

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

**Destoxificação do Farelo de Mamona (*Ricinus
communis* L.) por Extrusão Termoplástica**

Bárbara Amorim Silva

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

**DESTOXIFICAÇÃO DO FARELO DE MAMONA (*RICINUS
COMMUNIS L.*) POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA**

BÁRBARA AMORIM SILVA

Sob a orientação do Professor

José Luis Ramírez Ascheri

e co-orientação do Professor

Carlos Wanderlei Piller de Carvalho

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de concentração em Tecnologia de Alimentos.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2011

664.763
S586d
T

Silva, Bárbara Amorim, 1974-
Destoxificação do farelo de mamona
(*Ricinus Communis* L.) por extrusão
termoplástica/ Bárbara Amorim Silva. -
2011.

70f. : il.

Orientador: José Luis Ramírez Ascheri.
Dissertação (mestrado)- Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.

Bibliografia: p. 52-58.

1. Mamona - Teses. 2. Mamona -
Toxicologia - Teses. 3. Processo de
extrusão - Teses. I. Ramírez Ascheri, José
Luis, 1955- II. Universidade Federal
do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III.
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

BÁRBARA AMORIM SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e tecnologia de Alimentos Área de Concentração em Ciências de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/02/2011

José Luis Ramírez Ascheri. (DSc.) EMBRAPA-CTAA
(Presidente)

Sidinéia Cordeiro de Freitas (DSc.) EMBRAPA-CTAA
(Membro)

Marília Penteado Stephan. (DSc.) EMBRAPA-CTAA
(Membro)

DEDICATÓRIA

A Jeová

“Digno és, Jeová, sim, nosso Deus, de receber a glória, e a honra, e o poder, porque criaste todas as coisas e porque elas existiram e foram criadas por tua vontade.”

Revelação 4:11

Aos Meus amados filhos, Lídia, Sophia e Miguel

Que tiveram suas horas roubadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Ao D.Sc. José Luis Ramires Ascheri, pela orientação e dedicação, por acreditar no meu trabalho.

À Professora PhD. Sueli Freitas, pela minha formação acadêmica, pela motivação na área científica, pelo amor e dedicação dados a mim durante todos estes anos.

À D.Sc. Marília por ter me abraçado, pegado na minha mão, por ter me dado o que ela tem de melhor... seu raciocínio, sua inteligência. Agradeço a ela a realização integralmente deste trabalho e por ter me apaixonado pela bioquímica.

À D.Sc. Sidinéa por ter me dado diversas oportunidades de trabalho, por ampliar meu horizonte e por me ensinar muito, muito, muito...

À D.Sc. Carol, que mesmo sem me conhecer me ajudou corrigindo meu trabalho, me dando força nos momentos finais e mais difíceis pra mim.

Às minhas amigas:

Juliana Santos por ter feito de tudo para eu alcançar este título, por estar sempre ao meu lado, por me ajudar amadurecer não só profissionalmente, pelos conselhos, conversas e muitos puxões de orelha;

Alcilúcia Oliveira que me envolveu com suas doces palavras para eu entrar na pós-graduação;

Renata Mariano pelo ensino, treino nas análises em óleos vegetais, por me colocar pra cima e me dizer que eu era capaz.

Aos funcionários da Embrapa Agroindústria de Alimentos que doaram além de suas horas de trabalho sua dedicação e competência, por serem incansáveis na busca de um resultado didedigno em suas análises:

Laboratório de Físico-Química: Carmine, Simas, Paulo Sergio, Tânia, Marreta.

Laboratório de Cereais e de Reologia: Adriana Minguita e Vanessa.

Laboratório de Bioquímica: Alex e Tatiana.

Planta Piloto: Francisco Carlos de Oliveira

Ao pesquisador Antônio Xavier pelo seu exemplo de responsabilidade, competência e dedicação.

Ao Henrique que paciente ou impacientemente colaborou dando assistência aos meus filhos na minha ausência.

*A todos vocês,
AGRADEÇO.*

RESUMO

SILVA, Bárbara Amorim. **Destoxificação do Farelo de Mamona (*Ricinus communis* L.) por Extrusão Termoplástica.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma planta da família Euforbiácea que vem sendo muito estudada como fonte alternativa na produção de biodiesel. O farelo, resíduo gerado após a extração do óleo da semente utilizando solvente, apresenta alto teor de proteínas. Dentre as proteínas encontradas na torta destaca-se a ricina, uma citotoxina, que inviabiliza sua utilização como fonte protéica alternativa para alimentação animal. No presente estudo empregamos a extrusão termoplástica, associada à aplicação de hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 com o objetivo de inativar a fração protéica que contem a ricina. O processo de extrusão do farelo de mamona foi realizado utilizando uma extrusora BRABENDER DS20 de canhão curto. Utilizou-se a metodologia de superfície de resposta para verificar o efeito da interação dos parâmetros estabelecidos no estudo. Foi utilizado um delineamento composto central rotacional a fim de avaliar os efeitos dos níveis de umidade (14%, 16%, 20% e 21%), temperatura (116°C, 130°C, 150°C, 170°C e 180°C) e concentração Ca(OH)_2 . Como amostra comparativa foi utilizada sementes de mamona da cultivar Paraguaçu as quais foram esmagadas em prensa expeller até extrair o óleo e cuja torta foi utilizada como padrão por apresentar maior integridade das cadeias polipeptídicas. Para a avaliação das características físico-químicas, foram utilizados métodos da AOAC, para quantificação de proteínas foi utilizado o método de Bradford e para avaliação do perfil protéico foi utilizada a eletroforese-SDS-PAGE, através do sistema de eletroforese da marca Biorad com a metodologia de preparação dos géis descrita por Laemmli (1970). Os métodos de purificação usando a diálise e precipitação com sulfato de amônio favoreceu para um bom rendimento quanto ao teor de proteína, principalmente a ricina. A aplicação dos extratos da torta de mamona no gel de eletroforese permitiu a observação nítida das cadeias A (RTA) massa molar 38 kDa e B (RTB) massa molar 36kDa. Para o extrato protéico do farelo bruto a massa molar das cadeias A e B ficaram em torno 37 kDa e 35 kDa respectivamente. Os níveis de proteína extraída do farelo diminuíram 89% após a extrusão. Os resultados indicaram que todos os tratamentos realizados modificaram totalmente a estrutura da ricina, com possibilidade de ter havido hidrólise total desta macromolécula. De acordo com os ensaios realizados e resultados observados, conclui-se que o processo de extrusão termoplástica é uma tecnologia adequada para diminuir a atividade da ricina.

Palavras-chave: Citotoxina, Eletroforese, Resíduo agroindustrial

ABSTRACT

SILVA, Bárbara Amorim. **Detoxification of castor oil (*Ricinus communis* L.) Thermoplastic Extrusion**. 2011. Dissertation (Master in Food Science and Technology). Instituto de Tecnologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008. Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

The castor bean (*Ricinus communis* L) is a plant family Euphorbiaceae. Considered an oil of high economic value because this has a clearly defined market for the oil extracted from its seeds. The cake, which is a residue of this extraction, stands out for its high protein content. Among the proteins found in the cake stands ricin, a cytotoxin, which not allows its use as an alternative protein source for animal feed. In this study was used the extrusion-cooking technology, combined application of calcium hydroxide Ca(OH)_2 in order to inactivate the protein fraction containing ricin. The extrusion process of cake castor oil was carried out using a Brabender DS20 cannon short. Was used the response surface methodology to investigate the effect of the interaction of parameters in the study. Was used a central composite design in order to evaluate the moisture effects (14%, 16%, 18%, 20%, and 21%), temperature (116°C, 130°C, 150°C, 170°C and 180°C) and concentration of Ca(OH)_2 . As a comparative sample was used castor beans which were crushed to extract oil and cake which used as a sample without heat treatment, as standard. For the evaluation of physical-chemical, it was utilized methods of AOAC. The quantification of proteins was realized using the method of Bradford and the protein profile was electrophoresis-SDS-PAGE. Was used to mark the Biorad electrophoresis the methodology observed using the of preparation of the gels described by LaemmLi (1970). The results indicated that most of the different treatments performed totally changed the structure of ricin. Indizately the possibility of total hydrólise of this macromolecule. The application of extracts of castor oil in the gel electrophoresis allowed the observation of a clear chain A (RTA) and 38 kDa molecular weight B (RTB) molecular weight 36kDa. For the crude protein extract of bran molar mass chains A and B were approximately 37 kDa and 35 kDa respectively. The levels of protein extracted from the bran decreased 89% after extrusion. The results indicated that all treatments changed entirely the structure of ricin with the possibility of their having been a total hydrolysis of the polymer. According to tests performed and observed results, we conclude that the thermoplastic extrusion process is a suitable technology to decrease the activity of ricin.

Keywords: Electrophoresis, Cytotoxin, Agro-industry waste.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Área plantada, produtividade e produção de mamona no Brasil, 2000/2010	5
Tabela 2.	Evolução dos preços reais – Rotterdam.	6
Tabela 3.	Níveis das variáveis independentes codificadas para o delineamento de composto central das soluções tampão para a extração das proteínas.	18
Tabela 4.	Delineamento completo do desenho experimental das soluções tampão.	19
Tabela 5.	Níveis das variáveis independentes codificadas para o delineamento de superfície de resposta do processo de extrusão do farelo de mamona.	19
Tabela 6.	Delineamento completo do desenho experimental do processo de extrusão do farelo de mamona.	20
Tabela 7.	Teste F da análise de variância, coeficiente de regressão e respectivas probabilidades do modelo de regressão quadrática aplicada à densidade dos extrudados.	32
Tabela 8.	Teste de Tukey da densidade dos extrudados de farelo de mamona.	33
Tabela 9.	Composição centesimal da torta de mamona g/100g.	34
Tabela 10.	Composição centesimal do farelo de mamona g/100g.	35
Tabela 11.	Análise centesimal do farelo de mamona extrudado g/100g em base úmida.	36
Tabela 12.	Quantificação de proteína extraídas da torta de mamona.	38
Tabela 13.	Teste F da análise de variância para as soluções tampão	38
Tabela 14.	Resultados da extração de proteínas do farelo de mamona.	43
Tabela 15.	Comparação entre os métodos de Kjeldhal e Bradford quanto ao teor de proteína quantificada e extraída após extrusão.	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Frutos da mamoneira (A); Sementes da mamona (B).	4
Figura 2.	Semiárido potencial produtor de oleaginosas.	5
Figura 3.	Corte longitudinal de semente de <i>Ricinus communis</i> .	6
Figura 4.	Corpúsculo protéico no endosperma de semente de mamona.	8
Figura 5.	Estrutura tridimensional da ricina.	10
Figura 6.	Fórmula estrutural da ricinina.	10
Figura 7.	Desenho esquemático de uma extrusora monorosca.	14
Figura 8.	Semente de mamona cultivar Paraguaçu	16
Figura 9.	Prensa Hidráulica	16
Figura 10.	Farelo de mamona procedente da Bom Brasil Óleo de Mamona Ltda.	17
Figura 11.	Fluxograma de extração e purificação parcial das proteínas.	27
Figura 12.	Classificação granulométrica do farelo de mamona.	30
Figura 13.	Extrudado do farelo de mamona.	31
Figura 14.	Superfície plotada do teor de proteína extraída da torta de mamona	39
Figura 15.	Padrão de identidade das proteínas extraídas de torta de mamona em diferentes soluções tampão.	40
Figura 16.	Seqüência de purificação do extrato protéico de torta de mamona.	41
Figura 17.	SDS-PAGE do extrato protéico do farelo de mamona extrudado – Ensaio 1ao 13.	44
Figura 18.	SDS-PAGE do extato protéico do farelo de mamona extrudado – Ensaio 14 ao 20	45
Figura 19.	SDS- PAGE do precipitado protéico - Ensaio 1 ao 12.	46
Figura 20.	SDS-PAGE do precipitado protéico - Ensaio 13 ao 20.	47
Figura 21.	SDS-PAGE dos tratamentos com farelo de mamona.	48
Figura 22.	Avaliação do grau de hidrólise de proteínas no farelo de mamona por Kjeldahl após a extrusão.	50
Figura 23.	Avaliação do grau de hidrólise de proteínas no farelo de mamona por Bradford após a extrusão.	50

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfato de amônio
°C	graus Celsius
AACC	Association of Official Agricultural Chemists
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Ca(OH) ₂	hidróxido de cálcio
CaO	xido de cálcio
CB1-A	castor bean allergen
CCD	delineamento composto central
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
FB1	extrato protéico do farelo bruto (sem tratamento) - Moagem grossa
FB2	extrato protéico do farelo bruto (sem tratamento) - Moagem Fina
FBP	farelo bruto (sem tratamento) precipitado com sulfato de amônio
GL	grau de liberdade
H ₂ SO ₄	cido sulfúrico
HCl	cido clorídrico
kDa	quilo Dalton
KOH	hidróxido de potássio
MPa	mega pascal
MQ	quadrado médio
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NNP	nitrogênio não protéico
NRC	National Research Council
NT	nitrogênio protéico
PAM	padrão de alta massa molecular
PBM	padrão de baixa massa molecular
Rpm	rotações por minuto
RTA	Ricin A-chain
RTB	Ricin B-chain
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SQ	soma dos quadrados
TEMED	tetrametiletenodiamina
TRIS	tris (hidroximetil) aminometano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Justificativas	2
1.2	Objetivos	2
1.1.1	Objetivo geral	2
1.1.2	Objetivos específicos	2
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Mamona	3
2.1.1	Aspectos agronômicos	3
2.1.2	Aspectos econômicos	4
2.2	Estrutura e composição das sementes de mamona	6
2.3	Proteínas de reserva	7
2.4	Torta de Mamona	9
2.4.1	Compostos tóxicos e alergênicos da torta de mamona	9
2.4.2	Métodos para detecção de ricina	11
2.4.3	Métodos para destoxicação da torta de mamona	12
2.5	Processo de extrusão	13
2.5.1	Extrusão termoplástica aplicada a tecnologia de alimentos	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	Obtenção das Matérias-Primas	16
3.2	Planejamento Experimental	17
3.3	Análise Estatística	21
3.4	Classificação Granulométrica	21
3.5	Pré-Condicionamento da Matéria-Prima para Extrusão	21
3.6	Processo de Extrusão	22
3.7	Índice de Expansão Radial (IER)	22
3.8	Composição centesimal	22
3.8.1	Umidade	23
3.8.2	Cinzas	23
3.8.3	Extrato etéreo	23
3.8.4	Fibra	24
3.8.5	Nitrogênio total	24
3.8.6	Nitrogênio não protéico	25
3.9	Análises de proteínas	26
3.9.1	Preparação do extrato protéico	26
3.9.2	Precipitação com sulfato de amônio	27
3.9.3	Solubilização da amostra protéica	27
3.9.4	Quantificação colorimétrica das proteínas	28
3.9.5	Eletroforese desnaturante em SDS-PAGE	28
3.9.5.1	Preparo e polimerização dos géis de acrilamida	28
3.9.5.2	Preparo e aplicação da amostra no gel e corrida	28
3.9.5.3	Coloração e revelação dos géis de poliacrilamida	29

3.9.5.4	Secagem do gel	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	Granulometria	30
4.2	Índice de Expansão Radial	31
4.3	Densidade Aparente	32
4.4	Caracterização Química	34
4.4.1	Composição química da torta de mamona	34
4.4.2	Composição química do farelo de mamona	35
4.4.3	Composição química do farelo de mamona extrudado	35
4.5	Quantificação e Identificação de Proteínas	37
4.5.1	Proteína da torta de mamona	37
4.5.2	Proteína do farelo de mamona extrudado	41
4.5.3	Avaliação do grau de hidrólise das proteínas do farelo de mamona	49
5	CONCLUSÕES	51
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

A necessidade do crescimento da produção de sementes oleaginosas está relacionada com a produção de bicombustíveis implementada pelo governo federal como alternativa ao uso de combustíveis fósseis, proporcionando a produção de óleos vegetais e o aproveitamento de subprodutos de modo sustentável.

A extensão territorial do Brasil e a variedade de clima contribuem para o cultivo de diversas oleaginosas com alto potencial para a produção do bicombustível.

Dentre as oleaginosas com domínio tecnológico estão amendoim, algodão, soja, girassol, gergelim, canola e dendê. Com baixo domínio tecnológico e/ou exploração extrativista, tem-se: pinhão-manso, macaúba, babaçu e outras. (BELTRÃO *et al.*, 2006).

A mamona se adapta a qualquer solo da região do Brasil, com produtividade de sementes contendo alto teor de óleo (47%). O óleo tem larga aplicação na indústria têxtil farmacêutica e de biocombustível. A torta de mamona é um subproduto da extração do óleo das sementes da mamoneira (*Ricinus comunis L.*). Trata-se de um produto com elevado teor de proteínas. A torta de mamona tem sido usada como adubo orgânico, pelo elevado teor de nitrogênio e presença de outros macronutrientes, mas é considerada como um produto de baixo valor agregado se comparado com sua aplicação como alimento animal. O uso da torta como ração animal agregaria valor ao coproduto do biodiesel, sua utilização só seria possível diante a destoxificação e a desalerginação, pois possui em sua composição ricina (1,5%), ricinina (0,23%) e complexos alergênicos (0,09 a 4,20%). (ICOA, 1989).

A ricina é uma proteína encontrada exclusivamente no endosperma das sementes de mamona, não sendo detectada em outras partes da planta, como raízes, folhas ou caules. Ela é a principal responsável pela toxidez da torta de mamona e está entre as proteínas de maior toxidez conhecida pelo homem (MOSKIN, 1986). Esta proteína pertence à família das proteínas inibidoras de ribossomo (RIPs) do tipo II (OLSNES, 2004; LORD *et al.* 1994; MONZINGO *et al.*, 1993). Na sua forma enzimática ativa tem como mecanismo de ação atuações diferenciadas das cadeias A ou RTA (32 kDa) e B ou RTB (34 kDa). A cadeia A da ricina (32kDa) é uma enzima com atividade N-glicosídica (LORD *et al.*, 1994) que permite a remoção de um resíduo de adenina no “loop” de rRNA (RNA ribossomal 28s). Causa a inativação específica e reversível dos ribossomos eucarióticos, bloqueando a síntese de proteína. (OSLES, 2004).

Este trabalho trata de encontrar alternativas para desativar a ricina, pois esta é o principal entrave ao uso do produto como alimento animal.

Alguns processos para destoxificação da torta de mamona já foram testados, e pesquisas mostraram que os métodos empregados conseguiram inativar a ricina e o princípio alergênico da torta, porém ainda não definidos, validados e ainda não avaliados quanto a sua viabilidade técnico-econômica.

Estudos preliminares foram realizados utilizando a extrusão com a finalidade de eliminar os compostos tóxicos da torta de mamona. Porém, poucos resultados conclusivos forma encontrados. Neste trabalho foram abordados diferentes tratamentos, considerando temperatura, umidade de processamento do material e concentração de Ca(OH)₂. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para verificar os efeitos dos tratamentos e sua otimização quanto ao grau de destoxificação por extrusão termoplástica. A avaliação dos diferentes tratamentos quanto à presença dos compostos tóxicos foram realizados por eletroforese. Portanto, nesta dissertação foram exploradas as alternativas tecnológicas que mostrem a mudança estrutural e possível hidrólise destes componentes tóxicos,

especificamente a ricina, bem como definir as características de composição físico-química visando à alimentação animal do produto obtido.

1.1 Justificativas

A geração de resíduos nas indústrias esmagadoras de sementes de mamona vem aumentando em consequência da alta escala de produção do biodiesel. Pelo fato do biodiesel fazer parte da matriz energética brasileira e a mamona ser uma cultura que se adapta a maioria das regiões do Brasil, o Governo Federal vem incentivando o aumento do cultivo desta oleaginosa de modo a cumprir normas estabelecidas pelo programa do biodiesel de adicionar 5% de bicomcombustível ao diesel até 2013.

A torta de mamona é considerada um coproduto da indústria do biodiesel, esta é altamente tóxica e alergênica, o que implica na implementação de processos de destoxificação e desalergenização para posteriores uso na indústria de ração animal.

A disponibilidade dessa torta destoxificada a preço competitivo poderá dar grande impulso a esse importante setor da economia. A agregação de valor obtida através deste processo contribuirá para maior remuneração tanto para o produtor rural quanto para a indústria.

Uma das possibilidades para destoxificação da torta de mamona é dada através da adição de hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 . Apesar de a desativação alergênica ser citada em diversos estudos, os métodos utilizados até então não foram validados.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a destoxificação da torta de mamona por extrusão termoplástica, desenvolvendo esta tecnologia para o uso da torta de mamona como matéria-prima na indústria de ração animal.

1.2.2 Objetivos específicos

- Utilizar o processo de extrusão com a finalidade de mudar estruturalmente a ricina através de variações de parâmetros como: temperatura, umidade e proporção de Ca(OH)_2 ;
- Processar a torta de mamona por extrusão termoplástica, segundo as variáveis determinadas;
- Adequar e/ou desenvolver um o método de análise do perfil protéico das amostras de mamona por eletroforese SDS-PAGE;
- Analisar o perfil protéico dos produtos processados e não processados por eletroforese de proteínas (SDS-PAGE);
- Determinar parâmetros físico-químicos das amostras analisadas da torta de mamona.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mamona

2.1.1 Aspectos agronômicos

A mamona é cientificamente denominada *Ricinus communis* L. e é uma planta da família Euforbiácea, apresentando-se na forma de arbusto ou arvoreta, com folhas grandes, classificadas como palmatilobadas. O fruto é uma cápsula com espinhos, com três divisões e uma semente oleaginosa em cada uma destas divisões (BELTRÃO *et al.*, 2006).

As cultivares atuais de mamoneira utilizadas para a produção são classificadas segundo seu porte e o grau de deiscência (abertura) do fruto maduro. Quanto ao porte, pode ser baixo com até 1,8 m; médio, entre 1,8-2,5 m; e alto, com 2,5 a 5,0 m. Quanto à deiscência do fruto são classificadas como deiscente, com abertura total; semideiscente, com abertura parcial e indeiscente, sem abertura do fruto (SOUZA *et al.*, 2004).

Atualmente admite-se que o gênero *Ricinus* seja monotípico com cinco subespécies e 25 variedades botânicas, deste modo tem-se grande diversidade entre elas, em termos de tamanho, coloração das folhas e do caule, porte, hábito de crescimento, conteúdo de óleo nas sementes, peso das sementes (SAVY FILHO *et al.*, 1999; BELTRÃO, 2002).

Nas regiões tropicais a mamoneira apresenta ciclo de 250 a 300 dias apresentando floração com apenas 50 a 60 dias da germinação. (BELTRÃO, 2002).

A mamoneira é uma planta heliófila, ou seja, deve ser plantada com exposição direta ao sol e não tolera sombreamento. Tem grande tolerância ao estresse hídrico, mas é exigente em fertilidade do solo. Embora tolere a seca, com boa disponibilidade de água, sua produtividade é muito maior. Também pode ser plantada sob irrigação (FREIRE, 2001).

Para cada condição climática e nível tecnológico deve-se procurar escolher uma cultivar apropriada, pois há grande variação nas características das variedades plantadas no Brasil.

A época de plantio deve ser determinada de forma a aproveitar ao máximo o período chuvoso, mas sendo a colheita feita em época seca. Para isso, deve-se observar o ciclo da cultivar a ser plantada e o início e fim do período chuvoso (BELTRÃO *et al.*, 2006).

A mamoneira é muito exigente em fertilidade do solo, tendo produtividade muito alta em solos de alta fertilidade natural ou que receberam adubação em quantidade adequada. Deve-se sempre fazer a análise de solo e fornecer a quantidade de fertilizantes recomendada pelo laudo técnico. Mesmo sob intenso déficit hídrico a mamoneira é capaz de aproveitar a adubação, o que diminui o risco dessa prática, principalmente em zona semiárida. A adubação em excesso pode ser prejudicial à produtividade, principalmente nas cultivares de porte médio e crescimento indeterminado, pois pode provocar crescimento excessivo e queda na produtividade (BELTRÃO *et al.*, 2006).

A mamoneira é cultivada desde 40 °S a 52 °N nos dois hemisférios da Terra tendo seu ótimo ecológico em locais com altitude de 300 a 1500 metros. Porém não suporta frio e necessita de precipitações pluviais mínimas de 500 mm, para produzir satisfatoriamente (WEISS, 1983).

A mamona é uma planta de clima tropical, prefere temperatura do ar variando entre 20 e 30 °C e solos poucos argilosos (SILVA, 2008).

O óleo é o mais importante constituinte da semente de mamona com inúmeras aplicações industriais, como plástico, fibras sintéticas, tintas, esmaltes, lubrificantes dentre outros.



Figura 1. Frutos da mamoneira (A); Sementes da mamona (B).
Fonte: Grupo Rural.

2.1.2 Aspectos econômicos

A mamoneira é uma planta de alto valor econômico. O óleo extraído das sementes (óleo de rícino ou castor oil) é considerado o melhor óleo vegetal para fins industriais, pois, não muda as suas características, em altas e baixas temperaturas. A cadeia carbônica do ácido graxo ricinoléico (89,5%) na sua composição proporciona sítios em que são realizadas reações químicas, com obtenção de gama variada de derivados pela modificação da estrutura da cadeia carbônica. O óleo de mamona é utilizado como matéria-prima para fabricação de ceras, lubrificantes, cosméticos, tintas, esmaltes, resinas materiais elétricos e biocombustível (SEVERINO *et al.*, 2005).

No Brasil a área de maior produção é a do Semiárido baiano. A Bahia é o maior produtor isolado de mamona, com 77% da produção nacional. Carfanaum e Ourolândia são os maiores produtores de mamona em baga. (TEIXEIRENSE, 2010).

Segundo dados da Conab apesar da redução da área plantada em 1,7% para safra 2009/2010 o Brasil vem alcançando valores expressivos com tendência para alta com relação a produtividade e produção. Comparando a safra de 2009/2010 com a safra 2008/2009 (Tabela 1) a produtividade teve um acréscimo de 21,5% (587 kg/ha para 713 kg/ha) e a produção de 19,4% (92.5 para 110.4 mil toneladas). Em 2009 o valor médio da saca de 60 kg alcançou uma média de R\$ 72,12 (TEIXEIRENSE, 2010).

A Figura 2 mostra as áreas produtoras de mamona, bem como as regiões com aptidão para este cultivo.



Figura 2. Semiárido potencial produtor de oleaginosas.
Fonte: ROUSSEFF, 2004.

Tabela 1. Área plantada, produtividade e produção de mamona no Brasil, 2000/2010.

Ano	2000/ 2001	2001/ 2002	2002/ 2003	2003/ 2004	2004/ 2005	2005/ 2006	2006/ 2007	2007/ 2008	2008/ 2009 Previsão (1)	2009/ 2010 Estimativa (2)
Área Plantada	161.4	126.1	128.3	166.2	215.1	147.9	155.6	162.7	157.5	154.8
Produtividade (kg/ha)	495	574	673	646	975	703	602	758	587	713
Produção (Mil toneladas)	79.9	72.4	86.3	107.3	209.8	103.9	93.7	123.3	92.5	110.4

Fonte: TEIXEIRENSE (2010)

(1) Dados Preliminares: sujeitos a mudanças

(2) Dados Estimados: sujeitos a mudanças

A Índia e a China são os maiores produtores internacionais de óleo e semente de mamona. A China consome toda sua produção internamente, não participando do mercado internacional, ao contrário da Índia que se coloca como grande concorrente do Brasil. Os preços reais internacionais, se comparados aos praticados no ano passado, (abril/09/maio/10), tiveram aumento de 23,5%, como pode ser visto no Quadro 3, tendência altista observada nos preços de óleo de mamona, se fundamenta na demanda internacional que tem dado suporte para este comportamento. (TEIXEIRENSE, 2010).

Tabela 2. Evolução dos preços reais – Rotterdam.

US\$ Tonelada												
Ano	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez
2005	1.199	1.617	1.166	1.158	1.156	1.142	1.135	1.134	1.096	1.073	1.058	1.047
2006	1.021	997	997	985	962	956	960	1.008	1.037	1.124	1.209	1.209
2007	1.199	1.203	1.237	1.272	1.361	1.336	1.333	1.342	1.321	1.338	1.371	1.384
2008	1.469	1.522	1.631	1.642	1.636	1.645	1.643	1.775	1.846	1.686	1.624	1.631
2009	1.559	1.471	1.413	1.275	1.272	1.262	1.264	1.261	1.403	1.401	1.394	1.405
2010	1.571	1.582	1.575	1.575								

Fonte: TEIXEIRENSE (2010).

2.2 Estrutura e composição das sementes de mamona

A semente pode ser definida como um óvulo maduro e fecundado, contendo em seu interior substâncias de reserva (às vezes ausentes), ambas protegidas por um ou dois envoltórios (casca) (BEWLEY e BLACK, 1985). A reserva é representada pelo albúmen ou endosperma, no qual o embrião fica mergulhado.

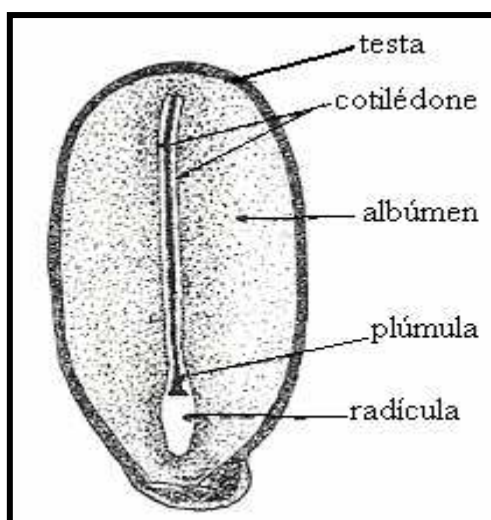


Figura 3. Corte longitudinal de semente de *Ricinus communis*.
Fonte: LIMA *et al.* (2006).

O endosperma fornece reservas de substâncias que irão suprir as necessidades do embrião do desenvolvimento à germinação (MACHADO, 1992).

A testa, casca da semente, pode apresentar várias formas e normalmente é utilizada taxonomicamente para distinguir diferentes gêneros e espécies. A testa é a barreira protetora entre o embrião e o meio externo. (BEWLEY e BLACK, 1985).

Segundo Copeland (1976), durante a germinação da semente, a plúmula desenvolve-se e dá origem ao caule, a radícula dá origem à raiz primária.

A composição química das sementes é determinada por fatores genéticos, portanto, varia muito entre as espécies. Práticas agrícolas, adubação, época do plantio e condições ambientais, podem influenciar uma mudança nos teores de carboidratos, lipídeos e proteínas. Estes elementos são utilizados pelo embrião como fonte de energia e substrato para estruturas celulares. (BEWLEY e BLACK, 1985).

As reservas alimentares das sementes estão dispostas em diferentes órgãos de reservas e em diferentes proporções. Os carboidratos, lipídios e proteínas são os primeiros a serem armazenados. Outros constituintes estão presentes em menor taxa de armazenamento. Os minerais, por exemplo, se concentram nos tecidos estruturais e no tegumento (BEWLEY e BLACK, 1985).

A semente de mamona apresenta relativo percentual de proteínas, sendo as proteínas os componentes básicos de toda célula viva. São polímeros de aminoácidos sintetizados biologicamente na célula e funcionam como enzimas, componentes estruturais, biossinalizadores e materiais de reserva. (VOET e VOET, 1995).

2.3 Proteínas de reserva

Metabolicamente, as proteínas das sementes se dividem em ativas, como as enzimas e núcleo-proteínas, e metabolicamente inativa, que são as proteínas de reserva, cuja composição varia de acordo com as espécies. As sementes dos cereais apresentam, em geral, menor teor de proteínas, quando comparadas às leguminosas e às sementes oleaginosas (BEWLEY e BLACK, 1985).

O embrião detém a maior concentração de proteína quando comparado os tecidos das sementes. Em cereais, as maiores concentrações estão no embrião e na camada de aleuroma, que é a camada de células que reveste o endosperma (KENT, 1971).

De acordo com a classificação de Osborne (1924), as proteínas das sementes podem ser divididas em quatro classes, em função da sua solubilidade:

- albuminas - solúveis em água e em tampões diluídos com pH neutro;
- globulinas - solúveis em soluções salinas, mas insolúveis em água;
- glutelinas - solúveis em soluções ácidas e alcalinas diluídas;
- prolaminas - solúveis álcool hidratado (70-90%).

Segundo Machado (1992), as proteínas de reserva são oligoméricas e suas subunidades são cadeias polipeptídicas bastante homólogas, geralmente ricas em glutamina.

A albumina constitui reserva de alguns cereais como milho, e está armazenada no embrião. Após a metade do desenvolvimento da semente, o acúmulo de albumina decresce.

As albuminas de coeficiente de sedimentação 2S são proteínas de reserva presentes no farelo de mamona numa concentração de 1,8% (SAVY FILHO *et al.*, 2005). Elas são proteínas tipicamente heterodiméricas, compostas por uma subunidade pesada e uma leve com massa molecular aproximada de 9 kDa e 4 kDa (MACHADO *et al.*, 2003). Algumas proteínas deste grupo são inibidoras de proteases, outras são enzimas e algumas alergênicas. (MACHADO, 1992).

As principais proteínas de reserva são as globulinas. As globulinas consistem de 2 famílias com peso molecular e coeficiente de sedimentação 7s (grupo das vacilinas) e 11s (grupo das leguminas). Já as glutelinas e as prolaminas constituem reservas dos cereais (arroz, milho, centeio, trigo).

As proteínas de reserva encontram-se normalmente depositadas em organelas celulares denominadas corpúsculos de proteína. O diâmetro dessa organela varia de 0,1 a 25 μm , é envolvida, pelo menos durante o seu desenvolvimento, por uma membrana simples. Estes corpúsculos podem ocorrer em todo o embrião ou endosperma, ou, outras vezes, restringem-se a uma camada (camada de aleurona). Alguns corpúsculos protéicos são simples em sua estrutura, consistindo de uma matriz protéica circundada por uma membrana. Inclusões freqüentemente ocorrem, particularmente em cristalóides ou globóides e, mais raramente, em cristais de oxalato de cálcio. Os cristalóides são inclusões proteínáceas insolúveis (em água ou tampão) “acomodadas” na matriz solúvel da proteína. Por exemplo, em semente de mamona o cristalóide é uma proteína insolúvel 11 S e a matriz é feita de proteínas solúveis 2 S e 7 S,

incluindo lectinas. Globóides são estruturas monocristalinas e globulares e são as inclusões mais comumente encontradas em corpúsculos de proteínas (Figura 4). Contudo, eles variam em tamanho e número. Em algumas espécies os globóides são encontrados em corpúsculos de proteínas, em algumas regiões da semente, mas não em outras (por exemplo, as camadas protéicas de aleurona – grãos de aleurona – em cereais, geralmente contêm globóides, contudo, o endosperma nunca os contém). Globoídes são sítios de deposição de fitina – sais de magnésio, potássio e cálcio de ácido fítico. (BEWLEY e BLACK, 1985).

Nem todas as proteínas de reservas das sementes têm características nutricionais desejáveis. Inibidores enzimáticos podem reduzir a eficiência das hidrolases, etc., no trato digestivo de animais. Lectinas, as quais são usualmente glicoproteínas, têm a capacidade de se ligar com a superfície das células de animais, muitas vezes causando aglutinação, especialmente em eritrócitos. (BEWLEY e BLACK, 1985).

Alguns corpúsculos protéicos são simples em sua estrutura, consistindo de uma matriz protéica circundada por uma membrana. Ocorrem com frequência inclusões de cristalóides ou globóides e, mais raramente, de cristais de oxalato de cálcio. Os cristalóides são inclusões proteináceas insolúveis (em água ou tampão) “acomodadas” na matriz solúvel da proteína. Por exemplo, na semente de *Ricinus communis*, o cristalóide é uma proteína insolúvel 11 S e a matriz é feita de proteínas solúveis 2 S e 7 S, incluindo lectinas.

Globóides são estruturas monocristalinas e globulares e são as inclusões mais comumente encontradas em corpúsculos de proteínas (Figura 4). Contudo, eles variam em tamanho e número. Muitas enzimas podem ocorrer juntamente aos corpúsculos de proteína e, durante a mobilização de reservas, outras enzimas podem ser adicionadas, de forma que, eventualmente, a estrutura se transforme em um vacúolo autolítico. Como exemplos, nos casos de trigo e cevada, α -amilase, α -glucosidase (maltase), protease, dipeptidase, esterase, fitase e nitrito-redutase (SIMMONDS e ORTH, 1973).

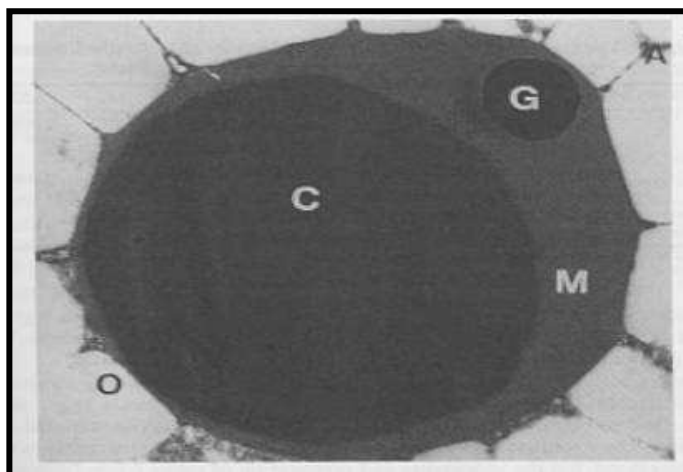


Figura. 4. Corpúsculo protéico no endosperma de semente de mamona. Globóide (G), contendo fitina, a proteína cristalóide (C) envolta pela matriz protéica (M). O corpúsculo de proteína é envolto por corpúsculos de óleo.
Fonte: Bewley e Black (1985).

2.4 Torta de Mamona

Após a extração do óleo por prensagem, uma massa orgânica conhecida como torta de mamona fica retida nos filtros.

A torta bruta, sem sofrer nenhum tipo de tratamento tem sido muito utilizada como adubo orgânico (AZEVEDO *et al.*, 2001).

A torta da mamona tem elevado valor nutritivo, sendo rica em proteínas (41,51%), fibras (32,84%), materiais minerais (7,65%) e gorduras (2,62%). Também utilizada como matéria-prima para a produção de aminoácidos. Os seguintes aminoácidos fazem parte da constituição das proteínas presentes na torta: (11,0%), cistina (3,5%), fenilalanina (4,2%), histidina (11,0%), isoleucina (5,3%), leucina (7,2%), lisina (3,1%), metionina (1,5%), tirosina (1,0%), treonina (3,6%), triptofano (0,6%) e valina (6,6%) (BELTRÃO, 2002).

O uso da torta como ração animal agregaria valor ao coproduto do biodiesel, no entanto, sua utilização só seria possível diante a destoxificação, pois possui em sua composição proteínas alergênicas e tóxicas (ICOA, 1989). Estes compostos tóxicos limitaram, até então, o uso da torta sendo seu principal emprego na indústria de fertilizantes e como fonte de nitrogênio na recuperação de solos.

2.4.1 Compostos tóxicos e alergênicos da torta de mamona

Os principais componentes tóxicos da torta de mamona são ricina, uma proteína, e a ricinina, um alcaloide. O complexo CB-1A é composto por proteínas e polissacarídeos.

A ricina é uma glicoproteína da família das lectinas, constituída por duas cadeias A e B, ligadas covalentemente por pontes de dissulfeto. Esta proteína pertence à família das proteínas inibidoras de ribossomo (RIPs) do tipo II (OLSNES, 2004; LORD *et al.*, 1994; MONZINGO *et al.*, 1993). Na sua forma enzimática ativa tem como mecanismo de ação atuações diferenciadas das cadeias A ou RTA (32 kDa) e B ou RTB (34 kDa). A cadeia A da ricina (32 kDa) é uma enzima com atividade N-glicosídica (LORD *et al.*, 1994) que permite a remoção de um resíduo de adenina no “loop” de rRNA (RNA ribossomal 28s). Causa a inativação específica e reversível dos ribossomos eucarióticos, bloqueando a síntese de proteína. Este ciclo está envolvido na ligação da cadeia A na fase de alongamento da cadeia polipeptídica, modificando estruturalmente os ribossomos, tornando-os incapazes de realizar a síntese de proteínas (ENDO, GLÜCK e WOOL, 1991). A cadeia B (RTB cerca de 34 kDa) é uma lectina (LORD *et al.*, 1994) que se liga a galactose ou a N-acetilgalactosamina das glicoproteínas da superfície da célula promovendo desta maneira a endocitose da cadeia A no citosol. (ENDO e TSURUGI, 1987). A toxina é potencialmente letal para os seres humanos, se inalada, ingerida ou injetada (AUDI *et al.*, 2005).

Segundo Fodstad *et al.*, (1976), a dose letal injetada para acamundongos é de 5 a 10g/kg para e para coelhos varia de 1 a 1,75 g/kg. Para seres humanos, 5 sementes de mamona podem ser letal.

A cadeia A, chamada de RTA, possui predominância do padrão α -hélice (36%) a Figura 5 (A) mostra estrutura α -hélice (vermelho) e as alças (cinza) da cadeia A.

A cadeia B ou RTB tem a maior quantidade de estrutura secundária, folha- β , (37%) dividida em dois domínios iguais tridimensionalmente, cada um possuindo dois pares de pontes dissulfeto e uma galactose.

A Figura 5 (A) mostra em verde a cadeia B. (HARTLEY e LORD, 2004; MONTFORT *et al.*, 1987).

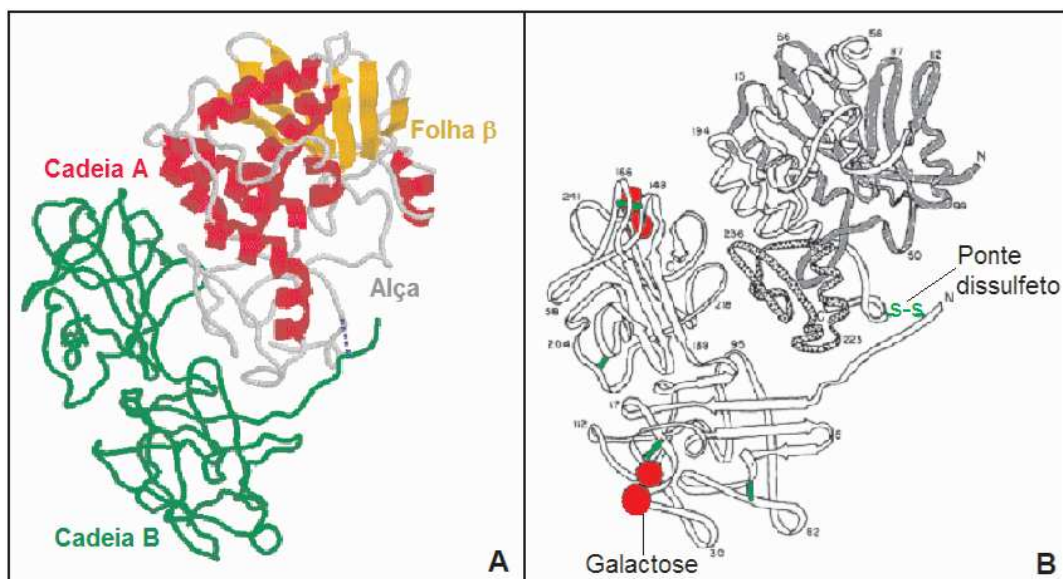


Figura 5. Estrutura tridimensional da ricina. Em verde, a cadeia B; em vermelho, as α -hélices da cadeia A . (esquerda.); em laranja, as folhas- β da cadeia A; em cinza, as alças da cadeia A. B.(direita). Acima a cadeia A; abaixo a cadeia B; em vermelho, as galactoses; em verde, as pontes dissulfeto.

Fonte: Lima (2007)

A ricinina é um alcaloide tóxico de massa molar 164,2 kDa (ou g/mol), conhecido como diidro-4metox-metil-2-oxo-3piridenocarbonila, $C_8H_8N_2O_2$ (Figura 6) (CHIERICE e CLARO NETO, 2001). Este alcaloide pode ser encontrado em todos os órgãos da planta, podendo ser detectado desde as fases iniciais de desenvolvimento (HOLFELDER, 1998). O teor de ricinina varia muito entre diferentes partes da planta: 1,3% nas folhas (matéria seca), 2,5% em plântulas estioladas, 0,03% no endosperma da semente e 0,15% na casca da semente (MOSHKIN, 1986). O teor do alcalóide nas sementes é influenciado por características genéticas ou por estresses ambientais. No fruto, o teor de ricinina é alto na cápsula externa, médio na casca da semente e pequeno no endosperma da semente (Moshkin, 1986). A ricinina pode provocar reações cutâneas, vômitos, dores abdominais fortes, sede extrema, diarreia com sangramento, aceleração do batimento cardíaco, convulsões e morte (LEITE *et al.*, 2005)

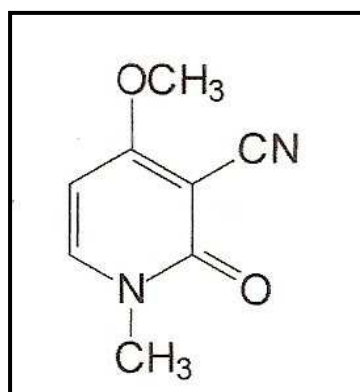


Figura 6. Fórmula estrutural da ricinina.

A fração alergênica é formada por um complexo de proteínas e polissacarídeos denominado CB-1A (Castor Bean Allergen), e representa aproximadamente 12,5% do peso da torta. (BANDEIRA *et al.*, 2004). Segundo Machado *et al.* (2003), este complexo é formado por cerca de 20 isoformas de proteínas heterodiméricas pertencentes a classe das albuminas 2S de massa molecular 10 kDa-18 kDa.

As albuminas 2S possuem altos teores de glutamina, arginina e serina; apresentam distribuição característica de oito cisteínas em um padrão conservado e, geralmente, são compostas de 2 cadeias polipeptídicas diferentes uma de 3-5 kDa e outras de 8-10 kDa ligadas por duas pontes dissulfeto; além de apresentarem duas ligações intra-cadeias, implicando em proteínas muito estáveis e compactas (FERNANDES *et al.*, 2008).

As albuminas 2S são mais resistentes à desnaturação química e térmica, podendo causar alergia mesmo após estes tratamentos (VIEIRA *et al.*, 1997).

O complexo CB-1A está presente na semente, pólen e partes vegetativas da planta. Em pessoas expostas continuamente ao CB-1A podem surgir sintomas alérgicos como conjuntivite, fobia à luz, faringite, dermatite urticária e bronquite asmática, embora não tenham sido constatados sintomas alérgicos em animais (TÁVORA, 1982).

2.4.2 Métodos para detecção de ricina

A ricina é uma das mais potentes fitotoxinas, está entre as três principais substâncias mais tóxicas para o homem, ficando atrás somente do plutônio e da toxina botulínica. (DIVISION OF OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH, 2007). Portanto, é necessária uma metodologia capaz de identificar e quantificar a ricina com elevada precisão.

Um dos métodos para detecção de ricina é a eletrofose capilar com dodecilsulfato de sódio (SDS) em gel de poliacrilamida (ISHIGURO e TAKASHISHI, 1964; KABAT *et al.*, 1947).

O sistema SDS-PAGE consiste na análise de proteínas desnaturadas por aquecimento na presença de SDS e 2-mercaptoetanol. Esta técnica permite a identificação qualiquantitativa de uma determinada proteína, bem como a determinação aproximada de sua massa molecular, na faixa entre 19.200 a 208.000 Daltons. (ALFENAS *et al.*, 1991).

STEPHAN *et al.* (2008) identificaram a ricina através de um ajuste metodológico para eletroforese em SDS-PAGE. Neste estudo foram utilizadas soluções tampão acetato de sódio (0,45 M) e NaCl (0,6 M)/HCl (0,1%) para extrair proteínas da torta de mamona. Foi observado no gel em que foi aplicado o extrato de mamona tratado com solução de HCl/NaCl um típico bandejamento de cadeia polipeptídica que compõe a ricina. Foram observadas as duas cadeias A e B da ricina na faixa de 34,60 kDa. Este bandejamento é similar ao descrito por Narang *et al.* (1997).

Outros métodos para a quantificação de ricina estão sendo usados como: espectrometria de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (UV-VIS), fluorimetria e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) já foram testados (BRITO, 2005). Todos os métodos foram eficientes na determinação das substâncias investigadas, em diferentes níveis de concentração.

Ainda outros métodos têm sido descritos para detecção de ricina, usando biossensor com fibra ótica (NARANG *et al.*, 1997) ou ensaios colorimétrico (POLI *et al.*, 1994). Entretanto, esses ensaios envolvem reagentes marcados (enzimas, fluorocromos, isótopos) e requerem inúmeros passos de incubação (BELTRÃO e OLIVEIRA, 2009).

2.4.3 Métodos para destoxicação da torta de mamona

Muitos processos para destoxicação já foram testados. Desde 1938, já se sabia que o aquecimento a 140°C por 60 a 90 minutos era suficiente para eliminar os princípios tóxicos dessa torta. Em 1940, foi patenteado na Alemanha um processo de destoxicação que consistia em ferver a torta repetidamente por curtos períodos de tempo, com mudança da água após cada fervura. No mesmo ano, também foi concedida uma patente na Bélgica que consistia em eliminar a ricina por extração da torta com halogenatos e hidróxidos alcalinos, seguida de autoclavagem. Em 1941, outra patente foi obtida na Hungria tratando-se a torta com vapor de água e posterior remoção a vácuo, do excesso de umidade. Outra patente foi concedida em 1942 para tratamento da torta com água quente e clorofórmio em ebulição. Em 1949, estudos concluíram que autoclavagem por cerca de 15 minutos, ou tratamento com ácidos ou álcalis diluídos foram eficazes. Apenas o aquecimento a 80 °C não foi suficiente para eliminar os princípios tóxicos.

Gardner Junior *et al.* (1960) testaram diversos processos para destoxificação da torta de mamona, combinando diferentes temperaturas, adição de produtos químicos e outros processos: adição de produtos alcalinos (NaOH, KOH, Ca(OH)₂), amonização, tratamento com diferentes temperaturas, inclusive autoclavagem, tratamentos ácidos, uréia, permanganato de potássio e fermentação aeróbica. Vários desses métodos conseguiram inativar totalmente a ricina e o princípio alergênico da torta, estando entre os melhores o aquecimento seco a 205°C, o cozimento da torta em flocos na presença de 2% de NaOH à pressão de 20 psi e o cozimento com 0,9% de HCl e 3% de CH₂O. Chegou-se à conclusão de que é possível eliminar o princípio tóxico da torta, porém esse estudo não considerou a viabilidade industrial e econômica desses processos, assim como a alteração de características nutricionais e a palatabilidade do produto obtido.

Miranda *et al.* (1961) testaram o uso da torta destoxicada (Lex Protéico) comparada à torta de soja na alimentação de vacas leiteiras. O Lex Protéico não intoxicou os animais e trouxe resultados próximos ao da torta de soja, embora o autor tenha alertado para a necessidade de conduzir experimentos com maior duração para avaliação mais segura do produto.

A destoxificação da torta de mamona, submetida à hidrólise por H₂SO₄ à alta temperatura, pode ser atribuída à hidrólise e/ou desnaturação térmica dos peptídeos tóxicos da mamona (GARDNER JUNIOR *et al.*, 1960; MOSHKIN, 1986).

Bose e Wanderley (1988) estudaram torta de mamona destoxicada em mistura com feno de alfafa em diferentes proporções para alimentação de ovinos, concluindo que a adição de torta de mamona ao feno de alfafa traz benefícios, aumentando a digestibilidade das proteínas e da energia.

Nos experimentos conduzidos por Mackinnon e Alderton (2000) foi demonstrada a viabilidade de desnaturação da ricina utilizando hipoclorito de sódio em concentrações a partir de 20 mM. Nesse caso foi testada a ricina pura e não o tratamento da torta.

Segundo Anandan *et al.*, (2005) o tratamento de 1000 g de torta em autoclave a 15 psi, por 60 min, inativa 100% da ricina. Os mesmos autores afirmam que o tratamento de 1000 g de torta com 40 g de hidróxido de sódio (NaOH) a 60 °C por 8 h, também altera quimicamente a ricina. Deus-de-Oliveira *et al.*, (2007) propuseram obter um tratamento em que a torta ficasse destoxicada e não alergênica, permitindo, assim, maior segurança na manipulação da mesma e uma maior agregação de valor a este produto. Pelos resultados obtidos, no tratamento com hidróxido de cálcio houve redução no percentual de

desgranulação dos mastócitos e, conseqüentemente, na liberação de mediadores, como a histamina tanto em amostras de albumina 2S purificadas quanto na torta bruta.

Ascheri *et al.* (2007) observaram que os tratamentos de extrusão com CaO a 1% e 2% foram eficientes na alteração da ricina, quando avaliada por eletroforese desnaturante. No tratamento com CaO a 2% houve redução nos níveis de alergenicidade da torta, quando comparado ao tratamento com CaO a 1%, que foi ineficiente na desativação do alérgeno.

Existem vários métodos para promover a destoxificação e desalergenização da torta de mamona. Pela avaliação da dose letal em camundongos (DL_{50}), para soluções de peptídeos alergênicos, extraídos da torta de mamona, e do resíduo sólido, obtido após a hidrólise, observou-se que o tratamento com ácido sulfúrico (H_2SO_4), na temperatura e tempo estabelecidos para a hidrólise do amido, foi o responsável pela redução, em pelo menos 237 vezes, da letalidade da torta de mamona *in natura*, não resultando em morte de camundongos, no período de até 96 h (MELO *et al.*, 2008).

Verificou-se a destoxificação da torta de mamona só no armazenamento da mesma sob condições ambientais (sol) e temperatura controlada (estufa), com o aumento da atividade de enzimas proteolíticas e concomitante degradação da ricina. No tratamento com hidróxido de cálcio houve redução na reatividade dos epítomos alergênicos, presentes na albumina 2S purificada ou, presentes na torta de mamona, como evidenciado pelos ensaios de atividade biológica de desgranulação de mastócitos (CRESPO NETO *et al.*, 2008).

A destoxificação da torta de mamona também pode ser feita pelo processo de secagem, aproximadamente a 60°C. Ao atingir essa temperatura, o processo tende a eliminar a ricina com auxílio de uma solução de cloreto de sódio (NaCl) ou, ainda, atingir temperaturas maiores para realizar a destoxificação sem tratamento químico (SILVA, 2007). Ainda segundo o mesmo autor, as tortas tratadas e não tratada em autoclave apresentaram valores mais elevados de ricina, quando comparados com as amostras do secador solar de exposição direta que chegaram a eliminar cerca de 47% e 36%, respectivamente, por um período de secagem de 7 horas.

Gama *et al.*, (2008) desenvolveram uma metodologia para desativar os epítomos alergênicos destas proteínas, empregando o Reagente Woodward (WRK) para modificações de peptídeos sintéticos (P3 e P5), e para o "pool" de albuminas 2S, em diferentes tempos, concentrações e temperatura. Após as modificações realizadas, foram feitas análises por cromatografia de fase reversa, espectrometria de massas e ensaio de desgranulação dos mastócitos. Os autores concluíram que a metodologia desenvolvida foi eficiente para a desativação de alérgenos, pois os tratamentos com WRK diminuíram os níveis de desgranulação dos mastócitos de 61 % (P3), 57 % (P5) e 70 % ("pool" de albuminas 2S) para 30 %, valor próximo ao encontrado durante a manipulação destas células.

2.5 Processo de extrusão

A extrusão é um processo contínuo que combina energia mecânica e térmica para modificarem os materiais, transformando materiais sólidos em fluidos. Este processo consiste em operações que se desenvolvem em diferentes partes do extrusor.

No pré-condicionamento ocorre mistura e hidratação, e o material a ser extrudado deverá apresentar um teor de umidade pré-estabelecido de acordo com a capacidade higroscópica do material. Deverá apresentar granulometria padronizada para evitar a formação de grumos e prejudicar o fluxo da alimentação. O alimentador é composto de um recipiente para receber o material a ser extrudado e de um parafuso ou vibrador, localizado vertical ou horizontalmente. Possui a função de manter a alimentação constante e ininterrupta, o que é essencial para o funcionamento do extrusor, bem como para a homogeneidade e a qualidade do produto (GUTKOSKI, 2000).

Dentro do canhão de extrusão se localiza a rosca sem fim ou parafuso, que, ao girar, impede a passagem do produto na direção da matriz de seção radial menor que a do cilindro.

O movimento circular do parafuso pressiona o produto contra a parede do canhão, cisalhando-o e transformando-o em uma massa fundida e uniforme sob ação da pressão e da temperatura. O produto ao sair da matriz pode expandir-se ou não, isso dependerá de suas características.

O parafuso do extrusor divide-se em três seções ou zonas: alimentação, transição e alta pressão. A Figura 7 Mostra o desenho esquemático de um extrusor monorosca e as zonas de alimentação (A), transição (B) e alta pressão (C)

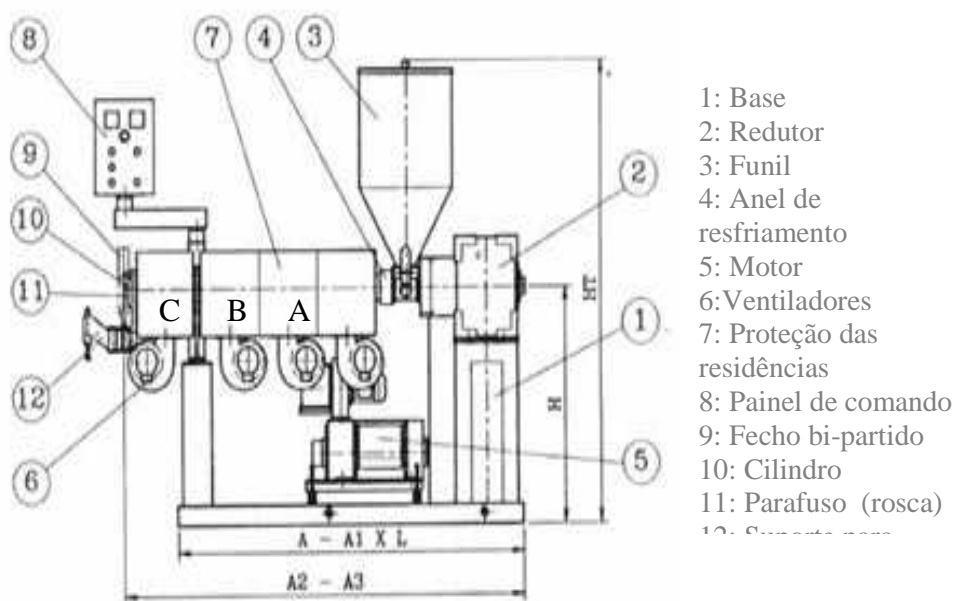


Figura 7. Desenho esquemático de uma extrusora monorosca.

Fonte: Naime. 2010.

A função da zona de alimentação é receber da alimentadora o material, misturar, comprimir, uniformizar e transportar. Durante o transporte o material se transforma em uma massa que será introduzida, misturada e comprimida no cilindro de extrusão. A medida o material se desloca o ar é expulso. Água pode ser injetada nesta zona, com o propósito de alterar a textura, desenvolver viscosidade e aumentar a transferência de calor por condução.

O material passa para a zona de transição onde a pressão e cisalhamento são ainda maiores. Nesta zona ocorre um cozimento parcial do material. Na zona de alta pressão, o material comprimido será submetido à temperatura mais elevada e maior pressão para forçá-lo a sair do extrusor. Ao emergir da matriz sob pressão, expande-se até sua forma final, resfriando-se rapidamente pela evaporação instantânea da umidade na forma de vapor (ASCHERI, 2008).

A extrusão permite ainda a mistura de diferentes matérias-primas e outros nutrientes na formulação de produtos (CARVALHO, 2000). Essa técnica permite maior facilidade na produção de misturas alimentícias destinadas ao consumo humano, produzindo uma variedade de produtos, além de permitir o enriquecimento do alimento com vitaminas ou minerais, por meio da suplementação, estimulando o consumo do produto por um determinado público-alvo.

2.5.1 Extrusão termoplástica aplicada à tecnologia de alimentos

A extrusão termoplástica consiste em processo contínuo com alta temperatura e pressão. Nestas condições o material é submetido a elevadas taxas de cisalhamento em curto tempo (30 a 45 segundos), ocorrendo assim mudanças físicas e químicas na massa a ser processada.

Como este processo envolve simultaneamente mistura, amassamento e cozimento, provoca uma grande quantidade de alterações complexas no alimento, tais como, a hidratação dos amidos e proteínas, devido à adição de água; homogeneização; gelatinização; cisalhamento; derretimento de gorduras; desnaturação ou reorientação de proteínas; plastificação e expansão da estrutura do alimento. Além das modificações nos compostos dos alimentos, a extrusão reduz a contaminação microbiana e inativa as enzimas, porém, tanto os alimentos extrudados pelo calor ou pelo frio se conservam principalmente devido sua baixa atividade de água (FELLOWS, 2006).

Segundo Silva (2008), após a desnaturação, as proteínas se orientam e se alinham imediatamente, antes e durante a saída do equipamento. No momento da saída dessa, ocorre uma repentina queda da pressão interna, (3-5 MPa ou 40-60 atm) para pressão atmosférica e causa a evaporação da água superaquecida, formando vacúolos e expandindo o material. O vapor atua como um agente de crescimento, esticando o material ainda “plástico” e levando a sua expansão longitudinal e radial. Também ocorre endurecimento do material no momento em que o material atinge a temperatura ambiente na saída do extrusor.

A extrusão termoplástica é capaz de reduzir a quantidade ou atividade de alguns fatores antinutricionais, como inibidores de tripsina e quimiotripsina, lectinas, e lipases e lipoxigenases (CAMIRE *et al.*, 1990; CAMIRE, 1991; SINGH *et al.*, 2007).

Pesquisas realizadas por Alonso *et al.* (2000) têm mostrado que a extrusão termoplástica além de inativar fatores antinutricionais de alguns alimentos, aumenta a digestibilidade de proteínas e amido.

Ainda, conforme mencionado anteriormente, um estudo realizado por Ascheri *et al.* (2007) observou que a extrusão é capaz de inativar proteínas citotóxicas e reduzir alguns alergênicos da semente de mamona.

O processo de extrusão termoplástica tem proporcionado numerosas aplicações, dentre elas podem se destacar a indústria alimentícia, na qual há elaboração de produtos, tais como cereais matinais, petiscos, “snacks”, macarrões, alimentos à base de cereais enriquecidos com proteína, bebidas em pó e proteínas de soja texturizada, farinhas e amidos pré-gelatinizados utilizados na formulação de sopas de preparo rápido, molhos semiprocessados, produtos de confeitaria, entre outros. Esses produtos geralmente são elaborados à base de cereais (como o milho e o arroz) e de amidos de raízes e tubérculos como a mandioca e a batata. (BALAGOPALAN, 2002; BOONYASIRIKOOL e CHARUNUCH, 2000; CHEYNE, BARNES e WILSON, 2005; CHUANG e YEH, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, e contou com a colaboração de diversos laboratórios da empresa, como segue:

A extrusão do farelo de mamona foi realizada na Planta Piloto de Extrusão, as análises protéicas por eletroforese foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e a análise centesimal foi feita no Laboratório de Físico-Química.

A torta de mamona foi obtida através da extração do óleo das sementes (prensa hidráulica realizada no laboratório de Matérias-Primas Vegetais, na Universidade Federal do Rio de Janeiro).

Foram utilizadas duas amostras para a identificação e quantificação de ricina: semente de mamona do cultivar “Paraguaçu” e farelo de mamona desengordurada.

3.1 Obtenção das Matérias-Primas

A semente de mamona, cultivar Paraguaçu, foi cedida pela Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, Brasil. A torta foi obtida através da prensagem das sementes em prensa “Expeller” (prensa contínua do tipo parafuso sem fim) da marca Oekotec- IBG – Monfortes- Alemanha. A semente utilizada e o processo de prensagem são apresentados nas figuras 8 e 9.



Figura 8. Semente de mamona cultivar Paraguaçu

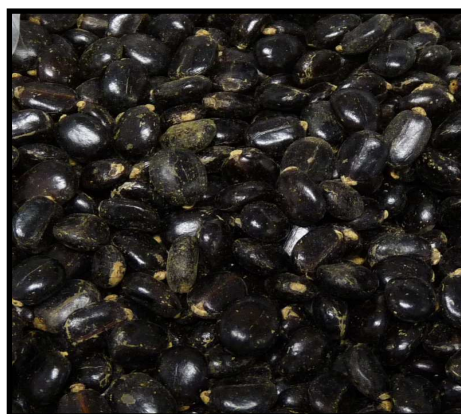


Figura 9. Prensa Hidráulica.

O farelo de mamona desengordurado foi adquirido da Empresa Bom Brasil Óleo de Mamona Ltda. Localizada na cidade de Salvador, Bahia. O farelo desengordurado é proveniente da extração do óleo com solvente. O farelo é composto de casca, caule e folhas da mamoneira.

Este material foi coletado nas áreas de produção da região Nordeste por cooperativas que pertencem ao programa Nacional do Biodiesel.

O hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 adicionado ao farelo de mamona foi adquirido no comércio da cidade do Rio de Janeiro.

A figura 10 mostra o farelo derivado da extração do óleo para fabricação do biodiesel



Figura 10. Farelo de mamona procedente da Bom Brasil Óleo de Mamona Ltda.

3.2 Planejamento Experimental

Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) de 2ª ordem (BOX, HUNTER e HUNTER, 1978) para as duas matrizes em estudo.

Para identificar a solução de maior capacidade de extração da ricina foi escolhida a torta de mamona proveniente da extração de óleo por prensagem a frio. Deste modo a proteína não sofre desnaturação, podendo ser melhor identificada e quantificada.

Para tanto, foi estabelecido um delineamento 2^2 (K=2), com duas variáveis independentes (pH e concentração de NaCl) e 12 ensaios (4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 4 replicações do ponto central). O desenho experimental das soluções tampão da torta de mamona encontra-se nas Tabelas 3 e 4.

Para o farelo de mamona desengordurado foi elaborado um delineamento do tipo 2^3 (K=3), com três variáveis independentes (% umidade, temperatura e concentração de hidróxido de Cálcio) e 20 ensaios (8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 6 replicações do ponto central). Tanto os níveis codificados quanto os axiais e os fatores têm seus valores reais representados na Tabela 5 e o delineamento completo na Tabela 6.

As duas matrizes (farelo e torta de mamona) foram estudadas em três níveis codificados (-1, 0, + 1) e dois níveis axiais ($-\alpha$ e $+\alpha$).

A equação 1 representa o cálculo dos valores reais das variáveis nos níveis codificados.

$$xi = Xi - Z/Dxi \quad \text{Equação 1}$$

onde:

xi = valor codificado da variável Xi;

Xi = valor real da variável;

Z = valor real da variável no ponto central;

DXi = valor do intervalo de variação do xi.

A equação 2 representa o cálculo dos pontos axiais:

$$\alpha = (F)^{1/4} = (2k)^{1/4} \quad \text{Equação 2}$$

A escolha do número de ensaios em um experimento central composto baseado em um experimento fatorial completo é $n = 2^k + 2k + m$, onde:

2^k – número de pontos fatoriais

$2k$ – número de pontos axiais (de estrela)

m – número de replicações do ponto central

$$Y_i = F(X_1, X_2, \dots, X_k) \quad \text{Equação 3}$$

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + e$$

$$2 + \beta_{22} X_2^2$$

$$2 + \beta_{33} X_3^2$$

$$2 + \beta_{12} X_1 X_2 + e \quad \text{Equação 4}$$

onde:

Y_i = função resposta;

X_1, X_2, X_3 = valores das variáveis independentes;

β = coeficiente relativo à interpretação do plano com o eixo resposta;

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ = coeficientes lineares estimados pelo método dos mínimos quadrados;

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ = coeficientes das variáveis quadráticas;

$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ = coeficientes de interação entre as variáveis independentes;

E = erro experimental.

Tabela 3. Níveis das variáveis independentes codificadas para o delineamento de composto central das soluções tampão para a extração das proteínas.

Variáveis Independentes	Níveis				
	-1.414	-1	0	1	1.414
pH	4,0	4,6	6,0	7,4	8,0
NaCl (M)	0,0	0,3	1,0	1,7	2,0

Tabela 4. Delineamento completo do desenho experimental das soluções tampão.

Número do experimento Solução tampão	Níveis codificados das variáveis		Níveis decodificados das variáveis	
	x1	x2	X1	X2
1 Acetato de sódio 0,2M	-1	-1	4,6	0,3
2 Acetato de sódio 0,2M	-1	+1	4,6	1,7
3 Fosfato de potássio 0,2M	+1	-1	7,4	0,3
4 Fosfato de potássio 0,2M	+1	+1	7,4	1,7
5 Acetato de sódio 0,2M	-1,414	0	4,0	1,0
6 Fosfato de potássio 0,2M	+1,414	0	8,0	1,0
7 Fosfato de potássio 0,2M	0	+1,414	6,0	0,0
8 Fosfato de potássio 0,2M	0	-1,414	6,0	2,0
9 Fosfato de potássio 0,2M	0	0	6,0	1,0
10 Fosfato de potássio 0,2M	0	0	6,0	1,0
11 Fosfato de potássio 0,2M	0	0	6,0	1,0
12 Fosfato de potássio 0,2M	0	0	6,0	1,0

x1 e X1 = pH

x2 e X2 = Concentração de NaCl

Tabela 5. Níveis das variáveis independentes codificadas para o delineamento de superfície de resposta do processo de extrusão do farelo de mamona.

Variáveis Independentes	Níveis				
	-1,682	-1	0	1	1,682
Umidade (%)	14,64	16	18	20	21,36
Temperatura (°C)	116	130	150	170	183
Formulação (%)	0,80	2,5	5,0	7,5	9,21

Tabela 6. Delineamento completo do desenho experimental do processo de extrusão do farelo de mamona.

Ensaio	Níveis codificados das variáveis			Níveis decodificados das variáveis		
	x1	x2	x3	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1	16	130	2,5
2	-1	-1	1	16	130	7,5
3	-1	1	-1	16	170	2,5
4	-1	1	1	16	170	7,5
5	1	-1	-1	20	130	2,5
6	1	-1	1	20	130	7,5
7	1	1	-1	20	170	2,5
8	1	1	1	20	170	7,5
9	-1,682	0	0	14,64	150	5,0
10	1,682	0	0	21,36	150	5,0
11	0	-1,682	0	18	116	5,0
12	0	1,682	0	18	183	5,0
13	0	0	-1,682	18	150	0,80
14	0	0	1,682	18	183	9,21
15 (C)	0	0	0	18	150	5,0
16 (C)	0	0	0	18	150	5,0
17 (C)	0	0	0	18	150	5,0
18 (C)	0	0	0	18	150	5,0
19 (C)	0	0	0	18	150	5,0
20 (C)	0	0	0	18	150	5,0

x1 e X1 = Umidade (%)

x2 e X2 = Temperatura (°C)

x3 e X3 = Formulação (CaOH₂) (%)

3.3 Análise Estatística

O ajuste dos dados experimentais ao modelo utilizado foi testado pela análise de variância (ANOVA) a partir do uso do teste de distribuição F a 5 % de probabilidade.

A adequação do modelo polinomial foi avaliada comparando a proporção da variação explicada (R^2).

O processamento dos dados e a análise estatística foram realizados com o auxílio do programa Statistica, versão 7.0, com as variáveis independentes codificadas.

Os gráficos de superfície de resposta foram desenhados, com o auxílio do programa Statistica, versão 7.0, por meio do modelo matemático proposto nos níveis reais das variáveis, mantendo a resposta em função do eixo Z, com os eixos X e Y, representando as variáveis independentes, ao mesmo tempo em que as demais variáveis foram mantidas constantes no ponto central (correspondente ao nível codificado 0).

Para as variáveis respostas que não geraram modelo preditivo e nem tendência, ou seja, quando o valor do coeficiente do modelo de regressão (R^2) foi inferior a 0,70, os resultados foram discutidos através de comparação das medias analisadas pelo teste de Tukey, utilizando o programa Xlstat, versão 7.5.

3.4 Classificação Granulométrica

A torta de mamona foi moída em moinho de disco e faca da marca Perten 3600 (1680 rpm) de peneira de 0,8 mm.

O farelo desengordurado de mamona submeteu-se a duas moagens, uma mais grossa e outra mais fina, a fim de obter a granulometria adequada para o processo de extrusão.

A moagem foi realizada em moinho de disco e faca da marca Perten 3600 (1680 rpm) de peneira de 0,8 mm.

Os materiais foram padronizados quanto à granulometria, seguindo o procedimento operacional padrão descrito por Germani *et al.*, 1997. Foi utilizado o equipamento da marca RO-TAP modelo RX-29-10, no qual se colocou um conjunto de peneiras arredondadas e com abertura das malhas em ordem decrescente (420; 355; 250; 180; 150; 105 e 75 μm). Todas as amostras foram peneiradas durante 10 minutos. O material retido em cada peneira foi pesado e o valor foi expresso em porcentagem, em relação ao total de amostra peneirada.

3.5 Pré-Condicionamento da Matéria-Prima para Extrusão

As farinhas de mamona extrudadas (ensaios de 1 a 20) foram acondicionadas para os diferentes níveis de umidade, conforme o delineamento experimental (Tabela 4). O teor de umidade inicial foi determinado pela metodologia descrita pela Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), 1995. A quantidade de água a ser adicionada foi obtida de acordo com a equação 5:

$$Y = (U_f - U_i) / (100 - U_f) \times P_a \quad \text{Equação 5}$$

onde:

Y= quantidade de água a ser adicionada (mL)

U_f= umidade final da amostra (%)

U_i= umidade inicial da amostra (%)

P_a= peso da amostra (g)

A umidade inicial das misturas foi determinada pesando-se 5 g de cada tratamento e colocando em balança de infravermelho. A seguir, estas amostras foram pesadas e seus valores diretamente expressos em umidade (%).

As amostras, depois de condicionadas (pela adição de água potável), foram colocadas em sacos de polipropileno, homogeneizadas e armazenadas sob refrigeração durante tempo médio de 12 horas, suficientes para que a distribuição e absorção da água fossem uniformes. Após este período, a farinha foi submetida ao processo de extrusão.

3.6 Processo de Extrusão

O processo de extrusão foi realizado em um extrusor de rosca simples Brabender DSE 20DN acoplado a um aparelho de torque DSE 330 (Duisburg, Alemanha).

Foi utilizado parafuso número 3. A velocidade de rotação do parafuso permaneceu constante em 133 rpm. A taxa de alimentação foi de 4,08 kg/h numa velocidade de rotação de 27 rpm. Foi utilizada a matriz de saída de 3 mm de diâmetro.

As temperaturas das zonas de alimentação (zona 1) e de transição (zona 2) ficaram em torno de 64 °C, 120 °C respectivamente, de modo a induzir que a temperatura da zona de alta pressão (zona 3) permanecesse de acordo com a temperatura estipulada em cada tratamento, conforme Tabela 6.

As amostras acondicionadas de farelo de mamona desengordurado referente aos experimentos dos números 1 ao 20 foram extrudadas assim que a extrusora ficou estabilizada nos seus parâmetros previamente definidos.

Após a extrusão as amostras foram secas em estufa 105 °C por 3 horas para diminuir o conteúdo de água na qual foi absorvida na saída do extrusor. Após este período as amostras foram embaladas em sacos de polietileno a fim de manter a integridade do extrudado.

3.7 Índice de Expansão Radial (IER)

Os índices de expansão radial (IER) foram calculados seguindo a metodologia descrita por Alvarez-Martinez *et al.* (1988), de acordo com a seguinte equação:

$$\text{IER} = (D/D_0)^2$$

Onde:

D: diâmetro do extrudado quando atingiu a temperatura ambiente

Do: diâmetro da matriz (matriz radial)

O diâmetro dos extrudados foi verificado utilizando-se um paquímetro Disma 6'' 150 mm (São Paulo, SP, Brasil). A medição foi realizada em três pontos distintos de cada extrudado e o diâmetro resultante da média destes pontos, num total de 4 repetições.

3.8 Composição centesimal

O farelo e a torta de mamona foram moídos de acordo com item 3.5 e encaminhados para às análises de umidade (AOAC, 2005, método 925.09 modificado), cinzas (AOAC, 2005, método 923.03), extrato etéreo (AOAC, 2005, método 945.38), fibra (FDN: AOAC - 2005 - 2002.04), nitrogênio total (AOAC, 2005, método 2001.11 modificado), nitrogênio não protéico (R. Lees, 1982; Kjeldahl tradicional modificado).

3.8.1 Umidade

Foram pesadas em balança analítica Mettler Toledo aproximadamente 2 g da amostra em pesa-filtro tarado (aquecido em estufa 98-100 °C, por cerca de 1 hora, esfriado em dessecador até chegar à temperatura ambiente).

As amostras foram aquecidas em estufa da marca Memert cerca de 98-100 °C, por 3 horas, até obter peso constante. A cada 1 hora as amostras foram retiradas da estufa, esfriadas em dessecador, até alcançar temperatura ambiente e pesadas. O percentual de umidade foi obtido de acordo com a Equação 6.

$$U (\%) = \left[\left(\frac{Pb - P \text{ constante}}{Pb - Pa} \right) \right] \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

U (%) = teor de umidade (g/100g de amostra)

Pa = peso do pesa-filtro vazio

Pb = peso em g do pesa-filtro

P constante = peso constante em g do pesa-filtro + resíduo após evaporação

3.8.2 Cinzas

Foram pesadas em balança analítica Mettler Toledo aproximadamente 2 g da amostra em cadinho de porcelana tarado (aquecido em mufla cerca de 550 °C por 1 hora, esfriado em dessecador até chegar à temperatura ambiente).

As amostras foram pesadas e carbonizadas no bico de Bunsen na capela. Posteriormente, as amostras foram levadas à mufla a 550°C, por 5 horas. Após este tempo as amostras foram retiradas da mufla e colocadas em dessecador para esfriar até temperatura ambiente.

Os cadinhos contendo as cinzas foram pesados e o teor de cinzas foi calculado através da equação 7.

$$CZ (\%) = \left(\frac{P1 - P}{Pa} \right) \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

CZ (%) = teor de cinzas (g/100g de amostra)

P1 = peso do cadinho contendo as cinzas em gramas

P = peso do cadinho vazio em gramas

Pa = massa da amostra em gramas

3.8.3 Extrato etéreo

Foram pesadas em balança analítica Mettler Toledo aproximadamente 5 g da amostra. A amostra foi transferida para o balão de fundo redondo tarado contendo algumas pérolas de vidro (aquecido em estufa cerca de 100 °C por 1 hora, esfriado em dessecador até chegar à temperatura ambiente).

Cerca de 5g de amostra foi pesada em cartucho de extração. Os cartuchos foram fechados com algodão e colocados no extrator de Soxhlet, durante 16 horas. Procedeu-se um ensaio em branco. A velocidade de evaporação/condensação do éter foi controlada para se

obter o valor máximo de rendimento na extração. O volume de solvente perdido por evaporação foi completado de modo a não permitir que o balão ficasse seco. Após este período, o balão de extração foi retirado e o conteúdo de solvente existente no balão foi evaporado no rotavapor. O balão foi colocado em estufa na temperatura de 60°C por 3 horas. O balão foi retirado da estufa, esfriado à temperatura ambiente em um dessecador. Posteriormente pesado. O teor de extrato etéreo foi calculado através da Equação 8.

$$E.E.(%) = \left(\frac{P1 - P - P_{branco}}{Pa} \right) \times 100$$

Equação 8

Onde:

E.E. (%) = teor de extrato etéreo (g/100g de amostra)

P1 = peso do balão + resíduo

P = peso do balão vazio

Pbranco = peso do branco de análise

Pa = peso da amostra

3.8.4 Fibra

Consistiu na quantificação das fibras insolúveis, através da determinação de fibra detergente neutro. Foram pesadas em balança analítica Mettler Toledo aproximadamente 1 g da amostra em cadinho filtrante, tarado (aquecido em estufa cerca de 105°C por 2 hora, esfriado em dessecador até chegar à temperatura ambiente). O cadinho com amostra foi colocado no digestor de fibras de 6 provas da marca Velp, acrescentado de 100 mL da solução de FDN, 2 mL de octanol, 10 mL da solução de uréia, para fervura durante 60 minutos. Após este procedimento o conteúdo do cadinho foi lavado 3 vezes com 30 mL de água destilada fervente circulando o vidro e ligando o equipamento de vácuo após cada lavagem. O conteúdo foi lavado 3 vezes com 30 mL de acetona. Os cadinhos filtrantes foram retirados do aparelho e colocados na estufa 105°C por 8 horas. Depois, colocados na mufla a 550°C por 3 horas e pesados. O cálculo do teor de fibra detergente neutro segue a Equação 9.

$$FDN = \left(\frac{(\text{cadinho} + \text{resíduo de FDN}) - (\text{cadinho} + \text{cinzas})}{Pa} \right) \times 100$$

Equação 9

FDN = teor de fibra detergente neutro (g/100g de amostra)

Pa = massa de amostra

3.8.5 Nitrogênio total

Cerca de 1,0g de amostra foi pesada em papel manteiga, em seguida o papel com amostra foi dobrado e transferido para o tubo de digestão. Procedeu-se um ensaio em branco de um material de referência. Foi adicionado ao tubo de digestão uma pastilha de catalisador e 6mL de H₂SO₄ P.A.

Os tubos de digestão mais amostra foram colocados no bloco digestor. A cada 1 hora a temperatura foi aumentada em 50°C, gradativamente, até 350°C. A digestão ocorreu até uma hora após o aparecimento da coloração clara do conteúdo do tubo. Os tubos foram esfriados até a temperatura ambiente e em seguida levados para destilador Tecnal.

Em erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 30 mL de solução de ácido bórico a 5%, com 4 gotas de indicador. O erlenmeyer foi colocado na saída do destilador.

Cerca de 20 mL da solução de NaOH 40% foi colocado no copo dosador do destilador, A destilação ocorreu até a virada da solução indicadora de rosa para verde. Após a virada, aguardou-se mais 10 minutos para interromper a destilação.

O destilado foi titulado com a solução de H₂SO₄ 0,05M padronizada até viragem de verde para rosa. O teor de Nitrogênio total foi calculado através da Equação 10.

$$N(\%) = \left(\frac{(V - V_b) \times M \times 0,028}{P_a} \right) \times 100$$

Equação 10

Onde:

N (%) = teor de nitrogênio total (g/100g de amostra)

V = volume de H₂SO₄ gasto na titulação da amostra

V_b = volume de H₂SO₄ gasto na titulação do branco

M = molaridade da solução de H₂SO₄

P_a = massa de amostra digerida em gramas

Para obter o resultado em proteína o resultado foi multiplicado pelo (5,75) fator de conversão de nitrogênio em proteína.

E = fator empírico de conversão nitrogênio/proteína

Fatores de conversão

3.8.6 Nitrogênio não protéico

Foram pesados, em balança Mettler Toledo, 5 g de amostra em tubos Falcon. Procedeu-se ensaio em branco e de um material de referência. Foram adicionados 45 mL de ácido tricloroacético 15% aos tubos Falcon com amostra. O material foi agitado manualmente e deixado em repouso por 30 minutos. Em seguida foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o material foi filtrado a vácuo com papel de filtro Whatman nº 3. O filtrado obtido foi pesado em um tubo Falcon previamente tarado (Extrato Total obtido com TCA 15%). Deste extrato total obtido, ainda na balança, pesa-se por diferença cerca de 5 g retirando-se uma alíquota de 5 mL (Alíquota do Extrato para análise), utilizando um pipetador automático e transferindo em seguida para o tubo de digestão.

Os tubos de digestão mais amostra foram colocados no bloco digestor. A cada 1 hora a temperatura foi aumentada em 50 °C, gradativamente, até 350 °C. A digestão ocorreu até uma hora após o aparecimento da coloração clara do conteúdo do tubo. Os tubos foram esfriados até a temperatura ambiente e em seguida levados para destilador Tecnal.

Em erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 30 mL de solução de ácido bórico a 5%, 4 gotas de indicador, colocado na saída do destilador.

Cerca de 20 mL da solução de NaOH 40% foi colocado no copo dosador do destilador. A destilação ocorreu até a virada da solução indicadora de rosa para verde. Após a virada, aguardaram-se mais 10 minutos para interromper a destilação.

O destilado foi titulado com a solução de H₂SO₄ 0,05 M padronizada até viragem de verde para rosa. O teor de Nitrogênio total foi calculado através da Equação 11.

$$\text{NNP}(\%) = \frac{\left[\left(\frac{V \times M \times 0,028 \times \text{ExtratoTotal}}{\text{Alíquotado Extrato}} \right) - \left(\frac{V_{\text{branco}} \times M \times 0,028 \times \text{ExtratoTotal}_{\text{branco}}}{\text{Alíquotado Extrato}_{\text{branco}}} \right) \right]}{Pa} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

Onde:

Pa = peso da amostra

V = volume de H₂SO₄ gasto na titulação

Vbranco = volume de H₂SO₄ gasto na titulação do branco

M = molaridade da solução de H₂SO₄

Extrato Total = Extrato Total obtido com TCA 15%

Alíquota do Extrato = Alíquota do Extrato para análise

3.9 Análises de proteínas

3.9.1 Preparação do extrato protéico

A extração da proteína da torta de mamona foi realizada utilizando 5g de torta desengordurada (prensa expeller) e moída (item 3.4) com 30 mL da solução tampão de acetato de sódio 0,2 M ou fosfato de potássio 0,2 M com concentração de cloreto de sódio (NaCl) e pH seguindo o desenho experimental experimental Tabela 4, página 19 (Tratamento 1-12). As 12 soluções foram preparadas de modo a eleger qual delas extraísse maior quantidade de proteína. A melhor solução seria usada para extrair as proteínas do farelo de mamona.

A extração da proteína do farelo de mamona foi realizada utilizando 5g de farelo de mamona extrudado e 30 mL solução tampão fosfato potássio 0,2 M com 1,7 M de NaCl, pH 7.4 (solução eleita para extração de proteína do farelo de mamona por estar dentro dos limites de maior quantidade de proteína extraída estabelecidos pelo gráfico de superfície) As amostras foram homogeneizadas em blender 34BL97-7012 (Waring Commercial, New Harford, USA) durante 2 minutos e posteriormente filtradas em filtro de algodão. Este filtrado foi submetido à centrifugação em uma centrífuga da marca Thermo, modelo multifuge 3L-R a 4000 rpm, sob a temperatura de 4 °C, durante 15 minutos.

O procedimento simplificado de extração e purificação parcial das proteínas tanto do farelo quanto da torta de mamona pode ser visto através da figura 11.

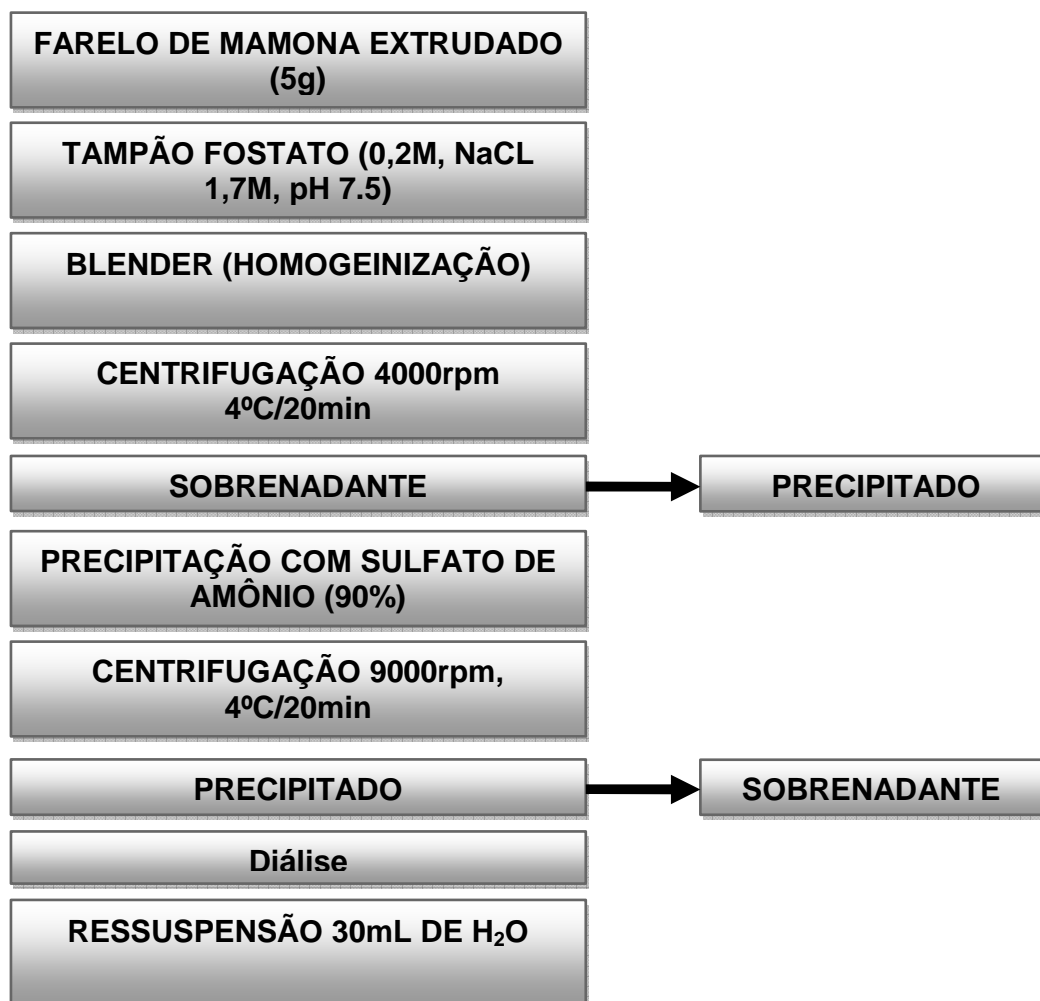


Figura 11. Fluxograma de extração e purificação parcial das proteínas

3.9.2 Precipitação com sulfato de amônio

O sobrenadante proveniente da centrifugação (15mL de extrato), tanto da torta quanto do farelo de mamona, foram precipitados com sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄] a 90% (9,95 de sulfato de amônio) e centrifugados a 9000 rpm, 4 °C por 20 min.

Após a centrifugação as amostras foram dialisadas *overnight*, contra água corrente em membrana de diálise Spectra/Por (Thomas Scientific, U.S.A.) com limite de exclusão de 3,5 kDa.

3.9.3 Solubilização da amostra protéica

Para a solubilização do material proveniente da torta de mamona foi usada uma solução tampão fosfato pH 7,4. O material proveniente do farelo de mamona foi solubilizado em água destilada. Estas soluções foram avaliadas quanto à dosagem de proteínas totais da amostra e aplicação em eletroforese desnaturante – SDS-PAGE.

3.9.4 Quantificação colorimétrica das proteínas

As amostras extraídas do farelo e da torta de mamona foram quantificadas para proteínas segundo o método de Bradford (1976). Foram utilizados 100 µL do extrato 5 mL do reagente de Bradford, previamente preparado. A análise colorimétrica foi realizada utilizando um espectrofotômetro da marca Analytikjena modelo Specord 210, no comprimento de onda de 595 nm.

3.9.5 Eletroforese desnaturante em SDS-PAGE

Foi utilizado o sistema de eletroforese da marca Biorad e a metodologia de preparação dos géis descrita por Laemmli (1970).

3.9.5.1 Preparo e polimerização dos géis de acrilamida

- Preparo e Polimerização do Gel de Separação – 25 mL

O gel foi preparado em kitassato de 100 mL adicionando 6,25 mL de tampão TRIS pH 8,8; 6,00 mL de água destilada; 12,5 mL de solução de acrilamida a 30% (p/v) – Gel a 12%, 0,25 mL de solução de SDS a 10% (p/v). O kitassato com a solução foi acoplado ao vácuo por 20 minutos para deaeração. Foi adicionado à solução 150 µL da solução de persulfato de amônio 10% e 80 µL de TEMED. O conteúdo foi vertido entre as placas de vidro previamente montadas. Em seguida, com o auxílio de uma seringa com agulha, foi aplicado sobre o gel, uma solução de SDS a 1% (p/v), ao longo da extensão do vidro, para que o gel polimerizasse sem deformações e para evitar desidratação na borda superior. A polimerização do gel ocorreu em cerca de 20 minutos. Solução de SDS a 1%, que foi adicionada em cima do gel de separação, foi descartada.

- Preparo e Polimerização do Gel de Empilhamento – 10 mL

O gel foi preparado em um kitassato de 100 mL, adicionando 2,5 mL de tampão TRIS pH 6,8, 5,4 mL de água destilada, 2,0 mL de solução de acrilamida a 30% (p/v) 100 µl de solução de SDS a 10% (p/v). O kitassato com a solução foi acoplado ao vácuo por 20 min. Passados os 20 min., desconectou-se a mangueira de vácuo do kitassato e adicionou-se a solução deaerada: 100 µl da solução de persulfato de amônio a 10% e 50 µl de TEMED. A solução foi agitada e vertida entre as placas de vidro, por cima do gel de separação polimerizado; rapidamente o pente foi inserido com angulação de 10° no gel de empilhamento para demarcar as áreas para aplicação das amostras no gel. Após 20 minutos ocorreu a polimerização e o pente foi retirado. Os poços foram enxaguados com solução tampão de corrida e logo em seguida esta solução foi descartada.

Os espaçadores junto com as placa de vidro foram retirados do suporte e acoplados ao suporte central (cooler) da cubra. Este conjunto foi inserido na cuba eletroforética e 2 L de solução Tampão de Corrida foram adicionada até cobrir a parte inferior das placas de vidro.

3.9.5.2 Preparo e aplicação da amostra no gel e corrida

O material (200µl) foi retirado da membrana de diálise e transferido para um tubo de ensaio, adicionando-se posteriormente tampão de amostra (100 µl). O conteúdo do tubo foi aquecido em banho-maria por 2 minutos em placa de aquecimento e resfriado.

O Cooler (suporte móvel) da parte central da cuba eletroforética foi retirado. Com ajuda de uma microsseringa foi aplicado 20 µL das amostras nos poços.

Após aplicação da amostra o Cooler foi inserido dentro da cuba eletroforética na qual foi tampada. Os cabos foram conectados ao voltímetro que manteve a voltagem em 100V, e mangueiras de entrada e saída de água foram ajustadas. O tempo de corrida foi aproximadamente 7 horas.

Os marcadores de massa molecular utilizados foram do fabricante Biorad com a seguinte composição:

Marcador de alta massa molecular: 204,44 kDa, 116,58 kDa, β-galactosidase; 98,08 kDa, albumina de soro bovino; 47,11 kDa, ovoalbumina.

Marcador de baixa massa molecular: 103,03 kDa, fosforilase B; 80,66 kDa, albumina de soro bovino; 49,49 kDa, ovoalbumina; 36,54 kDa, anidrase carbônica; 28,83 kDa, inibidor de tripsina de soja; 19,44 kDa lisoenzi

Após completada a corrida, a fonte de energia e de água foram desligadas e a solução tampão de corrida foi descartada. O Cooler foi destravado e os espaçadores contendo os géis foram retirados de dentro da cuba eletroforética. Os espaçadores foram removidos, assim como os vidros para a liberação dos géis. O gel de empilhamento foi separado do gel de corrida com o auxílio de uma espátula.

3.9.5.3 Coloração e revelação dos géis de poliacrilamida

As proteínas dos géis foram coradas por 14 horas (overnight) com uma solução de ácido acético 10% (v/v), álcool metílico 40% (v/v) e Coomassie Brilliant Blue R250 1% (v/v). sob agitação em capela, coberto com filme de polietileno.

Os géis foram descorados em solução contendo 10% (v/v) de ácido acético e 40% (v/v) de álcool metílico, renovando a solução a cada 30 minutos, até obtenção de revelação nítida. O cálculo da massa molecular das frações protéicas foi efetuado mediante a construção das curvas padrão, com massas moleculares dos marcadores contra as respectivas distâncias percorridas no gel. O gel foi colocado em papel de desenho de gramatura 300 g/m² para secagem.

3.9.5.4 Secagem do gel

O gel aderido ao papel foi seco no módulo de secagem de eletroforese da Biorad, a 80 °C, sob vácuo, durante 2 horas e 50 minutos. O gel permaneceu no secador por mais 1 hora até que ocorresse total resfriamento da câmara.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Granulometria

A distribuição granulométrica é considerada para extrusão como um fator de qualidade, segundo (ALTAN *et al.*, 2008). A uniformidade no tamanho das partículas permite maior difusividade da água evitando aglomeração ou formação de grumos, nos quais irão prejudicar o transporte antes da extrusão, assim como a cocção do material após a extrusão (ASCHERI *et al.*, 2007).

O tamanho das partículas também pode afetar a compactação, a densidade, viscosidade e textura do material extrudado.

Conforme Ascheri (2008), o tamanho das partículas tem sido também apontado como um fator importante na expansão, principalmente quando se utiliza extrusores com rosca única. Partículas pequenas se fundem primeiro, resultando em uma viscosidade baixa, dificultando o transporte de todo o material.

Os resultados da distribuição granulométrica do farelo de mamona estão apresentados na Figura 12. A análise dos resultados permite observar que o farelo de mamona obteve maior retenção na peneira de abertura 75 μ m (27,15%).

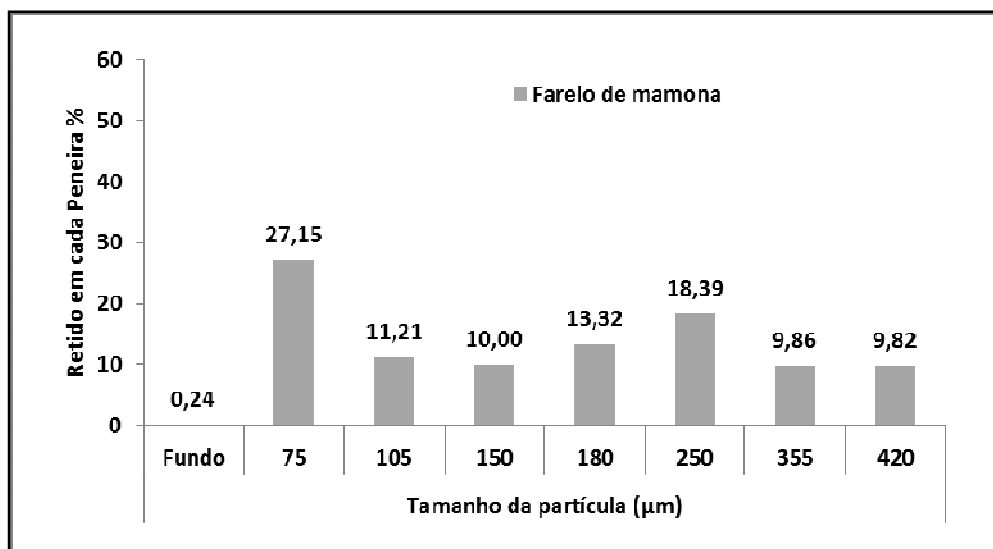


Figura 12. Classificação granulométrica do farelo de mamona.

4.2 Índice de Expansão Radial

A figura 13 mostra os extrudados obtidos a partir do desenho experimental (1 a 20) da Tabela 6.

O extrudado referente ao ensaio 11, no qual foi elaborado com teor de umidade 18%, temperatura 116°C e 5% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ apresentou-se mais homogêneo quanto a sua estrutura. Os extrudados referentes aos ensaios 17, 18, 19 apresentaram-se menos homogêneos.

Não houve expansão para todos os ensaios, o resultando em $\text{IER}=3$. Este valor já era esperado já que o farelo de mamona em sua composição possui um alto teor de fibra, cerca de 50% e baixo teor de carboidrato (FREITAS *et al.*, 2008).

A expansão de um produto depende da sua composição e das condições de processamento, além da intensidade de vaporização da água (ASCHERI, 2008).



Figura 13. Extrudado do farelo de mamona.

4.3 Densidade Aparente

A análise de variância (ANOVA), o teste F, os coeficientes de regressão e as respectivas probabilidades estão apresentados na Tabela 7. O coeficiente de determinação (0,666) apresentou um valor muito baixo para que o modelo seja preditivo. Portanto, não foram construídos gráficos de superfície de resposta, nem foi gerado modelo da equação, no entanto, os resultados foram discutidos através de teste de comparação de médias realizadas pelo teste de Tukey (Tabela 7).

Tabela 7. Teste F da análise de variância, coeficiente de regressão e respectivas probabilidades do modelo de regressão quadrática aplicada à densidade dos extrudados.

Fator	Teste F	Coeficiente de Regressão	Valor-p
Intercepto		116,1118	--
Umidade (U)	4,010846	-13,1309	0,101587 ^{ns}
U ²	0,778219	0,2459	0,418072 ^{ns}
Temperatura (T)	0,466723	0,0100	0,524863 ^{ns}
T ²	0,007374	0,0002	0,934902 ^{ns}
Formulação (F)	0,003908	7,9662	0,952573 ^{ns}
F ²	0,156696	0,0705	0,708543 ^{ns}
U x T	0,163222	0,0151	0,702908 ^{ns}
U x F	0,338147	0,1738	0,586130 ^{ns}
T x F	6,895814	-0,0785	0,046759
Falta de ajuste	24,9216		0,011924
R ²	0,67		

-- Não determinado

^{ns}= Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

*significativo a nível de 5% de probabilidade

Tabela 8. Teste de Tukey da densidade dos extrudados de farelo de mamona.

Ensaio	Densidade
1	7,41± 0,41 ^{cde}
2	14,76± 0,51 ^a
3	12,89± 1,78 ^{ab}
4	1,33± 0,20 ^f
5	0,57± 0,06 ^f
6	8,17± 1,37 ^e
7	5,24± 0,52 ^e
8	0,38± 0,08 ^f
9	11,81± 0,69 ^b
10	6,32± 1,10 ^{cde}
11	6,43± 1,66 ^{cf}
12	6,67± 1,05 ^{cde}
13	6,80± 0,17 ^{cde}
14	8,26± 0,55 ^c
15	12,83± 0,37 ^{ab}
16	5,82± 0,53 ^{de}
17	5,66± 0,44 ^e
18	5,41± 0,31 ^e
19	1,22± 0,08 ^f
20	1,35± 0,27 ^f

*Média com letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

**Média ± desvio padrão

O farelo de mamona extrudado apresentou alta densidade variando de, 14,76 a 0,38g/cm³. Ensaio com tratamentos de maior temperatura e concentração hidróxido de cálcio Ca(OH)₂ apresentaram maior densidade aparente ou maior grau de compactação.

Quanto maior o índice de expansão radial, menor será a densidade aparente, isso ocorre devido à formação de bolhas internas de ar na estrutura do material que, conseqüentemente aumenta seu volume e reduz o seu peso.

4.4 Caracterização Química

4.4.1 Composição química da torta de mamona

A determinação da composição centesimal da torta de mamona em base úmida está apresentada na Tabela 9.

Tabela 9. Composição centesimal da torta de mamona g/100g.

Ensaio	Umidade	Cinzas	Lipídeo	Proteína	FDN
Torta de mamona	9,73±0,03	5,48±0,06	10,26±0,02	22,48	47,81±0,56

***Teor de proteína calculado por nitrogênio total-nitrogênio não proteico X fator de conversão para proteínas de oleaginosas 5,75

O teor de umidade da torta de mamona da cultivar Paraguaçu foi em média 9,73%. O teor de umidade é um dos fatores preponderantes na preservação da qualidade dos grãos durante o armazenamento e para a obtenção de um produto de melhor qualidade depois do processamento.

As cinzas corresponderam a 5,48% em média da composição da torta. Evangelista *et al.* (2007) constatou a variação no teor de cinzas entre as cultivares (Al Guarany 2002) 7,66% de cinzas e (Nativa) 10,86% de cinzas.

Outra análise realizada pela Embrapa Algodão mostrou que a cultivar Paraguaçu possui 3,37% em conteúdo mineral, inferior ao encontrado neste trabalho para a mesma cultivar. Portanto, a variação do conteúdo mineral nestas sementes está relacionada diretamente com o solo nas quais estas espécies foram cultivadas.

O valor encontrado para teor de lipídeo foi 10,26%. Freire (2001) analisou a composição do farelo e da torta de mamona, obtendo 4,4% para torta e 1% para o teor de lipídeo do farelo. O teor lipídeo da torta (obtido pelo processo de extração do óleo a frio) é maior que o teor do farelo (obtido pela extração com solvente), isso ocorre devido ao menor rendimento de extração de óleo por prensagem mecânica (MORETTO e FETT, 1998).

O valor obtido de fibra detergente neutro (FDN) foi 47,81. O conteúdo de (FDN) em torta de mamona para Evangelista *et al.* (2007) foi de 58,34% para a cultivar Paraguaçu e 55,98% para a Nativa.

Proteína total correspondeu a 22,48% da composição da torta de mamona. Segundo Bewley e Black (1985), o teor de proteína de sementes oleaginosa em geral é inferior ao conteúdo de proteína dos cereais e estes inferiores às leguminosas ricas em óleo. Observa-se que, dentre os componentes químicos da semente, as proteínas sempre se apresentam em menor proporção do que os carboidratos ou os lipídios, exceção feita à soja.

A semente de mamona possui em média 30% de proteína bruta, este valor varia em função das condições do ambiente e das técnicas de cultivo que afetam o estado nutricional das plantas.

4.4.2 Composição química do farelo de mamona

A determinação da composição centesimal do farelo de mamona em base úmida esta apresentada na Tabela 10.

Tabela 10. Composição centesimal do farelo de mamona g/100g.

Ensaio	Umidade	Cinzas	Lipídeo	Proteína	NNP	FDN
Farelo de mamona	9,17±0,02	6,93±0,09	1,21±0,02	35,7	0,33	--

**Média ± desvio padrão

***Teor de proteína calculado por diferença entre nitrogênio total e nitrogênio não protéico multiplicado por 5,75 (fator de conversão de nitrogênio para proteína)

-- Valor não determinado

FDN Fibra detergente neutro

NNP- Nitrogenio não protéico

De forma geral as composições de matérias primas para extrusão permitem indicar o grau de esforço mecânico e assim prever os resultados na transformação dos mesmos pelo efeito do cisalhamento. Desta forma, altos teores de gordura implicam menores taxas de cisalhamento e altos conteúdos de proteínas implicam também maior resistência dentro do sistema de extrusão provocando também maiores taxas de cisalhamento. A alta percentagem de proteína implicou taxas de esforço mecânico que modificou as estruturas protéicas, como poderá ser verificado mais adiante. O baixo teor de gordura, menos de 2%, é um fator que ajuda a provocar altos esforços mecânicos na extrusão. Portanto, do ponto de vista técnico a composição do farelo permitiu resultados satisfatórios no processo de extrusão. Do ponto de vista nutricional acreditamos que valores cerca de 35% de proteína no farelo resultam num produto promissor para possíveis usos na formulação de rações.

4.4.3 Composição química do farelo de mamona extrudado

A Tabela 11 apresenta os resultados da composição centesimal do farelo de mamona em base úmida.

O teor proteína variou de 35,31% a 27,14%. Este conteúdo foi quantificado a partir do nitrogênio total e fator de conversão 5,75 para oleaginosa.

O teor de proteína do farelo de mamona não extrudado foi de 35,7% (Tabela 10), portanto, podemos observar que não ocorreu mudança no teor de proteína após a extrusão (35,32%). Antes da extrusão o teor de Nitrogênio não protéico foi 0,33% (Tabela 10) era esperado que com a extrusão o teor de nitrogênio não protéico (0,20 a 0,41%) tivesse um aumento. O baixo valor deste nos sugere que não houve hidrólise total das proteínas e sim uma possível desnaturação.

No estudo de Freitas *et al.* (2008) o conteúdo de proteína ficou entre 28,99 a 32,22% (fator de conversão 6,25). Os autores relataram que ocorre uma discrepância no valor protéico em virtude do uso do fator de conversão de nitrogênio para proteína.

Para cada produto existe um fator específico no qual leva em consideração a composição em aminoácidos. Na American Oil Chemist's Society (AOCS, 2004), estão reportados valores específicos para várias oleaginosas, com exceção da mamona.

O resultado para cinzas foi de 14,77 a 8%. O conteúdo de cinza é proporcional ao de hidróxido de cálcio Ca(OH)₂ adicionada aos ensaios. Valores similares foram reportados por Gomes (2007), que quantificou 11,4% de cinzas em farelo de mamona destoxificada.

Tabela 11. Análise centesimal do farelo de mamona extrudado g/100g em base úmida.

Ensaio	Umidade	Cinzas	Lipídeo	FDN	Proteína Total	NNP
1	3,49 ± 0,08 ^a	8,78 ± 0,02 ^k	0,87 ± 0,02 ^{ab}	58,45 ± 0,06 ^a	30,82	0,21
2	2,67 ± 0,21 ^{cdef}	12,79 ± 0,03 ^d	1,03 ± 0,01 ^{ab}	51,87 ± 0,76 ^{ghi}	29,61	0,41
3	2,08 ± 0,00 ^g	9,03 ± 0,03 ^{jk}	0,74 ± 0,02 ^{ab}	51,75 ± 0,05 ^{ghi}	35,31	0,20
4	2,26 ± 0,17 ^{fg}	14,77 ± 0,00 ^a	0,87 ± 0,00 ^{ab}	47,72 ± 0,07 ^j	27,14	0,40
5	3,12 ± 0,12 ^{abc}	9,27 ± 0,05 ^j	0,84 ± 0,01 ^{ab}	53,26 ± 0,66 ^{efgh}	30,42	0,29
6	3,28 ± 0,03 ^{ab}	13,84 ± 0,13 ^b	0,96 ± 0,01 ^{ab}	50,60 ± 0,36 ⁱ	32,72	0,28
7	2,54 ± 0,10 ^{defg}	9,30 ± 0,02 ^j	0,74 ± 0,04 ^{ab}	50,70 ± 0,02 ⁱ	32,49	0,21
8	2,67 ± 0,02 ^{cdef}	13,30 ± 0,00 ^c	0,73 ± 0,01 ^{ab}	53,99 ± 0,04 ^{defg}	33,12	0,24
9	2,26 ± 0,07 ^{fg}	11,93 ± 0,07 ^e	0,60 ± 0,01 ^b	51,21 ± 0,47 ^{hi}	34,56	0,32
10	2,46 ± 0,08 ^{defg}	11,09 ± 0,09 ^{gh}	0,75 ± 0,04 ^{ab}	56,47 ± 0,45 ^{abc}	31,63	0,24
11	2,72 ± 0,04 ^{cdef}	11,16 ± 0,00 ^{gh}	0,90 ± 0,02 ^{ab}	52,30 ± 0,42 ^{fghi}	31,68	0,31
12	2,41 ± 0,03 ^{defg}	10,54 ± 0,04 ⁱ	1,43 ± 0,03 ^a	56,11 ± 0,63 ^{bcd}	31,34	0,20
13	2,22 ± 0,03 ^{fg}	8,01 ± 0,06 ^l	0,82 ± 0,02 ^{ab}	47,07 ± 0,47 ^j	34,27	0,21
14	2,51 ± 0,03 ^{defg}	13,65 ± 0,04 ^{bc}	0,74 ± 0,03 ^{ab}	53,80 ± 0,33 ^{defg}	32,60	0,36
15	2,46 ± 0,02 ^{defg}	11,36 ± 0,00 ^{fg}	0,87 ± 0,04 ^{ab}	54,91 ± 0,45 ^{cde}	31,22	0,32
16	2,31 ± 0,15 ^{efg}	11,66 ± 0,06 ^{ef}	0,90 ± 0,10 ^{ab}	58,04 ± 0,02 ^{ab}	30,42	0,27
17	2,91 ± 0,05 ^{bcd}	10,28 ± 0,09 ⁱ	0,99 ± 0,10 ^{ab}	57,40 ± 0,69 ^{abc}	27,83	0,32
18	2,84 ± 0,00 ^{bcd}	10,97 ± 0,01 ^h	0,98 ± 0,16 ^{ab}	54,30 ± 0,34 ^{cdef}	30,13	0,38
19	2,80 ± 0,10 ^{bcde}	11,47 ± 0,06 ^f	0,99 ± 0,01 ^{ab}	53,90 ± 0,00 ^{defg}	30,59	0,41
20	2,52 ± 0,07 ^{defg}	11,94 ± 0,03 ^e	1,05 ± 0,51 ^b	47,74 ± 0,20 ^j	32,43	0,40

*Valores são: média ± desvio-padrão.

**Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (p ≤ 0,05).

***Teor de proteína calculado por Nitrogênio total-nitrogenio não proteico X fator de conversão para proteínas de oleaginosas 5,75

**** NNP = Nitrogênio não protéico

O farelo de mamona analisado neste trabalho é proveniente de uma usina de biodiesel que utiliza técnicas drásticas de extração, esgotando quase por completo o conteúdo de óleo na torta, o que justifica o baixo teor 0,60 a 1,43%.

O conteúdo de fibra detergente neutro (FDN) teve uma variação de 58,45% a 47,72%. O farelo desengordurado de mamona possui como característica principal alta concentração de fibra insolúvel (celulose, hemicelulose e lignina), portanto, o farelo de mamona extrudado ensaio (1 ao 20) pode ser considerado com alto teor de FDN quanto que Silva *et al.* (2010), observaram valor inferior, de 38,26%.

As pesquisas com farelo de mamona têm sido retomadas recentemente pela alta demanda do óleo para fabricação do biodiesel. O farelo de mamona destoxificada tem sido avaliado para inclusão na dieta de animais.

Reis (2008) verificou influencia da substituição do farelo de soja pelo farelo de mamona destoxificada na alimentação de ovinos. A substituição foi feita nas concentrações de 33%, 67% e 100%. O farelo foi destoxificado por autoclavagem, à temperatura de 121°C, por 60 minutos. Foi concluído que o consumo de proteína bruta foi superior quando a substituição foi 33%. O aumento de consumo de FDN para estes animais foi significativo.

Segundo o NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2001), o teor de FDN nas dietas de ruminantes deve possuir entre 25 e 36% de fibra insolúvel.

4.5 Quantificação e Identificação de Proteínas

4.5.1 Proteína da torta de mamona

As concentrações de proteínas extraídas e quantificadas segundo o método de Bradford (1976) apresentaram valores que variaram de 1,66 a 6,99 g/100g de torta, sugerindo que o método permite a extração da ricina e dos compostos alergênicos e não de outras proteínas. (Tabela 12, página 38). Estudos relacionados ao rendimento de extração de proteínas de torta de mamona ainda não são bem claros. O que tem sido observado é o estudo sobre o rendimento de proteína extraída a partir de semente (KIM, 2001; ANANDAN *et al.*, 2005), os autores relatam valores de extração de ricina na ordem de 0,3g/kg de semente. Deve-se ressaltar que essa extração foi realizada com HCl, pH 3.8 e que este é um líquido extrator diferente dos utilizados neste trabalho.

O estudo dos efeitos do pH e da concentração de NaCl na extração de proteína foi estabelecido através de um delineamento composto central (CCD), cujas variáveis codificadas e a resposta gerada estão dispostas na Tabela 4, página 19, no item Materiais e Métodos.

A Tabela 12 apresenta o resultado da análise de extração de proteína pelo método de Bradford.

Tabela 12. Quantificação de proteína extraídas da torta de mamona

Número do experimento (Solução tampão)	Níveis Codificados das Variáveis		Variável Resposta
	X1	X2	Proteínas/100g
1 Acetato de sódio 0,2M	4,6	0,3	1,657
2 Acetato de sódio 0,2M	4,6	1,7	2,657
3 Fosfato de potássio 0,2M	7,4	0,3	4,755
4 Fosfato de potássio 0,2M	7,4	1,7	6,735
5 Acetato de sódio 0,2M	4,0	1,0	1,662
6 Fosfato de potássio 0,2M	8,0	1,0	5,172
7 Fosfato de potássio 0,2M	6,0	0,0	1,844
8 Fosfato de potássio 0,2M	6,0	2,0	6,743
9 Fosfato de potássio 0,2M	6,0	1,0	6,303
10 Fosfato de potássio 0,2M	6,0	1,0	6,989
11 Fosfato de potássio 0,2M	6,0	1,0	6,092
12 Fosfato de potássio 0,2M	6,0	1,0	6,119

X1 = pH

X2 = Concentração de NaCl

Tabela 13. Teste F da análise de variância para as soluções tampões

Fator	SQ ¹	GL ²	MQ ³	Fcalc ⁴	Ftab ⁵
Regressão	48,0347	5	9,606935	18,73017	1% = 8,75
Resíduo	3,0775	6	0,512912		5% = 4,39
Falta de Ajuste	2,54967	3			10% = 3,11
Erro puro	0,52780	3			
Total	51,11215	11			
R² = 0,93979					

¹Soma dos quadrados; ²Grau de liberdade; ³Quadrado médio; ⁴F calculado; ⁵F tabelado⁵;⁶Coefficiente de regressão.

O modelo apresenta um bom resultado para o coeficiente de regressão ($R^2= 0,94$), indicando que quase 94% da variação encontrada se deve às variações dentro dos ensaios (pH e NaCl) e não a erro ou a outro fator . O valor de F (por extenso) calculado é superior a 4 vezes maior que F tabelado, com 5% de significância, e mais de 2 vezes maior que o nível de significância de 1%. (Tabela 13). Quanto maior for o teste F calculado, mais preditivo é o modelo (BOX e WETZ,1973).

Dos cinco diferentes valores de pH (4,0; 4,6; 6,0; 7,4; 8,0) e concentrações de NaCl (0,0 M; 0,3 M; 1,0 M; 1,7 M; 2,0 M) utilizados, o ensaio de maior rendimento protéico foi o de número 10 (pH = 6.0; NaCl = 1.0M) chegando a valores quatro vezes maiores que o encontrado no de mínima extração de proteína, observado no tratamento 1 (pH = 4.6; NaCl = 0.3M) (Tabela 5, Figura 1).

A melhor faixa de pH para extração de proteínas de torta de mamona encontra-se entre 6,3 e 7,4, bem como a melhor concentração de NaCl para extração de proteínas de torta de mamona na faixa entre 1,1 e 1,8M. (Figura1).

A amostra escolhida para dar continuidade aos outros estudos foi a de número 4 (tampão fosfato 0.2M/ NaCl 1.7M pH 7.4), por estar dentro dos limites máximos de extração destas proteínas.

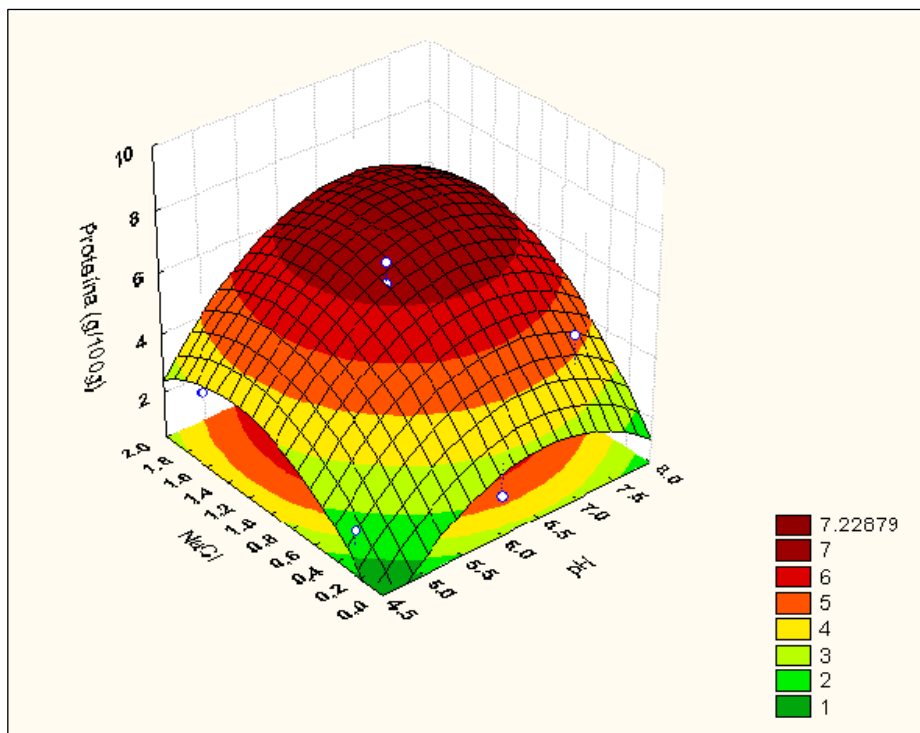


Figura 14. Superfície plotada do teor de proteína extraída da torta de mamona em função do pH e da concentração de NaCl.

As 12 amostras variando o pH e a molaridade de NaCl foram preparadas e submetidas à análise do perfil protéico por eletroforese em SDS-PAGE. Pela evidênciação no gel de eletroforese não houve extração preferencial de ricina nos tratamentos testados (Figura 14). Pode-se verificar que o bandejamento típico das duas cadeias da proteína (A e B) foi observado, apresentando neste trabalho massa molecular calculada de 38 e 36 kDa, respectivamente. Estes resultados de valores de massa molecular estão próximos aos obtidos por Lord *et al.* (1994); Godoy *et al.* (2009); Anandan *et al.* (2005). Foi verificado que a ricina é uma proteína abundante na torta de mamona, já que a intensidade das bandas é alta. No entanto, também se observam outras bandas significativas, referentes a proteínas de alta e baixa massa molar. Ainda é importante mencionar que não houve diferença qualitativa entre as amostras analisadas, conferindo fidedignidade na escolha do tampão adequado para extração.

Quanto à intensidade de coloração do gel de poliacrilamida, pode-se dizer que o presente trabalho mostrou resultados melhores do que aqueles descritos por Machado *et al.* (1992) e Stephan *et al.* (2008). Este resultado deve-se as análises das condições dos tampões usados na extração, com método de soluções extratoras de proteínas mais adequadas para este material em estudo.

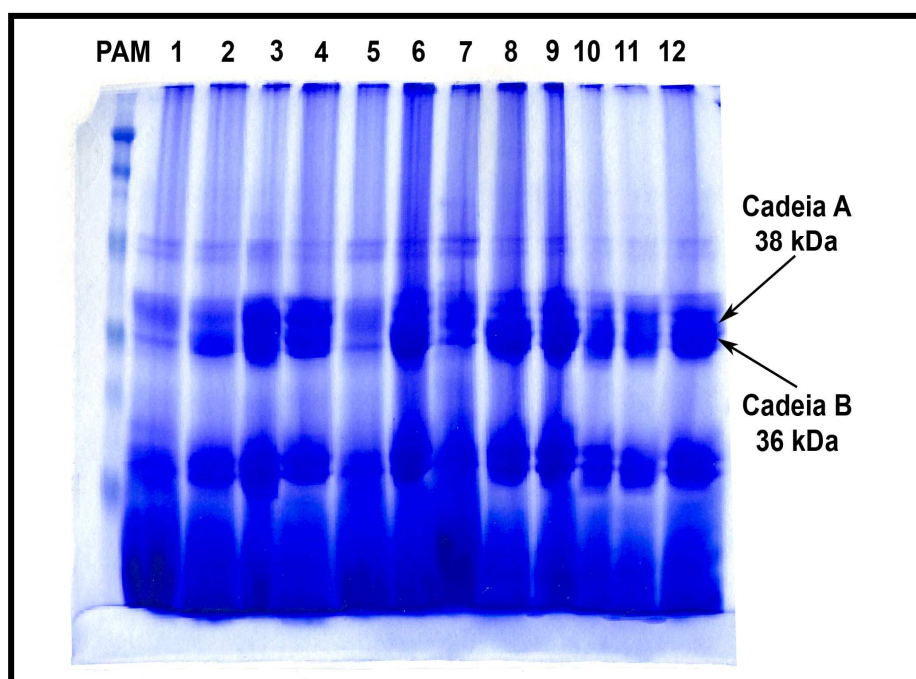


Figura 15. Padrão de identidade das proteínas extraídas de torta de mamona em diferentes soluções tampão.

PAM - Padrão de alta massa molecular; Poço 1- Acetato de sódio 0,2M/NaCl 0,3M pH 4,6; Poço 2- Acetato de sódio 0,2M/NaCl 1,7M pH 4,6; Poço 3- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 0,3M pH 7,4; Poço 4- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,7M pH 7,4; Poço 5- Acetato de sódio 0,2M/NaCl 1,0M pH 4; poço 6- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,0M pH 8; poço 7- Fosfato de potássio 0,2M pH 6; Poço 8- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 2,0M pH 6; Poço 9- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,0M pH 6; poço 10- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,0M pH 6; poço 11- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,0M pH 6; poço 12- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,0M pH 6.

Posteriormente, nas etapas de fracionamento que utilizaram diálise e precipitações com sulfato de amônio permitiram uma evidênciação melhor das duas cadeias polipeptídicas de ricina (Figura 16). Pode-se verificar que as etapas de fracionamento do extrato, compondo a diálise e precipitação com sulfato de amônio, geraram um gel mais limpo, pois não foi observado nem o rastro na amostra aplicada sem tratamento prévio nem a presença de material de alta massa molecular no topo do gel, observado em amostras submetidas somente à diálise.

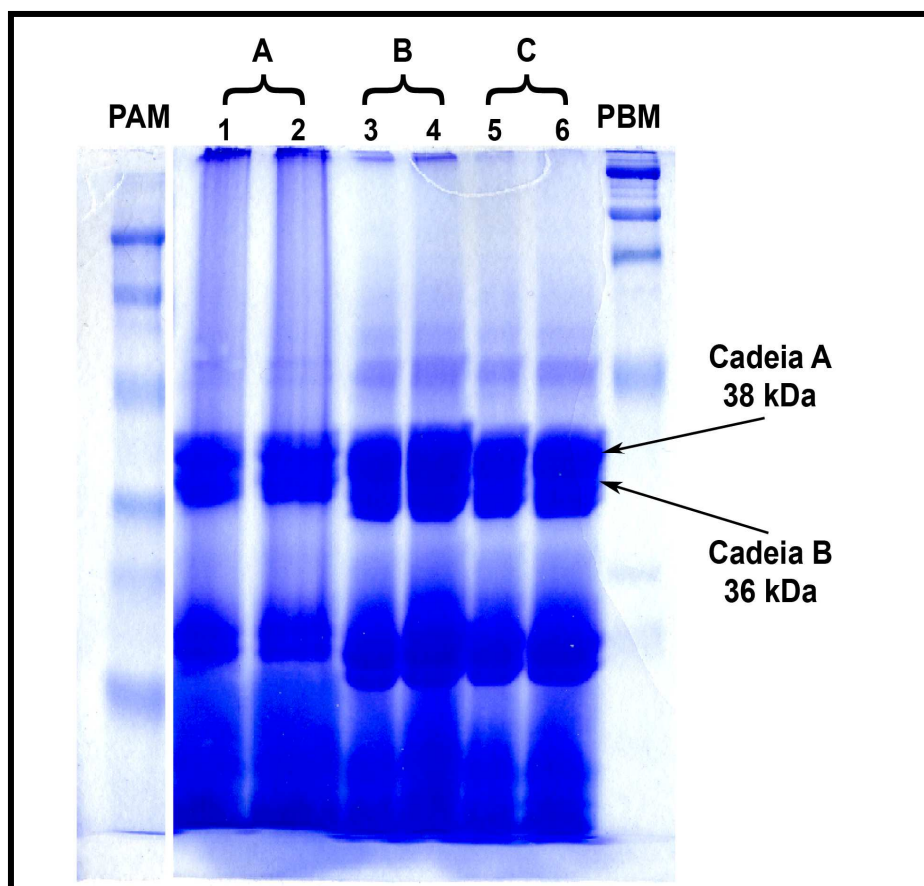


Figura 16. Sequência de purificação do extrato protéico de torta de mamona. PAM - Padrão de massa molecular; A – extrato 4 (1-30 μ L, 2-20 μ L); B - extrato 4 dialisado (3-30 μ L, 4-20 μ L); C- extrato precipitado com sulfato de amônio e dialisado (5- 30 μ L, 6-20 μ L).

4.5.2 Proteína do farelo de mamona extrudado

O farelo de mamona desengordurado foi submetido a diferentes condições do processo de extrusão termoplástica, conforme desenho experimental, apresentado na Tabela 6. As 20 amostras extrudadas foram também analisadas quanto às proteínas que as compõem. As amostras extrudadas foram preparadas utilizando a mesma metodologia de extração de proteína da torta de mamona (Tabela 4,ensaio 4, pag.19), visto que esta metodologia aplicada à torta favoreceu um bom rendimento quanto ao teor de proteína, principalmente a ricina. Assim, todas as amostras do farelo submetidas à extrusão foram extraídas em tampão fosfato 0,2M, pH 7,4 , adição de 1,7 M de NaCl e dialisadas.

As concentrações de proteínas extraídas, após extrusão, quantificada segundo o método de Bradford (1976), apresentaram valores que variaram de 0,17 a 1,70 g/100g, valores bem inferiores quando comparados com a torta não extrudada (1,66 a 6,99 g/100g). Fernandes *et al.* (2008), também utilizaram tampão fosfato pH 7 para solubilização das proteínas e sulfato de amônio para precipitação e obtiveram rendimentos que variaram de 1,4 a 2,5%, de proteína.

O ensaio 12, que teve como condição na extrusão 18% de umidade, temperatura de 183,64 °C e 5% de Ca(OH)_2 (Tabela 14, pag. 43), apresentou o menor rendimento de proteína (0,17%) quando comparado aos outros tratamentos. Analisando este dado, pode-se observar que este tratamento foi o que utilizou maior temperatura. Assim, sugere-se que aliando os fatores de alta temperatura na presença de uma força alcalina, aplicação de pressão e alta taxa de cisalhamento as proteínas que compõem a amostra sofreram importantes alterações estruturais. Imagina-se que, além de terem sofrido o processo de desnaturação protéica, uma possível hidrólise parcial possa ter ocorrido.

Ascheri *et al.* (2007), relatam que, durante a extrusão, as proteínas nativas passam por uma desagregação, na qual as cadeias se dissociam e formam filamentos desnaturados que se alinham no sentido do fluxo até a expulsão da máquina. Nas transformações químicas da desnaturação, as forças de estabilização das estruturas terciárias e quaternárias da proteína são enfraquecidas pela combinação da temperatura e compressão dentro do extrusor. Provavelmente sejam rompidas ligações iônicas, dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações fracas do tipo *van der Waals*.

Assim, com a desnaturação ocorrem mudanças químicas, físicas e biológicas nas proteínas que dependendo das condições do processo de extrusão podem gerar degradação, quebrando as proteínas a peptídeos de baixo peso molecular. Alta temperatura e alta pressão com elevada taxa de cisalhamento podem levar estas moléculas à hidrólise.

Os extratos protéicos extrudados dos diferentes experimentos previsto no delineamento experimental foram ainda submetidos à eletroforese em SDS-PAGE (Figura 17 e 18), e não apresentaram nenhuma banda visível, levando a crer que, realmente, houve hidrólise protéica, já que esta forma de eletroforese consegue visualizar peptídeos com massas molares a partir de 19 kDa. Inclusive o bandeamento da ricina não foi observado, apesar de ser uma proteína abundante no material. As amostras 21 e 22 serviram de controle do experimento, uma vez que não sofreram extrusão. A identidade da ricina pode ser observada com as bandas na região de 31 e 29 kDa.

A Tabela 13 mostra os resultados de quantificação de proteínas pelo método de Bradford dos 20 ensaios. Os valores variaram de 0,21 a 1,69%

Tabela 14. Resultados da extração de proteínas do farelo de mamona.

Ensaio	Níveis decodificados das variáveis			Proteína g/100g
	X1	X2	X3	
1	16	130	2,5	0,36
2	16	130	7,5	1,58
3	16	170	2,5	0,59
4	16	170	7,5	1,55
5	20	130	2,5	0,51
6	20	130	7,5	0,49
7	20	170	2,5	0,32
8	20	170	7,5	0,36
9	14,64	150	5,0	0,31
10	21,36	150	5,0	0,27
11	18	116	5,0	0,39
12	18	183	5,0	0,17
13	18	150	0,80	0,22
14	18	183	9,21	0,32
15 (C)	18	150	5,0	0,29
16 (C)	18	150	5,0	0,22
17 (C)	18	150	5,0	1,15
18 (C)	18	150	5,0	1,00
19 (C)	18	150	5,0	1,69
20 (C)	18	150	5,0	0,37

X₁ (%) umidade; X₂ temperatura; X₃ (%) hidróxido de cálcio Ca(OH)₂, e (C) repetição do ponto central

Os extratos protéicos que foram submetidos à eletroforese (SDS-PAGE) de poliacrilamida 15% (Figura 17) não apresentaram bandeamento da ricina, exceto o controle (farelo de mamona bruto) (Figura18) que apresentou bandeamento das cadeias A (31 kDa) e B (29 kDa).

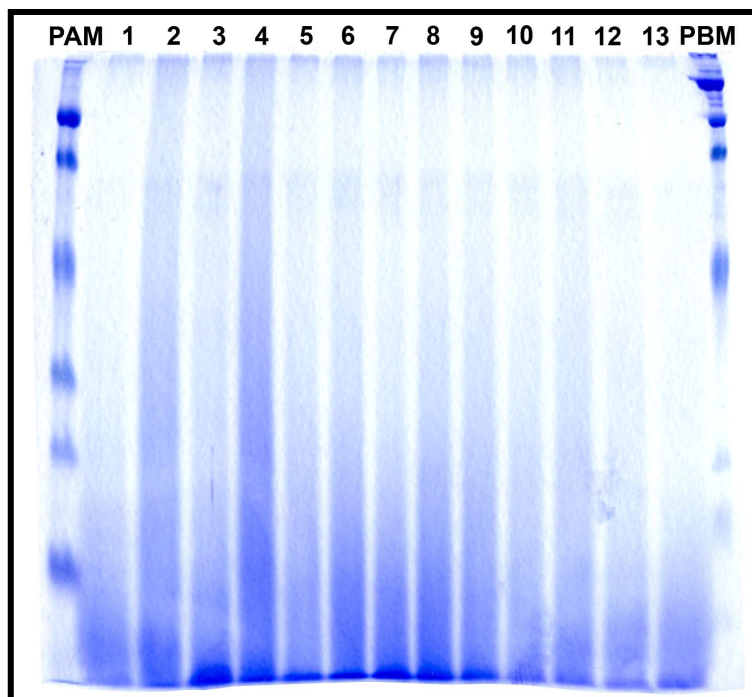


Figura 17. SDS-PAGE da purificação do extrato protéico do farelo de mamona extrudado - Ensaio 1 ao 13.

PAM - Padrão de alta massa molecular (20 μ l) ; PBM- Padrão de baixa massa molecular (20 μ l); Extrato protéico do farelo de

Barnes *et al.* (2008) observaram a eficiência dos métodos de destoxificação do farelo de mamona usando autoclave e constataram que a adição de hidróxido de sódio favoreceu a desnaturação da ricina. Os autores também verificaram que a ricina da torta da mamona, após prensagem a frio, pode ser desnaturada em autoclave após 10 minutos. Os autores ainda afirmam que o farelo de mamona, proveniente da indústria de biocombustível, sofre um processo mais agressivo por solvente a quente, portanto, é mais facilmente destoxificado quando comparado com a torta, por prensagem a frio.

Observa-se, na Figura 18, nos poços (14-20), que a extrusão se mostrou eficaz na destoxificação do farelo. As bandas das cadeias A e B podem ser vistas nos poços (21 e 22).

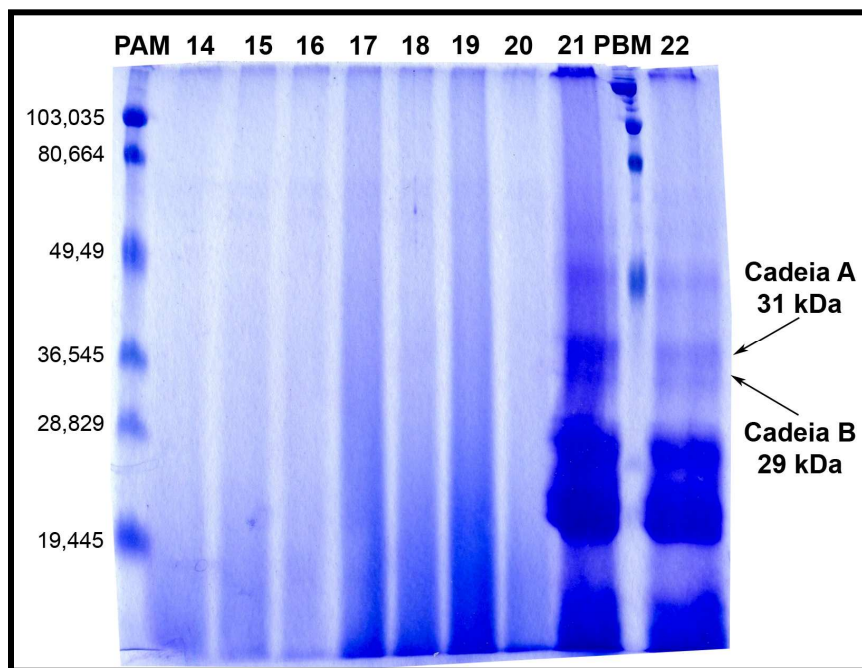


Figura 18. SDS-PAGE do extato protéico do farelo de mamona extrudado - Ensaio 14 ao 20.

PAM - Padrão de alta massa molecular (20 μ l); PBM - Padrão de baixa massa molecular - Extrato protéico do farelo de mamona ensaio (15-20) (30 μ l); Extrato de farelo de mamona bruto (21,22) (30 μ l).

Resultados iguais foram observados por (Tavares *et al.*, 2000), 31 kDa banda A e 29 kDa . O autor utilizou o mesmo método de extração da ricina proposto neste trabalho.

Os resultados obtidos por Anadan *et al.*, (2005), observaram o completo desaparecimento das subunidades da ricina nos tratamentos do farelo de mamona com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ na dose de 40g/kg de farelo e com autoclave (15 psi) por 60 minutos. O uso da $\text{Ca}(\text{OH})_2$ faz com que o pH seja elevado e com isso afeta as densidades das cargas e o balanço eletrostático intra e intermolecular impossibilitando a proteína de fazer interações, com isso favorecendo o processo de desnaturação proteica.

Pensando que poderia ainda haver pequena parte da amostra com proteínas de alta massa molar, optou-se por realizar a etapa de precipitação de proteínas com sulfato de amônio, seguido de centrifugação e diálise do precipitado, rico em proteínas. Desta forma, poderíamos concentrar esta possível semifração protéica que poderia não estar sendo visualizada.

A Figura 19 mostra o gel de eletroforese em SDS-PAGE após esta etapa de fracionamento. Foram aplicadas no gel as amostras que delimitam as principais alterações dos tratamentos realizados, sendo escolhidas para a realização deste gel as amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12. Como observado, nenhuma banda foi percebida após o tratamento proposto, reforçando a idéia de hidrólise parcial das proteínas do farelo da mamona.

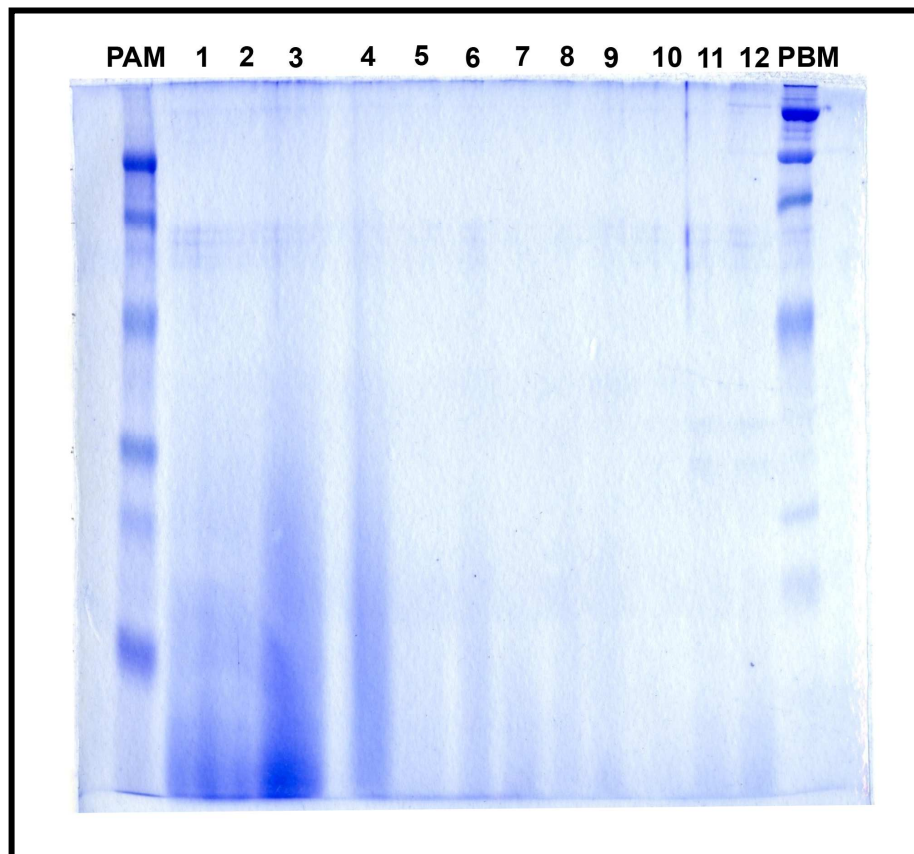


Figura 19. SDS-PAGE do precipitado protéico - Ensaio 1 ao 12.
PAM - Padrão de alta massa molecular (20 μ l); PBM -Padrão de baixa massa molecular (20 μ l).

A (Figura19) mostra que os poços de aplicação no gel de poliacrilamida 18% não ficaram bem definidos usando tratamento de precipitação com sulfato de amônio. Por este motivo foi realizada uma análise SDS-PAGE com o extrato proteico, visto que a fração protéica poderia ter sido perdida na diálise. Isso não ocorreu, podemos ver que no gel do extrato protéico as cadeias polipeptídicas da ricina também estão ausentes (Figura 17 e 18).

A Figura 20 mostra os resultados obtidos e, ainda assim, não foram observadas bandas referentes a proteínas em nenhuma das amostras testadas.

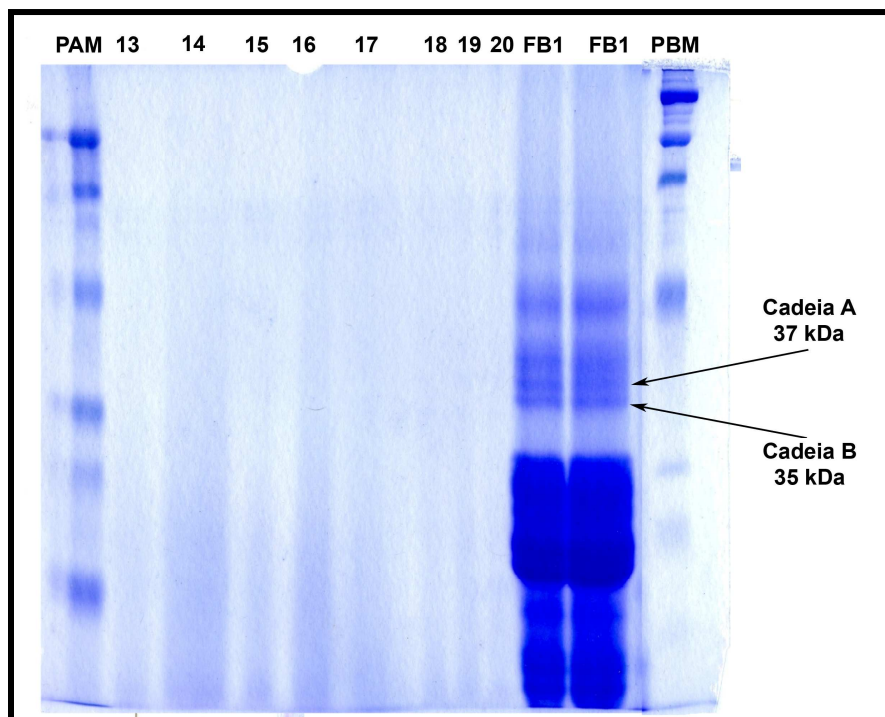


Figura 20. SDS-PAGE do Precipitado Protéico - Ensaio 13 ao 20. PAM-Padrão de alta massa molecular (20 μ l); PBM-Padrão de baixa massa molecular (20 μ l); FB1-Farelo de mamona extrato bruto (moagem grossa); FB2 Extrato protéico do farelo de mamona (moagem fina);.

Ainda pensando na hipótese de terem sido gerados peptídeos de menor massa molar, as amostras 11, 12, 16 e 19, poços 4,5,6 e 7 respectivamente foram aplicadas em um gel de acrilamida a 15%, na tentativa de reter estes peptídeos na malha do gel (Figura 21).

Como diversos autores fizeram adição de substâncias químicas alcalinas no processo de extrusão, a pergunta seria se este agente estaria diretamente relacionado com esta possível hidrólise. Então, optou-se, por realizar mais uma extrusão do farelo nas condições do ponto central sem adição do Ca(OH)_2 . A figura 21, poços 8 e 9 mostra que as amostras extrudadas, mesmo na ausência do agente alcalino, com diferentes temperaturas e umidade, também apresentaram o mesmo perfil anteriormente observado. As frações dos farelos de mamona não extrudados FB(farelo bruto extrato) e FBP (farelo bruto precipitado) foram aplicadas no gel como controle do experimento.

A (Figura 21) mostra a análise SDS-PAGE em gel de acrilamida 15% onde pode ser visto a aplicações de 30 μ l de extrato protéico bruto, 30 μ l de precipitado protéico, as amostras dos ensaio 11, 12, 16, 19, extrato e precipitado do farelo extrudado sem Ca(OH)_2 , 30 μ l e os padrões de alta e baixa massa molecular.

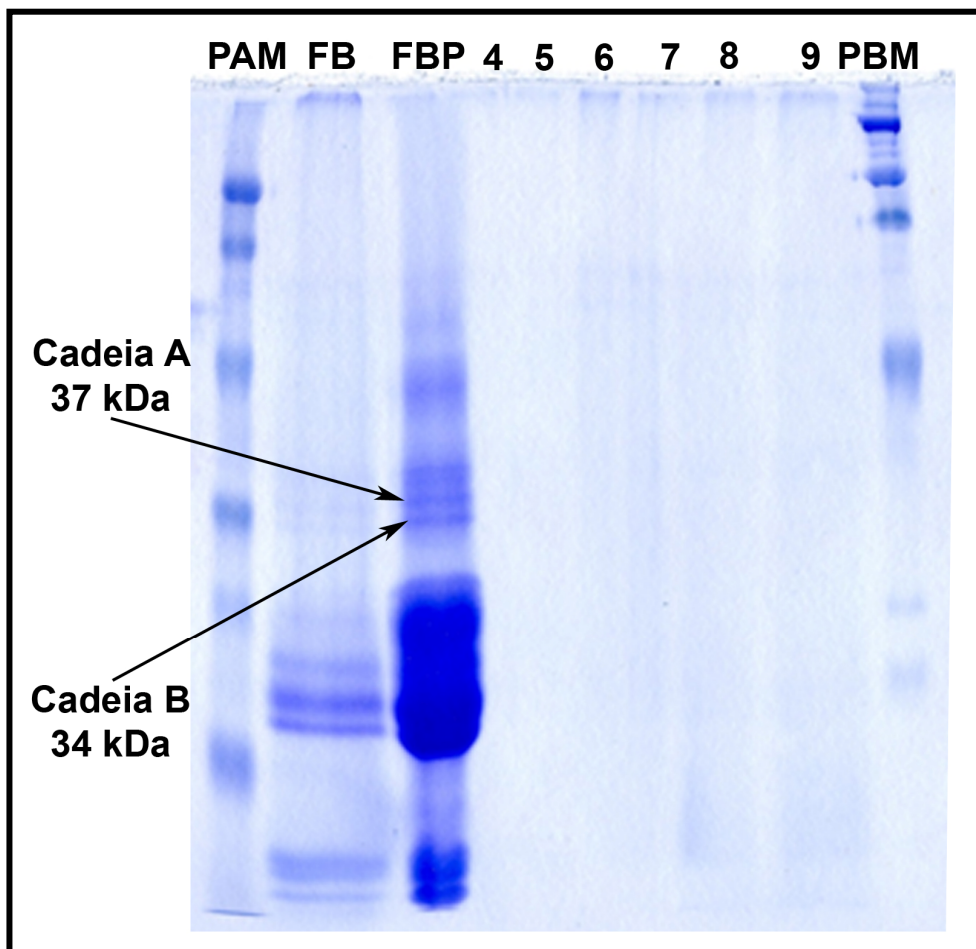


Figura 21. SDS-PAGE dos tratamentos com farelo de mamona.

PAM- Padrão de alta massa molecular (20 μ l); FB- Extrato bruto (30 μ l); Farelo precipitado Bruto(30 μ l); Poço (4,5,6,7) ensaios 11 ,12,16 e 19 respectivamente; 8-Extrato protéico do farelo de mamona extrudado sem adição de Ca(OH)_2 , (20 μ l) 9- Extrato protéico do farelo de mamona extrudado sem adição de Ca(OH)_2 (30 μ l); PBM- Padrão de baixa massa molecular.

Podemos também observar na Figura 21 que houve uma diferença na concentração de ricina entre os controles (FB-extrato e FBP-precipitado).

As subunidades A e B para o extrato aparecem com menos intensidade que as subunidades do precipitado. Este dado talvez seja devido a maior concentração de proteínas após a precipitação com sulfato de amônio.

De acordo com ANOVA existe interação entre os fatores unidade e formulação, indicando que a combinação de ambos afeta na variação de proteína. A variável resposta foi concedida pelo método de Bradford. O coeficiente de determinação foi muito baixo, R^2 (0,367), para que o modelo fosse preditivo. Não sendo assim gerado nenhum gráfico ou tabela.

Os ensaios 11, 12, 16, 19, tiveram o mesmo tratamento quanto a umidade (18%) e adição de Ca(OH)_2 (5 %), o que difere entre os tratamentos é a temperatura que foi 116°C , 183°C , 150°C , 150°C respectivamente.

O ensaio 12 foi o de maior temperatura, portanto menor teor de proteína 0,17 g/100g isso pode ser verificado pela (Tabela 14). Supostamente ocorreu além de desnaturação protéica uma possível hidrólise da cadeia polipeptídica.

Tantos os ensaios, quanto os farelos extrudados sem adição de Ca(OH)_2 após a extrusão não apresentaram as sub-unidades A e B da ricina.

4.5.3 Avaliação do Grau de Hidrólise das Proteínas do Farelo de Mamona

Os métodos Kjeldhal e Bradford foram comparados quanto ao grau de hidrólise obtida dos farelos extrudados e não extrudados, com e sem Ca(OH)_2 . Os valores referentes ao nitrogênio protéico e nitrogênio não protéico, assim como o teor de proteína por Bradford estão dispostos na (Tabela 15).

Tabela 15. Comparação entre os métodos de Kjeldhal e Bradford quanto ao teor de proteína quantificada e extraída após extrusão.

	Farelo Bruto	Farelo extrudado com Ca(OH)_2	Farelo extrudado sem Ca(OH)_2
NT	6,39	6,34	6,53
NNP	0,33	0,2	0,27
Bradford	5,36	0,59	0,60

NT = Nitrogenio total

NNP = Nitrogenio não protéico

O tampão (fosfato de potássio 0,2M pH 7.4) utilizado na extração das proteínas pelo método de Bradford foi eficaz na extração de ricina mostrando a possibilidade de extração total desta proteína através da estratégia de análise utilizada.

O método de Kjeldahl detecta nitrogênio de ácidos nucléicos, polissacarídeos aaminados, o que pode estar exacerbando os valores de nitrogênio total.

Quando comparado ao método de Bradford 5,36% de proteína extraída com o método de Kjeldahl 36%, verifica-se que este tampão pode não ser tão eficaz para extração de outras proteínas presente no farelo, quando comparada a ricina e os alérgenos.

Pelo método utilizado, pode-se identificar que a ricina é representada por um baixo percentual de proteína quando comparada com a proteína de Kjeldahl, chegando ao nível de hidrólise de 89% (Figura 23).

Pelo resultado de Bradford verifica-se que praticamente toda proteína foi hidrolisada, inclusive a ricina, confirmada pela eletroforese (Figura 16).

Pelo resultado de nitrogênio não protéico verifica-se que do total de proteína hidrolisada, somente 1,9 % (farelo bruto), 1,5% (farelo extrudado) e 1,55% (farelo extrudado sem Ca(OH)_2) foram identificados pelo método de Kjeldahl, isso pode ser explicado pelo fato de existirem cadeias polipeptídicas memores que 3.000 não detectada pelo método de Bradford que também esta sendo precipitado com ácido tricloro acético (TCA) usado para precipitar proteína no método de Kjeldahl.

As Figuras 22 e 23 representam o grau de hidrólise de proteínas no farelo pelo método de Kjeldahl e pelo método de Bradford respectivamente.

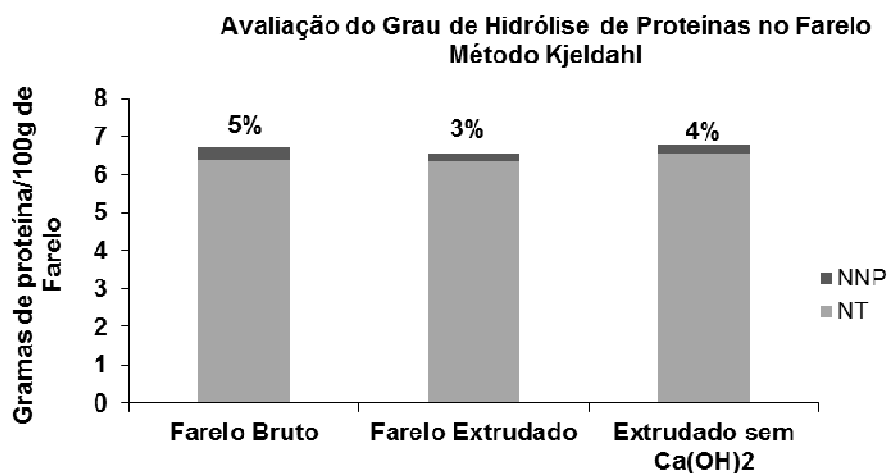


Figura 22. Avaliação do grau de hidrólise de proteínas no farelo de mamona por Kjeldahl após a extrusão.

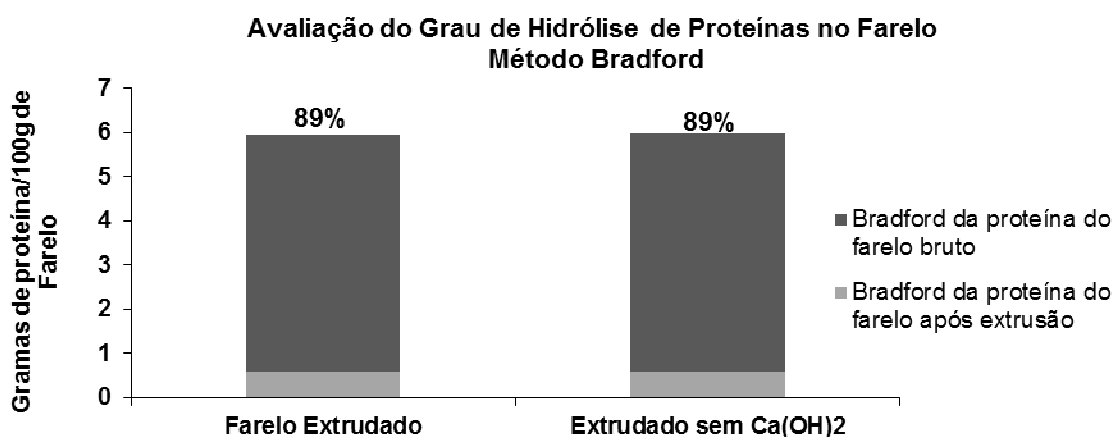


Figura 23. Avaliação do grau de hidrólise de proteínas no farelo de mamona por Bradford após a extrusão.

Através da avaliação do grau de hidrólise podemos observar que o método de Bradford se mostrou mais eficiente que o método de Kjeldahl. O método de Bradford quantificou que 89% da proteína foram hidrolisadas, enquanto que Kjeldahl quantificou em 5% (farelo bruto), 3% (farelo extrudado sem Ca(OH)₂) e 4% (farelo extrudado sem Ca(OH)₂).

5 CONCLUSÃO

De acordo com os ensaios realizados e resultados observados, conclui-se que o processo de extrusão termoplástica é uma tecnologia adequada para mudar estruturalmente a ricina.

A aplicação dos extratos protéicos da torta e do farelo de mamona bruto (não extrudado) no gel de eletroforese permitiram a observação nítida das cadeias A (RTA) e B (RTB) da ricina, utilizando a diálise e a precipitação com sulfato de amônio como métodos de purificação destes extratos.

Não pode ser avaliado o grau de hidrólise quanto à adição de hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 ao farelo de mamona, visto que ocorre a ausência da ricina no farelo extrudado de mamona com e sem adição de Ca(OH)_2 .

A extrusão termoplástica promoveu em todos os ensaios a hidrólise das proteínas com o desaparecimento da ligação dissulfídica das cadeias A (RTA) e B (RTB) da ricina.

Os resultados obtidos de quantificação de proteínas permitem concluir que a associação do tampão fosfato de potássio 0,2M com NaCl 1,7M em pH 7.4 foi eficaz para a extração total da ricina.

O processo de extração do óleo influencia a concentração de proteína. Observa-se na torta maior conteúdo de ricina que no farelo. Parte da ricina é hidrolisada na extração do óleo com solvente.

Através das aplicações dos extratos e precipitados protéicos da torta no gel de eletroforese, podem ser observados outras proteínas e peptídeos além da ricina.

Possibilidades de estudos adicionais

A identificação e quantificação destas proteínas e peptídeos presentes pós-hidrólise podem fazer parte de um estudo futuro, usando espectrometria de massa ou análises espectroscópicas.

Exames toxicológicos podem ser realizados com o intuito de verificar a toxicidade dos extrudados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACC – AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods of the American Association of Cereal Chemists**. 9 ed., Saint Paul, 1995. 442-446 p.
- ALFENAS, C. A.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de Proteínas e isoenzimas de Fungos e essências Florestais**. Viçosa: UFV. 1991. 242 p.
- ALONSO, R.; AGUIRRE, A.; MARZO, F. Effect of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. **Food Chemistry**, v. 68, p. 159-165, 2000.
- ALTAN, A.; McCARTHY, K.L.; MASKAN, M. Evaluation of snack foods from barley-tomato pomace blends by extrusion processing. *Journal of Food Engineering*, v.84, p. 231-242, 2008.
- ALVAREZ-MARTINEZ, L.; KOUNDURY, K. P.; HARPER, J. M. A general model for expansion of extruded products. **Journal of Food Science**, Chicago, v.53, n. 2, p. 609-615, 1988.
- ANANDAN, S; ANIL KUMAR, G.K.; GHOSH J., RAMACHANDRA K.S. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal Feed Science and Technology**, v. 120, n. 1, p. 159-168, 2005.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 18 ed., HORWITZ, W. (ed.). Washington, 2005.
- AOCS – AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 5 ed. Champaign: AOCS, 2004.
- ASCHERI, J. L. R. **Curso de processo de extrusão de alimentos: aspectos tecnológicos para o desenvolvimento e produção de alimentos para consumo humano e animal**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2008.
- ASCHERI, J. L. R.; MACIEL, F. M.; CARVALHO, C. W. P. de; FREITAS, S. C. de; MACHADO, O. L. T. Destoxificação de torta de mamona por extrusão termoplástica: estudo preliminar. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: ABIPTI: MCT, 2007. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/coproduto/9.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2009.
- AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, M., SCHIER J., OSTERLOH J. Ricin poisoning: A comprehensive review. **The Journal of the American Medical Association**, v. 294, n. 18, p. 2342-2351, 2005.
- AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. (ed.). **O Agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001. 350 p.

BALAGOPALAN, C. Cassava utilization in food, feed and industry. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. C. **Cassava: biology, production and utilization**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 301-318.

BANDEIRA, D. A.; CARTAXO, W. V.; SEVERINO, L.S. Resíduo industrial da mamona como fonte alternativa na alimentação animal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. Energia e sustentabilidade - Anais... Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.

BARNES, D. J.; BALDWIN, B. S.; BRAASCHA D. A. Degradation of ricin in castor seed meal by temperature and chemical treatment. *Industrial Crops and Products*. n. 29, p.509-515, 2009.

BELTRÃO, N. E. de M.; CARTAXO, W. V.; PEREIRA, S. R. P; SOARES, J. J.; SILVA, O. R. R. F. **O cultivo sustentável da mamona no semi-árido brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão. 2006. 23 p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 84).

BELTRÃO, N. E. de M.; OLIVEIRA, M. I. P. **Detoxificação e aplicações da torta de mamona**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009. 35 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 217).

BELTRÃO, N. E. M. **Torta de Mamona (*Ricinus communis* L.): Fertilizante e Alimento**. Campina Grande: Embrapa Algodão. 2002. 6 p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 171).

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1985. 367 p.

BOONYASIRIKOOL, P.; CHARUNUCH, C. Development of nutritious soy fortified snack by extrusion Cooking. **Kasetsart Journal: Natural Science**, v. 34, n. 3, p. 355-365, 2000.

BOSE, M. L. V.; WANDERLEY, R. C. Digestibilidade e balanço metabólico da fração nitrogenada do farelo de mamona desintoxicado e de feno de alfafa em ovinos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 17, n. 5, p. 456-464, 1988.

BOX, G.E.P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building**. New York: John Wiley & Sons, Incorporated, 1978. 672 p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, N. M. **Métodos de identificação e quantificação de ricina e ricinina na torta de mamona**. 2005. 108 p. Tese (Doutorado em Química Analítica)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

CAMIRE, M. E., CAMIRE, A., KRUMHAR, K. Chemical and nutritional changes in foods during extrusion. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, p. 35-56, 1990.

CAMIRE, M. E. Protein functionality modification by extrusion cooking. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 68, n. 3, p. 200-205, 1991.

CARVALHO, R.V. **Formulações de snacks de terceira geração por extrusão: caracterização textuométrica e microestrutural.** 2000. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

CHEYNE, A.; BARNES, J.; WILSON, D. I. Extrusion behaviour of cohesive potato starch pastes: I. Rheological characterization. **Journal of Food Engineering**, v. 66, n. 1, p. 1-12, 2005.

CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Aplicação industrial do óleo. In: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 89-118.

CHUANG, G. C. C.; YEH, A. I. Effect of screw profile on residence time distribution and starch gelatinization of rice flour during single screw extrusion cooking. **Journal of Food Engineering**, v. 63, n. 1, p. 21-31, 2004.

COPELAND, L. O. **Principles of Seed Science and Technology.** Minneapolis: Burgess, 1976. 369 p.

CRESPO NETO, H. A.; OLIVEIRA, N. D.; MACHADO, O. L. T. Avaliação dos teores de ricina e de proteases envolvidas no processamento desta toxina e a desativação de epitopos alergênicos presentes em torta de mamona (*Ricinus communis* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3., 2008, Salvador. Energia e ricinoquímica – Anais... Salvador: SEAGRI; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. 1 CD-ROM.

DEUS-DE-OLIVEIRA, N.; FELIX, S. P.; MACHADO, O. L. T. Desativação de alérgenos presentes na torta de mamona. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 2., 2007, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Redenet, 2007.

DIVISION OF OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (Estados Unidos da América). Ricin. 7 p. Disponível em: <<http://dohs.ors.od.nih.gov/pdf/Ricin%20REVISED.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2010.

ENDO, Y., TSURUGI, K.. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 17, p. 8128-8130, 1987.

ENDO, Y.; GLÜCK, A.; WOOL, I. G. Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 221, n. 1, p.193-207.1991.

EVANGELISTA, A.R.; LOPES, J; ABREU, J. G.C N. P; FRAGA, A. C. Avaliação da composição química de tortas de amendoim e mamona obtidos por extração com etanol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. Energia e Sustentabilidade – **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática.** 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 602 p.

FERNANDES, K. V.; MACIEL, F. M.; MACHADO, O. L. T. Análise dos níveis de albuminas 2s e de ricina em sementes de diferentes cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3., 2008, Salvador. Energia e

ricinoquímica – Anais... Salvador: SEAGRI; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. 1 CD-ROM.

FODSTAD, O.; OLSNES, S.; PIHI, A. Toxicity, distribution and elimination of the cancerostatic lectins abrin and ricin after parenteral injection into mice. **British Journal of Cancer**, v. 34, p. 418-425, 1976.

FREIRE, R. M. M. Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 49-85.

FREITAS, S. C.; ANTONASSI, R.; OLIVEIRA, L. A. A. et al. Composição de farelo desengordurado de variedades de mamona cultivadas no município de Itaocara, Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3., 2008, Salvador. Energia e ricinoquímica – Anais... Salvador: SEAGRI; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. 1 CD-ROM.

GAMA, C. C.; OLIVEIRA, N. D.; FELIX, S. P.; MACHADO, O. L. T. Desativação de alérgenos de mamona pelo uso do reagente woodward (WRK). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3., 2008, Salvador. Energia e ricinoquímica – Anais... Salvador: SEAGRI; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. 1 CD-ROM.

GARDNER JUNIOR, H. K.; D'AQUIN, E. L.; KOULTUN, S. P.; McCOURTNEY, E. J.; VIX, H. L. E.; GASTROCK, E. A. Detoxification and deallergenization of castor beans. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 37, p. 142-148, 1960.

GERMANI, R.; BENASSI, V. T.; CARVALHO, J. L. V. **Métodos de avaliação de grão e farinha de trigo**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 1997. 84 p. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Documentos, 28).

GODOY, M. G. et al. Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 317-322, 2009.

GOMES, F. H. T. Composição químico-bromatológica e degradação *in situ* de nutrientes coprodutos da mamona e do pinhão-manso da cadeia produtiva do biodiesel. 2007, 50 p. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

GUTKOSKI, L. C. Extrusão de produtos de aveia. In: GUTKOSKI, L. C.; PEDÓ, I. **Aveia: composição química, valor nutricional e processamento**. São Paulo: Varela, 2000. p. 103-169.

HARTLEY, M. R.; LORD, J. M. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins & Proteomics**, v. 1701, n. 1-2, p. 1-14. 2004.

HOLFELDER, M. G. A. H. Ricinine in phloem sap of *Ricinus communis*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1461-1463, 1998.

ICOA – INTERNATIONAL CASTOR OIL ASSOCIATION. The processing of castor meal for detoxification and deallergenation. Ridgewood, 1989. 75 p. (Technical Bulletin, 1).

ISHIGURO, M.; TAKASHISHI, T. Biological studies on ricin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 55, p. 587-592, 1964.

KABAT, E. A.; HEIDELBERGER, M.; BEZER, A. E. A study of the purification and properties of ricin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 168, p. 629-639, 1947.

KENT, N. L. Composición química de los cereales. In: **Tecnología de los cereales**. Trad. M. Catalan Calvo e M. Gonzales Alonzo. Zaragoza: Editorial Acribia, 1971. p. 36-62.

KIM, B.K. Effects of oil milling steps on residual toxin and antigen activities of castor bean. **Food Science and Biotechnology**, v.10, n.3, p.305-310, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEITE, A. C.; FERNANDES, J. B.; CABRA, E. C.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. das G. F. Isolamento do alcalóide ricinina das folhas de *ricinus communis* através de cromatografias em contra corrente. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 983-985, 2005.

LIMA, C. C. A.; SILVA, L. J. da; CASTRO, W. S. **Apostila de morfologia externa vegetal**. Uberlândia: UFU, 2006. Disponível em: <<http://www.anatomiavegetal.ib.ufu.br/pdf-recursos-didaticos/morfvegetalorgaSEMENTE.pdf>>. Acesso em: 03 jan. 2011.

LIMA, E.P. Estudo da estrutura e função da ricina e de tecnologia para o uso da torta de mamona como alimento animal. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA. 2., 2007. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Redenet, 2007. Disponível em: <http://www.redenet.edu.br/publicacoes/arquivos/20080922_085931_AGRO-024.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2010.

LORD, J. M., ROBERTS L. M., ROBERTUS J. D. Ricin-structure, mode of action, and some current applications, **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 8, p. 201-208, 1994.

MACHADO, O. L. T.; MARCONDES, J. A.; SOUZA-SILVA, F. de; HANSEN, E.; RIBEIRO, P. D.; VERÍSSIMO, M.; KANASHIRO, M.; KIPNIS, T. L.; SILVA JUNIOR, J. G. da; SANTOS, M. F. dos; COSTA E SILVA, M. C. Characterization of allergenic 2S albumin isoforms from *Ricinus communis* seeds. **Allergologie**, v. 26, p. 45- 51, 2003.

MACHADO, O.L.T. Purificação e caracterização de uma proteína alergênica. Ric C III, isolada das sementes de *Ricinus communis*. Estrutura primária parcial. 1992. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1992.

MACHADO, O.L.T.; SILVA, J.G.; An allergenic 2S storage protein from *Ricinus communis* seeds which is part of the albumin precursor predict by c-DNA data. **Brazilian Journal of Medical and Biological research**, v. 25, p. 567-582, 1992.

MACKINNON, P. J.; ALDERTON, M. R. An investigation of the degradation of the plant toxin, ricin, by sodium hypochlorite. **Toxicon**, v. 38, n. 2, p 287-291, 2000.

MELO, W. C.; SILVA, D. B.; PEREIRA JUNIOR, N.; ANNA, L. M. M. S.; SANTOS, A. S. Produção de etanol a partir de torta de mamona (*Ricinus communis* L.) e avaliação da letalidade da torta hidrolisada para camundongos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1104-1106, 2008.

MIRANDA, R. M.; BAREIRA, H. A.; FARIA, E. V.; MACHADO, D. D. **O farelo de mamona destoxicado na alimentação de novilhas leiteiras**. Rio de Janeiro: Instituto de Zootecnia, 1961. 12p. (Publicação, 41).

MONTFORT, W.; VILLAFRANCA, J. E.; MONZINGO, A. F.; ERNST, S. R.; KATZINQ, B.; RUTENBER, E.; XUONG, N. H.; HAMLIN, R. e ROBERTUS, J. D. The three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 5398-5403, 1987.

MONZINGO, A. F.; COLLINS, J.; ERNST, S. R.; IRVIN, J. D.; ROBERTUS, J. D. The 2.5 Å structure of pokeweed antiviral protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 233, p. 705-715, 1993.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda, 1998. 150 p.

MOSHKIN, V. A. **Castor**. New Delhi: Amerind Publishing, 1986. 315 p.

NAIME, N. **Embalagens ativas de fonte renovável**. 2010. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

NARANG, U.; ANDERSON, G. P.; LIGLER, F. S.; BURANS, J. U. Fiber optic-based biosensor for ricin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 12, n. 9-10, p. 937-945, 1997.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001. 381p.

OLSNES, S. The history of ricin, abrin and related toxins. **Toxicon**, v. 44, p. 361-370, 2004.

OSBORNE, T. B. **The vegetable protein**. Monography in biochemistry. 2 ed. London: Longmans Green. 1924. p.

POLI, M. A.; RIVERA, V. R.; HEWETSON, J. F.; MERRIL, G. A. Detection of ricin by colorimetric and chemiluminescence Elisa. **Toxicon**, v. 32, n. 11, p. 1371-1377, 1994.

REIS, M. L. Farelo de mamona destoxicado em dietas para terminação de ovinos em confinamento. 2008. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2008.

ROUSSEFF, D. **Biodiesel: O novo combustível do Brasil**. [S. I.]: Ministério de Minas e Energia, 2004. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/Apres_MinistraME_06-12-04.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2010.

SAVY FILHO, A.; BENZATTO, N.V.; BONDOZ, M.Z. Mamona. In: **OLEAGINOSAS NO ESTADO DE SÃO PAULO: ANÁLISE E DIAGNÓSTICO**. Coordenadoria de Assistência Técnica Integrada-CATI, Campinas, 1999, p. 29-39.

SEVERINO, L. S.; MORAES, C. R. de A.; GONDIM, T. M. de S.; CARDOSO, G. D. SANTOS, J. W. dos. Fatores de conversão do peso de cachos e frutos para peso de sementes de mamona. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 15 p. (Embrapa Algodão. Boletim de Pesquisa, 56).

SILVA, D. C.; ALVES, A. A.; VASCONCELOS, V. R.; NASCIMENTO H. T. S. N.; MOREIRA FILHO, M. A.; OLIVEIRA, M. E. Metabolismo dos compostos nitrogenados em ovinos alimentados com dietas contendo farelo de mamona destoxificado. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 32, n. 2, p. 219-224, 2010.

SILVA, J. A. **Simulação de um aquecedor solar de água como etapa do processo de detoxicação da torta de mamona**. 2007. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2007.

SILVA, J. J. N. Caracterização edafoclimática em um cultivo de mamona (*ricinus communis* L.) em vale aluvial no agreste de Pernambuco. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

SIMMONDS, D.H.; ORTH, R.A. Structure and composition of cereal protein as related to their potential utilization. In: POMERANZ, Y. (Ed.). Industrial uses of cereals. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, p.51-120, 1973.

SINGH, S; GAMLATH, S; WAKELING, L. Nutritional aspects of food extrusion: a review. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 42. p. 916-929, 2007.

GRUPO RURAL. Seção rural sementes oleaginosas – mamona. Disponível em: <<http://www.ruralbioenergia.com.br/default.asp?tipo=1&secao=mamona.asp>>. Acesso em: 23 jun. 2009.

SOUZA, Z. M.; MARQUES JÚNIOR, J.; PEREIRA, G. T. Variabilidade espacial da estabilidade de agregados e matéria orgânica do solo sob cultivo de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 491-499, 2004.

STEPHAN, M. P. ; CARVALHO, C. W. P. ; ASCHERI, J. L.R.; ROSS, A. V. Implantação do método de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para visualização de proteínas de torta de mamona. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2008. 3 p. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Comunicado técnico, 136).

TÁVORA, F. J. A. F. **A cultura da mamona**. Fortaleza: EPACE, 1982. 105 p.

TEIXEIRENSE, M. **Conjuntura mensal**. [S. I.]: Conab, 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/2afcb78e74135e0ee44406b2d9f72ee8..pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2010.

VIEIRA, R. M.; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S. Diagnóstico e perspectivas da mamona no Brasil. In: REUNIÃO TEMÁTICA DE MATÉRIAS-PRIMAS OLEAGINOSAS NO BRASIL, 1., 1997, Campina Grande. Diagnóstico, perspectivas e prioridades de pesquisa – **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão/MAA/ABIOVE, 1998. p.139-150. (Embrapa Algodão. Documentos, 63).

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2 ed. New York, John Wiley & Sons, Incorporated, 1995. 1360 p.

WEISS, E. A. Castor. In: WEISS, E. A. **Oil seed crops**. London: Longman, 1983. p. 31-99.