connecticut, 1980.

39. NAUFEL, F.; ASSIS, F.P.; REZENDE, M.R.L.; ROCHA, G.L.; BECKER, M.; CAIELLI, E.L.; LEÃO, J.F.S. e KALIL, E.B. Efeitos comparativos da administração de farelos de torta de mamona atoxicada, de so-

ja e de algodão na dieta de vacas em lactação. Bol. Industria Animal 20: 47, 1962.

40. OVARY, Z. Anafilaxia cutânea passiva (PCA). Imunologia-Imunopatologia-Alergia-Métodos, 220. Editado por Lima e Silva, 1957.

41. PERRONE, J.C.; IACHAN, A.; DOMONT, G.B.; DISITZER, L.V.; OSORIO,V.R.; CASTRO, V.R.; ROITMAN, R. e GOMES, S.M. Contribuição ao estudo da torta de mamona. Instituto Nacional de Tecnologia, Rio de Janeiro, 1966.

42. ROESEL, C.E. Imunologia - Um método auto-instrutivo. McGraw-Hill do Brasil Ltda., São Paulo, 1981.

43. ROLIM, A.A.B. Óleos vegetais: usos gerais. Informe Agropecuário 82: 17, 1981.

44. SANBRA - Sociedade Algodoeira do Nordeste Brasileiro. LEX Protéico. Contribuição da SANBRA ao desenvolvimento da pecuária nacional, nº 34. Recife, 1960.

45. SPIES, J.R. and COULSON, E.J. The Chemistry of Allergens. VIII. Isolation and Properties of an active protein polysacharidic fraction, CB-1A, from castor beans. J. Am. Chem. Soc. 65: 1720,1943.

46. SPIES, J.R.; COULSON, E.J.; CHAMBERS, D.C.; BERNTON, S. and STEVENS, H. The chemistry of allergens. IX. Isolation and Properties of an active, carbohydrate - free protein from castor beans. J. Am. Chem. Soc. 66: 748, 1944.

47. SPIES, J.R.; COULSON, E.J. and STEVENS, H. The chemistry of allergens. X. Comparison of chemical and immunological properties of CB-1A preparations from domestic castor beans and brazilian castor bean pomace. J. Am. Chem. Soc. 66: 1798, 1944.

48. SPIES, J.R.; COULSON, E.J.; CHAMBERS, D.C.; BERNTON, H.; STEVENS, H.

and SHIMP, J.R. The chemistry of allergens. XI. Properties and composition of natural proteoses isolated from oilseeds and nuts by the CS-1A procedure. J. Am. Chem. Soc. 73: 3995, 1951.

49. SPIES, J.R. Colorimetric procedures for amino acids. Methods in Enzymology 3: 468, 1957.

50. SPIES, J.R. and BERNTON, H.S. Response of nonallergic persons to injected castor bean allergen, CB-1A. J. Allergy 33 (1): 73,1962.

51. SPIES, J.R.; COULSON, E.J.; BERNTON, H.S.; WELLS, P.A. and STEVENS,H. The chemistry of allergens. Inactivation of the castor bean allergens and ricin by heating with aqueous calcium hidroxide. J. Agric. Food Chem. 10 (2): 140, 1962.

52. SPIES, J.R. and COULSON, E.J. The chemistry of allergens. XVI. Ion exchange fractionation of the castor bean allergen, CB-1A, and antigenic specificity relationshis of the fractions. J. Biolog. Chem. 239 (6): 1818, 1964.

53. SPIES, J.R. and BARRON, J.K. The chemistry of allergens. XVIII. An anlysis of CB-1A from castor beans. Ann. Allergy 24: 499, 1966.

54. SPIES, J.R. The chemistry of allergens. XIX. On the number of antigens and the homogeneity of the isolated antigens of fraction CB-1A from castor beans. Ann. Allergy 25: 29, 1967.

55. THE MERCK INDEX. Merck & Co, Inc. Rahway, N.J., USA, 1968.

56. TRUGO, N.M.F. Isolamento e caracterização química e físico-química de alérgenos da mamona. Tese (Mestrado). Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, UFRJ. Rio de Janeiro, 1979.

57. VILHJALMSDOTTIR, L. and FISHER, H. Castor bean meal as a protein source for chickens: detoxification an determination of limiting amino acids. J. Nutrition 101: 1185, 1971.

58. WALLER, G.R. and NEGI, S.S. Isolation of ricin, ricinine and the

allergenic fraction from castor seed pomace from two different sources. J. Am. Oil Chem. Soc. 35: 409, 1958.

59. WHISTLER, R.L. and VOLFROM, M.L. Methods in carbohydrate chemistry (I). New York, USA, 1962.