

ESTUDO SÔBRE A IMUNOGENICIDADE DE AMÊNDOAS DE CACAU (1)

STUDY ON THE IMMUNOGENICITY OF COCOA BEANS

YEHUDA LEVANON (2)
STELA M. O. ROSSETINI (2)

SUMMARY

Beans and pulp of the cocoa fruit were submitted to laboratory fermentation reproducing farm processing conditions.

Comparing the extracts of fermented, partially fermented and fully fermented beans, it was observed a parallelism between the gradual decrease of the glycodes content and the progressive decrease of the immunological activity.

Glycide nature of the antigen was demonstrated by staining with Schiff reagent of the material submitted to gel-electrophoresis, chromatography and acid hydrolysis.

One of the antigens, "Fraction A" present in extracts of unfermented beans shows a 1-4 linkage while the other, "Fraction B" linkages are in position 1-6.

By dialysis it was shown that only antigen ("Fraction B") present in extracts of incompletely fermented beans is constituted by molecules smaller than "Fraction B" found in extracts of fermented beans.

Adequate beans for the chocolate industry do not show immunological components.

A rapid and simple ring test is proposed for determining the degree of fermentation (quality of the farm product) of the cocoa beans.

INTRODUÇÃO

LEVANON & MARTELLI¹ verificaram que extratos de amêndoas de cacau não fermentadas eram imunogênicos, ao contrário do das amêndoas adequadamente fermentadas. Com base neste achado, LEVANON² propõe um método sorológico para determinação do grau de fermentação das amêndoas de cacau. Este método é menos influenciado pela interpretação pessoal do analista, que os outros anteriormente empregados, os quais são baseados no aspecto físico das amêndoas ou na coloração de sua superfície de corte, e conduz a resultados precisos e reproduzíveis para o contrôlo da qualidade do produto rural.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho apresenta novos estudos sôbre a imunogenicidade do cacau submetido aos processos rurais de fermentação.

Foram empregadas amêndoas das variedades "Forasteiro", "Catongo" e "Crioulo" de plantas de *Theobroma cacao*, cultivadas na Estação Experimental de Cacau, Uruçuca, Estado da Bahia, Brasil. Amostras de cada variedade foram colhidas separadamente, lavadas com água corrente para eliminar a polpa, sêcas a 37° C e conservadas a temperatura ambiente. Também foram utilizadas amostras comerciais obtidas de exportadores das cidades de Itabuna e

(1) Trabalho laureado com o Prêmio "Adolfo Lutz" de Ciências Biológicas, Bioquímicas e de Saúde Pública, de 1965.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

Ilhéus (Estado da Bahia) *. A determinação da qualidade das amêndoas foi feita de acordo com DE WITT³. Polpa do fruto (mel de cacau) foi coletada separadamente dos frutos de cada variedade em frascos Erlenmeyer e congelada a -45° C. A polpa descongelada apresentou valores de pH de aproximadamente 3,8. Uma amostra de *Saccharomyces* sp., isolada de caixa de fermentação na Estação Experimental de Cacau, Uruçuca, e mantida em meio de Sabouraud, foi empregada para as fermentações no Laboratório.

Porções de 200 cm³ de polpa foram esterilizadas por filtração em filtros Seitz, colocadas em frascos Erlenmeyer e incubadas durante 72 horas a 37° C para detecção de eventual turvação por indesejável crescimento microbiano. Duzentas amêndoas não fermentadas, previamente lavadas com solução de mertiolato a 1% e posteriormente com água destilada esterilizada, foram adicionadas a cada frasco. Os frascos foram incubados à temperatura ambiente, com 1 cm³ da suspensão do levedo, cuja turvação era equivalente à do tubo n.º 3 da escala de McFarland. Durante a fermentação, foram retiradas amostras cada 24 horas e preparados antígenos que foram testados por imunoprecipitação. Quando indicado, os extratos de amêndoas foram concentrados por liofilização, sendo depois dissolvidos no volume requerido de solução fisiológica.

As preparações obtidas no laboratório foram marcadas: "F", as bem fermentadas; "PF", as parcialmente fermentadas; "NF", as não fermentadas; "OF", as excessivamente fermentadas. A proporção de amêndoas bem fermentadas (boa qualidade) contidas na amostra era representada por um número na parte superior da marca, enquanto que um número na parte inferior da mesma representava a duração da fermentação em horas. Por exemplo, PF⁷⁰₇₂ indica que esta preparação foi feita de uma amostra de amêndoas fermentadas durante 72 horas (fermentação parcial, incompleta) e contém 70% de amêndoas de boa qualidade.

Os polissacarídeos totais foram determinados pelo método da antrona, descrito por

TREVELYAN & HARRISON⁴; polifenóis, pelo método de permanganato, descrito por FORSYTH⁵ e nitrogênio, por processo micro-Kjeldhal, segundo ELEC & SÓBOTKA⁶. Substâncias gordurosas foram determinadas em amostras de 10g extraídas em Soxhlet e pesadas diretamente. Foram feitas cromatografias ascendentes em fitas de 36 x 11 cm de papel Whatman n.º 1, usando fenol-água (8:2) como solvente, que era adicionado de 0,01% de Triplex "Merk" (etilenodiamin-tetracetato de sódio) para evitar oxidação, empregando-se 0,01 cm³ de antígeno em estudo, deixando-se correr durante 24 horas. Após secagem a 90°C, os cromatogramas foram relevados com reagente de antrona, descrito por SUNDERWITH *et alii*⁷, ou com reagente de difenilaminofosfato de anilina, segundo GRI & NICAM⁸. As porções correspondentes às manchas previamente reveladas em 25 fitas foram cortadas e eluídas com 10 cm³ de água destilada, por agitação mecânica durante 24 horas, liofilizadas e finalmente dissolvidas em 0,5 cm³ de solução fisiológica.

Cromatografias em DEAE-celulose (dietilaminoetil-celulose) foram feitas em colunas de vidro de 30 x 2,7 cm. A coluna era lavada repetidamente com solução-tampão de fosfatos 0,02M até obtenção do líquido de lavagem, com pH 7,4. Quantidades de 5 cm³ das preparações de polpa de cacau eram colocadas na coluna, adaptada a um coletor de frações, colhendo-se quantidades de 6 cm³ pela adição da solução-tampão acima citada. Cada tudo era testado pelo reagente de antrona e o material dos tubos, apresentando reação positiva, era misturado e marcado como "Fração A". A seguir, a coluna era eluída com solução-tampão de citrato 0,02M, pH 3,8 e os tubos com reação de antrona positiva foram reunidos e marcados "Fração B". As "frações" "A" e "B" eram dialisadas separadamente contra água destilada, liofilizadas e redissolvidas em 5 cm³ de solução fisiológica.

Amostras de 10 ml das frações purificadas, contendo 500 mg de polissacaríde, foram submetidas a hidrólise pela adição de HCl 4M até concentração final 2M. Os tubos foram incubados em água fervente

(*) As amostras comerciais são constituídas por misturas de amêndoas de plantas de muitas variedades.

durante 6 horas e, após resfriamento, o pH acertado para 7,0, com NaOH a 40%. Fenilosazonas foram preparadas pela adição de 0,5 cm³ de fenilidrazina e 0,5 cm³ de ácido acético glacial a 2 cm³ da solução em prova, seguida pela incubação em água fervente por 30 minutos. Os cristais eram testados quanto ao seu ponto de fusão e forma.

Antígenos para inoculação de animais foram preparados a partir das amostras F₁₄₄, PF₇₂ e NF, pela adição de 90 cm³ da solução de NaCl 0,15M a 1g de amêndoas lavadas, homogenizando-se a mistura em liquidificador. Após centrifugação a 3 000 r.p.m. durante 20 minutos, o sobrenadante foi completado a 100 cm³ (solução a 1%). Antígenos da polpa foram obtidos por centrifugação de polpa não fermentada, 30 minutos a 3 000 r.p.m. e separação do sobrenadante claro, isento de fibras. Partes iguais de cada antígeno e do adjuvante de FREUND⁹ foram emulsionadas para inoculação em animais. Cada coelho foi inoculado com 0,5 cm³ e cada cobaio com 0,25 cm³ da emulsão em cada pata, em intervalos de sete dias, durante seis semanas. Dez dias após a última injeção, os animais foram sangrados e o soro separado e conservado em refrigerador, após adição de mertiolato a 1:10 000.

Precipitados específicos foram determinados, em alíquotas de 0,5 cm³ de antígeno, pela adição de anti-soro anti-NF, seguida por incubação a 37°C, durante 2 horas e, posteriormente, a 2°C, durante 18 horas. Os precipitados foram separados por centrifugação e feita uma prova de anel, usando-se várias diluições do anti-soro. Se o antígeno era ainda detectável, a absorção era repetida. Os precipitados eram lavados três vezes com solução fisiológica gelada e

dissolvidos em NaOH 0,1N. O teor de nitrogênio do complexo antígeno-anticorpo foi determinado por micro-Kjeldahl, segundo ELEC & SOBOTKA.

A absorção dos anti-soros foi feita pela adição de extratos PF₇₂ seguida de incubação a 37°C, durante 2 horas e a 2°C, durante 18 horas. O precipitado era separado por centrifugação e o sobrenadante foi testado pela prova de anel, usando-se várias diluições de extrato como antígeno. Se anticorpos eram ainda detectáveis, a absorção era repetida.

As imunoprecipitações foram feitas de acordo com OUCHTERLONY¹⁰ e as imunoeletoforeses e gel-eletoforeses, de acordo com GRABAR & WILLIAMS¹¹, usando-se tampão de veronal pH 8,6 $\mu = 0,05$. As faixas foram coradas com reagente de Schiff, segundo URIEL & GRABAR¹².

RESULTADOS

Análise química das amêndoas

As determinações de nitrogênio total, gorduras, glicídios e polifenóis da variedade "Forasteiro" são apresentados no quadro abaixo. Dados obtidos a partir de amêndoas de outras variedades em estudo são essencialmente similares. Pode ser visto que o processo de fermentação não modifica apreciavelmente os teores de nitrogênio e lipídios até que atinja o estágio de fermentação excessiva quando há um significativo decréscimo do nitrogênio. Por outro lado, a fermentação determina uma queda progressiva do conteúdo de glicídios e polifenóis:

*Composição química de vários extratos de amêndoas de cacau **

Amostra	Nitrogênio	Gordura	Glicídios	Polifenóis	Outros
OF ₁₈₂	7,2	47,7	6,3	2,0	36,8
F ₁₄₄	12,0	49,0	10,8	2,4	25,8
PF ₇₂	12,0	50,7	15,3	7,2	14,8
NF	12,0	51,7	19,7	9,8	6,8

* Por 100 g.

Análise cromatográfica do extrato e polpa do fruto

A cromatografia em papel dos extratos de amêndoas NF e polpa do fruto não fermentado revelou duas manchas após tratamento com reagente de antrona, uma, com $R_f = 0,37$, foi denominada "Fração B" e a outra, com $R_f = 0,50$, "Fração A". Após coloração com difenilaminofosfato de anilina (Merck), a "Fração A" apresentou manchas azuis, indicando a existência de ligações 1-4, enquanto que a "Fração B" mostrou manchas marrom, indicando ligações 1-6. Após hidrólise, ambas as frações purificadas determinaram apenas uma mancha com $R_f = 0,41$, correspondente a d-glicose. Os eluatos das manchas cromatográficas correspondentes às duas frações apresentaram uma nítida prova de anel e, quando testados contra o anti-sêro em placas de Ouchterlony determinaram o aparecimento de linhas de precipitação correspondentes.

Separação do antígeno da polpa do fruto

Em virtude de a polpa conter maior proporção das frações "A" e "B" que as sementes, a separação destas frações antigênicas em forma purificada foi feita a partir da polpa "in natura". Preparações de polpa mostraram, em coluna de DEAE-celulose, conter duas frações antigênicas. A primeira fração foi eluída com solução tampão de fosfato, pH 7,4 e mostrou, em cromatografia em papel, um $R_f = 0,50$, igual ao da "Fração A". A segunda foi eluída com solução tampão de citrato, pH = 3,6 e determinou o aparecimento de mancha com $R_f = 0,37$, correspondente à "Fração B". Precipitação fracionada com etanol promoveu a separação dessas frações. Com etanol a 1,5%, foi precipitada a fração com $R_f = 0,50$ ("Fração A"), enquanto que, a 15%, foi precipitada a fração com $R_f = 0,37$ ("Fração B"). Este processo é, entretanto, inferior ao cromatográfico com referência à pureza das frações obtidas, pois que entre elas há ainda um certo grau de mistura.

Quando foram obtidas osazonas das frações "A" e "B", foram observadas duas diferentes formas cristalinas. A osazona da "Fração A" apresentou-se como pequenos cristais quadrangulares com ponto de fusão 183°C, enquanto que a osazona da "Fração

B" apresentou-se como cristais redondos com bordas indentadas com ponto de fusão 198, 5°C. Os hidrolizados das frações "A" e "B" apresentaram osazonas aculiformes correspondentes a glucosazona com ponto de fusão 204, 5°C. As frações "A" e "B" de extratos de amêndoas NF ou polpa de fruto não são dialisáveis contra solução fisiológica ou água destilada, enquanto que por diálise dos extratos PF $\frac{70}{72}$ verifica-se ser dialisada uma fração imunologicamente semelhante à "Fração B", mas com $R_f = 0,63$.

Teor de nitrogênio dos anticorpos nos precipitados específicos

O teor de nitrogênio dos anticorpos nos precipitados específicos de extratos de amêndoas não fermentadas decresceu em relação aproximadamente linear, quando aumentou o tempo de fermentação (Fig. 4). Precipitados de extratos fermentados durante 144 horas não mostraram presente nitrogênio dos anticorpos.

Análise imunológica dos extratos de amêndoas e da polpa do fruto

Coelhos inoculados com extrato NF produziram anti-sêros (anti-NF) que formaram em placas de Ouchterlony duas linhas de precipitação quando testados contra extratos NF, uma linha contra extrato PF e nenhuma contra extratos F ou OF. O extrato PF $\frac{70}{72}$ produziu uma linha de precipitação quando testado contra anti-sêro anti-NF. Esta linha corresponde a um dos componentes ("Fração B") do extrato NF ou da polpa do fruto (Fig. 3). A "Fração B" no extrato PF $\frac{70}{72}$ não difere imunologicamente da "Fração B" presente em extratos NF, a despeito dessas duas frações diferirem em R_f e no comportamento durante a diálise. A determinação do nitrogênio do anti-corpo anti-NF revelou 0,8 a 1,0 mg por cm^3 de anti-sêro quando a mistura de polissacarídeos purificados isolados da polpa do fruto foi utilizada como antígeno. A imunização de coelhos com preparação da polpa do fruto determinou a formação de um anti-sêro anti-M (anti-polpa do fruto) comportando-se similarmente com o anti-sêro anti-NF. O anti-sêro anti-M apresentou 0,8 mg de nitrogênio específico por cm^3 . Finalmente, extratos F e PF $\frac{70}{72}$ não provocaram a formação de anticorpos precipitantes.

A imunoeletroforese apresentou resultados (Fig. 2) em concord6ncia com os de imunodifus6o em placas de Ouchterlony (Fig. 3). Na presen7a de anti-s6ro anti-NF, o extrato NF mostrou duas linhas de precipita76o, o extrato PF, uma e o extrato F, nenhuma. Os dois arcos de precipita76o

observados na imunoeletroforese correspondem a duas faixas cor6aveis pelo reagente de Schiff encontradas em provas paralelas de eletroforese em agar. Uma das faixas localizava-se na origem e a outra orientada em dire76o ao anodo (Fig. 1).

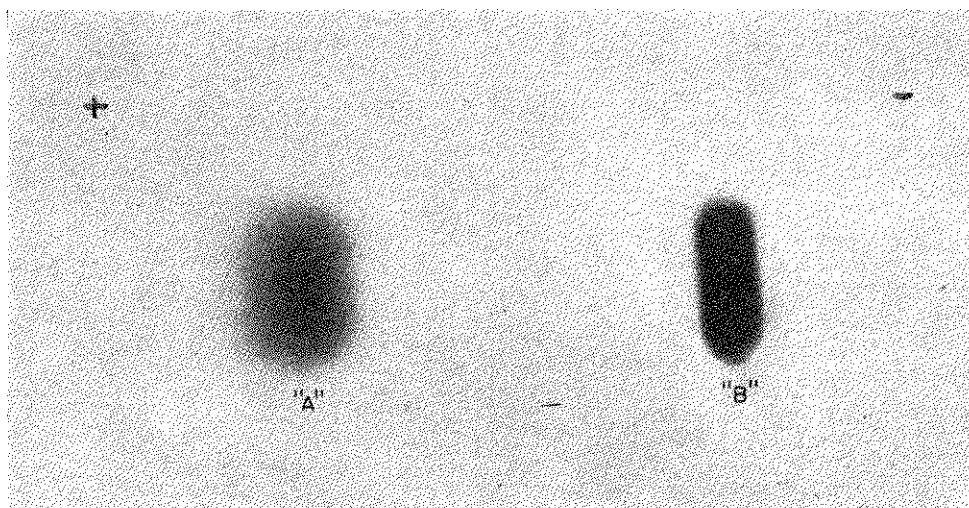


Fig. 1 — Eletroforese em gel de agar das fra76es imunol6gicamente ativas de cacau, reveladas pelo reagente de Schiff. A: "Fra76o A"; B: "Fra76o B". Tempo de migra76o eletrofor6tica, 120 min., 5V por cm.

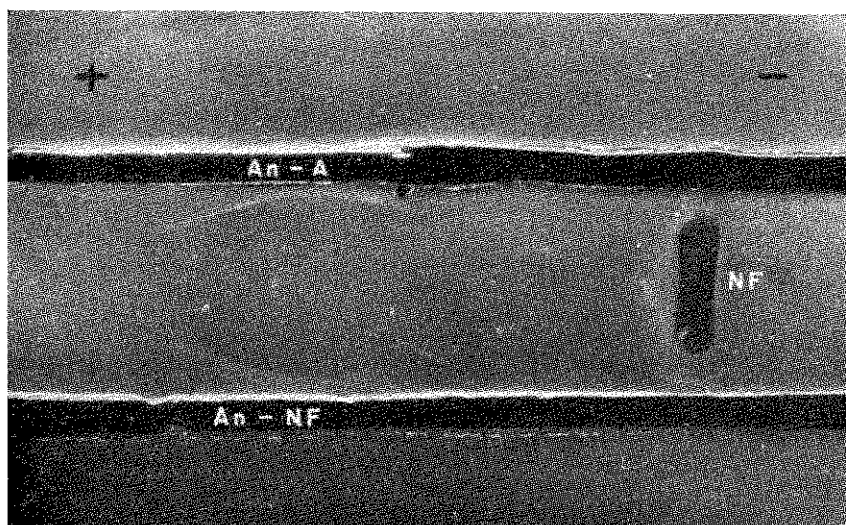


Fig. 2 — Imunoeletroforese de extratos de cacau n6o fermentado (NF). An-A: anti-s6ro anti-NF pr6viamente absorvido com extrato de cacau parcialmente fermentado (PF $\frac{70}{72}$). An-NF: anti-s6ro anti-extrato de cacau n6o fermentado. Migra76o eletrofor6tica, 120 min., 5V por cm.

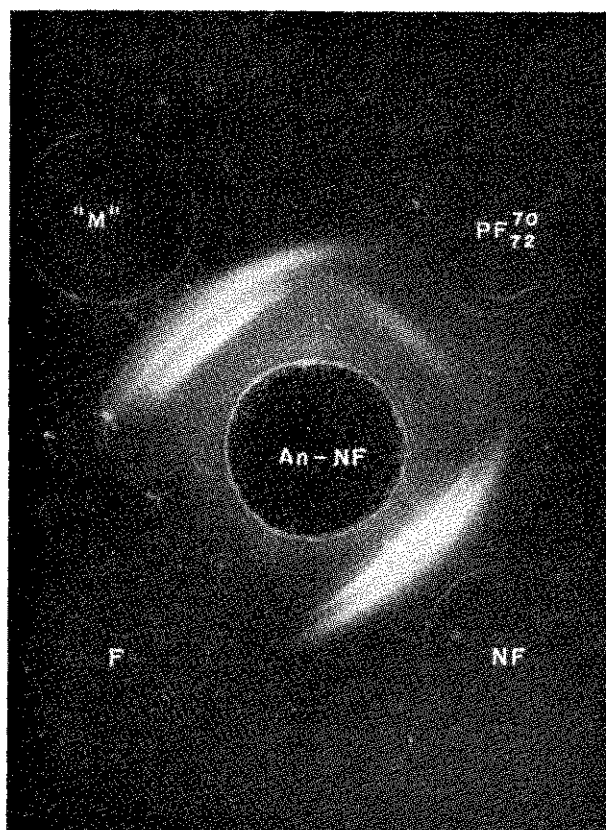


Fig. 3 — Imunodifusão em gel de agar de polpa de cacau e extratos de amêndoas fermentadas, parcialmente fermentadas e não fermentadas. *M*: polpa de cacau. *NF*: extrato de amndoas de cacau não fermentadas. *PF*⁷⁰₇₂: extrato de amêndoas de cacau parcialmente fermentadas. *F*⁷⁰₁₄₄: extrato de amêndoas de cacau fermentadas durante 144 horas. *An-NF*: anti-sôro anti-amêndoas de cacau não fermentadas.

Prova de anel para determinação do grau de fermentação de amêndoas e da polpa do fruto

Provas de anel (imunoprecipitação em tubo capilar) foram feitas por cuidadosa deposição de solução do antígeno sôbre anti-sôro anti-fração "A". O aparecimento de uma definida turvação na interfase foi considerado como resultado positivo. Uma prova de anel negativa indica ausência da "Fração A" e êste resultado foi interpretado como correspondendo a amêndoas de boa qualidade na classificação de De WITT¹,

em virtude dos resultados da análise imunológica das amêndoas e polpa do fruto. Anti-sôro anti-NF pode ser absorvido com extratos de amêndoas parcialmente fermentadas (PF), que prêviamente tenham exibido sômente uma linha em placas de Ouchterlony. Anti-sôro anti-NF absorvido com "Fração B" purificada determinou essencialmente os mesmos resultados, mas o processo é mais complicado. Anti-sôro anti-fração "A" pode ser obtido pela inoculação de "Fração A" purificada, tornando, assim, desnecessária a sua absorção.

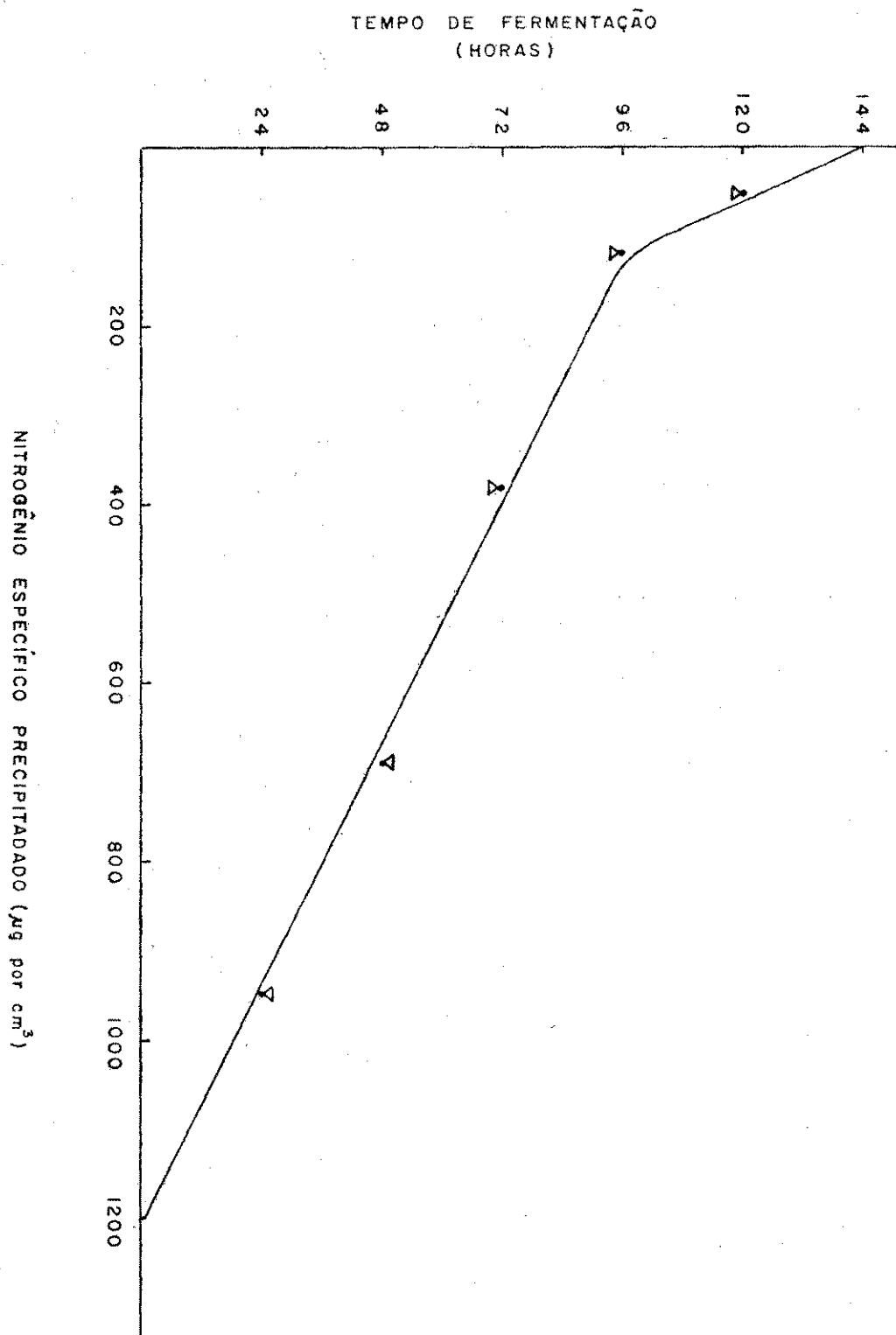


FIGURA 4

DISCUSSÃO

O teor de compostos glicídicos e polifenólicos decresce à medida que aumenta o grau de fermentação. O paralelismo entre o decréscimo gradual do teor de glicídios e a diminuição progressiva da atividade imunológica é explicável pela natureza polissacáridica dos antígenos. A natureza glicídica foi evidenciada por coloração específica com reagente de Schiff do material submetido a eletroforese em gel, por cromatografia e por hidrólise ácida.

A ausência de reações cruzadas entre os dois antígenos encontrados em extratos de amêndoas não fermentadas ou na polpa de fruta não fermentada pode ser atribuída ao fato de que um desses antígenos, denominado "Fração A", contém ligações 1-4, enquanto que o outro, "Fração B", contém ligações 1-6, a despeito de ambos serem polímeros de d-glicose, como demonstrado pela formação de osazonas e pela análise cromatográfica.

Por diálise, foi evidenciado que o único antígeno ("Fração B"), encontrado no extrato de amêndoas parcialmente fermentadas é constituído por moléculas menores que as da "Fração B" encontrado em extratos não fermentados.

Tal fato poderia explicar a incapacidade da "Fração B", presente nos extratos parcialmente fermentados, em provocar a formação de anticorpos precipitantes no coelho. Uma vez que a fermentação das amêndoas e da polpa do fruto resulta de ação enzimática, pode-se presumir que inicialmente há a despolimerização de uma macromolécula e o produto resultante na fase inicial deste processo não pode estimular a produção de anticorpos, embora, como um hapteno, possa dar reação de precipitação. Posteriormente, quando a fermentação foi completada, não se observa imunoprecipitação. Parece claro que a fermentação das amêndoas destrói as moléculas antigênicas e também modifica vários componentes das amêndoas e da polpa dos frutos. Esses componentes são necessários para o crescimento dos microrganismos responsáveis pela produção de enzimas que, agindo, produziram o sabor de chocolate, e a produção de ácido acético que permite a permeabilização do tegumento (LEVANON & ROSSETINI¹³).

É sabido que a fermentação excessiva das amêndoas produz NH_3 . Isto provavelmente acontece porque os principais fatores do crescimento microbiano são carboidratos (fermentação) e, quando exauridas estas substâncias, enzimas de adaptação passam a metabolizar nitro-compostos (putrefação). Esta hipótese é reforçada, no presente trabalho, pelo decréscimo do teor de nitrogênio nos extratos de amêndoas excessivamente fermentadas. O conteúdo antigênico das amêndoas decresce à medida que progride a fermentação. Primeiramente, a "Fração A" foi inativada do ponto de vista de imunoprecipitação e, posteriormente, também a "Fração B". Já foi descrito que extratos bem fermentados de amostras comerciais de amêndoas não contêm "Fração A", diferindo assim das insuficientemente fermentadas (Levanon & Martelli).

Parece que o desaparecimento do antígeno aqui denominado "Fração A" indica o término do estágio de biofermentação descrito por Levanon & Rossetini. Neste momento, as amêndoas estão no ponto de serem retiradas das caixas ou dos montes de fermentação e inicia-se a "cura". Parece, assim, que a presença ou a ausência da "Fração A" pode ser usada para determinar o grau de fermentação das amêndoas. Levanon & Martelli testaram partidas comerciais de amêndoas de boa qualidade e evidenciaram unicamente uma linha de precipitação em placas de Ouchterlony. O antígeno correspondente ("Fração B", de Levanon & Martelli) não estimulou a produção de anticorpos e era dialisável. Mesmo concentradas vinte vezes, as partidas de extratos bem fermentados testados no presente trabalho deixaram de apresentar o antígeno correspondente à "Fração A". É importante mencionar que boas amostras comerciais usadas por Levanon & Martelli eram constituídas por 70-90% de amêndoas bem fermentadas e que as amostras usadas no presente trabalho foram fermentadas no laboratório, obtendo-se, assim, produto de grau uniforme e conhecido de fermentação.

A imunoprecipitação em gel, proposta por Levanon & Martelli, requer tempo relativamente longo, cerca de 24 horas, enquanto que a prova de anel empregada no presente estudo requer somente alguns minutos. O citado teste pode ser útil em duas das fases da preparação comercial de amêndoas para uso industrial:

1. quando as amêndoas estão ainda nas caixas ou nos montes de fermentação, a prova em causa determina o término da fase de biofermentação;
2. as amêndoas “curadas” poderão ser testadas para determinar-se se a fermentação prévia foi suficiente, uma vez que a quimiofermentação não destrói os antígenos (Levanon & Martelli).

RESUMO

Amêndoas e polpa do fruto de cacau foram submetidas a fermentação em laboratório, reproduzindo-se as condições requeridas no processamento rural.

Comparando-se extratos de amêndoas fermentadas, de amêndoas parcialmente fermentadas e de amêndoas bem fermentadas, foi verificado paralelismo entre o gradual decréscimo do teor de glicídios e a progressiva diminuição da atividade imunológica.

A natureza glicídica dos antígenos foi evidenciada por coloração com reagentes de Schiff no material submetido a gel-eletroforese, por cromatografia e por hidrólise ácida. Um dos antígenos, “Fração A”, presente em extratos de amêndoas não fermentadas apresenta ligações 1-4, enquanto que o outro, “Fração B”, ligações 1-6.

Por diálise, verificou-se que o único antígeno (“Fração B”) encontrado em extratos de amêndoas incompletamente fermentadas é constituído por moléculas menores que a “Fração B” encontrada em extratos de amêndoas fermentadas.

Amêndoas adequadas para a indústria de chocolate não mostram componentes imunogênicos.

É proposta uma prova em anel simples e rápida, para determinação do grau de fermentação (qualidade do produto rural) de amêndoas de cacau.

Agradecimentos — Os autores agradecem o material fornecido pelo Dr. Nelson Maravilhas e Dr. Paulo T. Alvim, da CEPLAC, Itabuna, Bahia, e a ajuda na preparação deste manuscrito dada pelo Dr. Juan J. Angulo, do Instituto Adolfo Lutz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LEVANON, Y. & MARTELLI, H. L. — Antigenic properties of non-fermented cocoa beans. *Biochim. Biol. Sper.* (Padova) 3, 3, 1964.
2. LEVANON, Y. — A serologic method for testing degree of fermentation in cocoa. *Biochim. Biol. Sper.* (Padova). No prelo.
3. De WITT, K. W. — The visual assessment of cured cocoa. *Trop. Agric. Trin.* 30: 228, 1953.
4. TREVELYAN, W. E. & HARRISON, J. S. — Studies on yeast metabolism. *Biochem. J.* 50, 298, 1952.
5. FORSYTH, W. G. C. — Cacao polyphenolic substances. *Biochem. J.* 51:516, 1952.
6. ELEC, A. & SOBOTKA, H. J. — The Kjeldahl-Pregl method applied to nitro compounds. *J. Amer. Chem. Soc.* 48: 501, 1926.
7. SUNDERWIRTH, S. G.; OLSON, G. G. & JOHNSON, G. — Paper chromatography-anthrone determination of sugars. *J. Chromat.* 16:176, 1964.
8. GIRI, K. V. & NIGAM, V. N. — Separation of simple saccharides and oligosaccharides by circular paper chromatography. *Naturwissenschaften* 40:343, 1953.
9. FREUND, J. — Some aspects of active immunization. *Ann. Rev. Microbiol.* 1:291, 1947.
10. OUCHTERLONY, O. — Antigen-antibody reaction in gels. *Ark. Kemi. Miner. Geol.* 26B, 14, 1949.
11. GRABAR, P. & WILLIAMS Jr., C. A. — Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochim. Biophys. Acta* 17:67, 1955.
12. URIEL, J. & GRABAR, P. — Emploi de colorants dans l'analyse électrophorétique et immunoelectrophorétique en milieu gélatiné. *Ann. Inst. Pasteur*, 90: 427, 1956.
13. LEVANON, Y. & ROSSETINI, S. M. O. — A laboratory study of the farm processing of cocoa beans for industrial use. No prelo.

Recebido para publicação em 3 de agosto de 1966.

