AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DA RICINA POR ÓXIDO DE CÁLCIO

LARA CARVALHO MENEGUELLI DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

JUNHO de 2017

AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DA RICINA POR ÓXIDO DE CÁLCIO

LARA CARVALHO MENEGUELLI DE SOUZA

Tese de doutorado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Profª Drª Olga Lima Tavares Machado

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

JUNHO de 2017

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, sob a orientação da Professora Drª Olga Lima Tavares Machado.

Financiamentos:
- FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro).
- CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)
- CNPq (Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e tecnológico)
- FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais, João Batista e Maria Aparecida, à minha irmã Annaliza, ao meu marido Maicon e a todos que estiveram ao meu lado durante toda minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que se faz sempre presente em minha vida.

À UENF, pela oportunidade de realizar este trabalho e pela concessão da bolsa de estudo. Incluo, aqui, todos os professores, técnicos e colegas que me auxiliaram com tanta boa vontade durante essa caminhada acadêmica.

À minha orientadora, Drª Olga Lima Tavares Machado, pela paciência, perseverança e atenção que sempre teve comigo. Recebeu-me de braços abertos quando mais precisei.

A toda equipe do laboratório mais charmoso do LQFPP: Jucélia, Thaís, Francianne, Paula, Débora, Mari, Tati, Carol e Lizandra. Vocês foram essenciais durante esses 3 anos de doutorado e hoje são muito mais que colegas de laboratório. Amigas queridas!

A todos que contribuíram experimentalmente em etapas fundamentais para a conclusão desta tese de doutorado: Dr. Edésio José Tenório de Melo, Dr. Vanildo Silveira, e aos alunos Lais Pessanha de Carvalho e Ricardo Reis.

À minha amada família, João Batista, Maria Aparecida e Annaliza, por todo apoio, incentivo e amor. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui!

Ao meu marido Maicon, por não medir esforços para me ajudar. Obrigada pelo amor, carinho, paciência, companheirismo, pela presença constante e, principalmente, por acreditar em mim. Meu grande incentivador!

Às minhas queridas amigas, pelo apoio e pela compreensão da minha ausência, em especial Fernanda, Bia, Larissa e Paty.

Aos meus queridos e eternos orientadores, Maria Luisa López e Claudio Retamal (*in memorian*). Obrigada pelos ensinamentos passados, pelo carinho e amizade que criamos. Aprendi muito com vocês!

Enfim, a todos que contribuíram, de alguma forma, para a conclusão deste trabalho.

“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda.”

(Oliver Goldsmith)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS viii

LISTA DE TABELAS ix

LISTA DE ABREVIAÇÕES x

RESUMO xi

ABSTRACT xii

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 A mamoneira – descrição botânica, classificação, origem e aspectos econômicos 2

1.2 O fruto e a semente da mamoneira 6

1.3 Torta de mamona 9

1.4 Componentes tóxicos da mamona 11

1.4.1 Aglutinina 11

1.4.2 Ricinina 12

1.4.3 Ricina 13

1.5 Métodos de inativação da ricina 24

2. OBJETIVOS 27

2.1 Objetivo Geral 27

2.2 Objetivos específicos 27

3. MATERIAL E MÉTODOS 28

3.1 Obtenção das sementes de mamona 28

3.2 Obtenção da torta de mamona 28

3.3 Armazenamento da torta de mamona 28

3.4 Extração de proteínas da torta 28

3.4.1 Extração da ricina 28

3.4.2 Extração de proteases 29

3.5 Dosagem de proteínas 29

3.6 Análise dos efeitos do armazenamento da torta de mamona sobre a ricina 29

3.6.1 SDS-PAGE 29

3.6.2 Detecção de atividade proteásica - Zimografia 30

3.6.3 Avaliação da atividade citotóxica das tortas de mamona armazenadas 30

3.7 Extração e purificação da ricina 32

3.8 Cromatografia de filtração em gel 32
3.9 Caracterização da proteína isolada..... 33
3.9.1 SDS-PAGE 33
3.9.2 Sequenciamento..... 33
3.9.3 Avaliação por Espectrometria de Massas..... 33
3.9.4 Ensaio de citotoxicidade da ricina..... 35
3.10 Avaliação dos efeitos da exposição à ricina por microscopia eletrônica de transmissão..... 36
3.11 Tratamento da ricina com CaO 36
3.12 Análise dos efeitos do tratamento com CaO - Determinação do mecanismo de inativação da ricina 37
3.12.1 SDS-PAGE 37
3.12.2 Cromatografia de filtração em gel..... 37
3.12.3 Espectrometria de massas 38
4. RESULTADOS 38
4.1 Isolamento e caracterização da ricina..... 38
4.2 Análise dos efeitos da citotoxicidade da ricina por microscopia eletrônica de transmissão 42
4.3 Avaliação do armazenamento da torta como possível método de destoxificação 45
4.3.1 Análise do comportamento da ricina por SDS-PAGE 12%..... 45
4.3.2 Detecção de atividade proteolítica na torta de mamona..... 46
4.3.3 Ensaio de citotoxicidade em cultura de células Vero..... 47
4.4 Avaliação do uso de CaO como método de destoxificação 49
4.4.1 Análise do efeito do CaO sobre a ricina purificada por SDS-PAGE.....49
4.4.2 Ensaio de citotoxicidade após tratamento da ricina com CaO..... 50
4.4.3 Análise do efeito do CaO sobre a ricina por cromatografia de filtração em gel 51
4.4.4 Análise das sequências dos peptídeos gerados pelo tratamento da ricina com CaO por espectrometria de massas 53
5. DISCUSSÃO 56
6. CONCLUSÕES..... 63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ricinus communis 4

Figura 2 - Frutos da mamoneira em diferentes cores..... 6

Figura 3 - Alguns exemplares de sementes de mamona de diferentes cultivares. 7

Figura 4 - Fórmula estrutural do ácido ricinoleico. 8

Figura 5 - Modelo cristalográfico da aglutinina. 12

Figura 6 - Estrutura da ricinine. 13

Figura 7 - Estrutura das RIPs tipo 1 e 2. 16

Figura 8 - Estrutura tridimensional da ricina. 18

Figura 9 - Loop de rRNA e o sítio de depurinação pela ação da ricina (RTA) 20

Figura 10 - Mecanismo de ação da ricina. 20

Figura 11 - Representação esquemática da entrada da ricina (RIP tipo II) em uma célula. 21

Figura 12 - Isolamento e caracterização da ricina. 40

Figura 13 - Ultraestrutura das células LLC-MK2. 43

Figura 14 - Efeitos da ricina em células LLC-MK2. 44

Figura 15 - Análise da ricina por SDS-PAGE nas amostras de torta de mamona. 45

Figura 16 - Zimografia em gel contendo gelatina. 46

Figura 17 - Microscopia óptica de cultura de células Vero. 47

Figura 18 - Teste de citotoxicidade. 48

Figura 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da ricina tratada com CaO. 50

Figura 20 - Citotoxicidade da ricina e tratamento com CaO. 51

Figura 21 - Cromatografia de filtração em gel. 52

Figura 22 - Análise estrutural da ricina por espectrometria de massas. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química média das sementes de mamona. 7

Tabela 2 - Composição química da torta de mamona. 10

Tabela 3 - Sequências de peptídeos obtidas e identificadas através do espectrômetro de massas, e suas respectivas massas moleculares. 41

Tabela 4 - Principais peptídeos obtidos e identificados após o tratamento da ricina com CaO, e suas respectivas massas moleculares... 55

LISTA DE ABREVIAÇÕES

Arg - Arginina

BSA - Albumina sérica bovina (bovin serum albumin)

$Ca(OH)_2$ - Hidróxido de cálcio

CaO - Óxido de cálcio

CDC - Centros de Controle e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention)

DMEM - Meio Dulbecco modificado por Eagle (Dulbecco's modified eagle's medium)

DTT - Ditiotreitol (Dithiothreitol)

EDTA - ácido etilenodiamina tetracíclico (ethylenediamine tetracyclic acid)

EGTA - ácido etileno tetracético glicol (ethylene glycol tetraaetic acid)

ESI-LC-MS/MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas eletronspray (liquid chromatography electronspray ionization mass spectrometry

FES - Fermentação em estado sólido

Glu - Ácido glutâmico

HCL - Ácido clorídrico

NaCl - Cloreto de sódio

PBS - Tampão fosfato salino (phosphate buffer saline)

RIP - Proteína inativadora de ribossomos (ribosome-inactivating protein)

rRNA - Ácido ribonucleico ribossomal (Ribosomal ribonucleic acid)

RTA e RTB - cadeia A e cadeia B de ricina, respectivamente

SDS - dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfide)

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

SRL - loop α-sarcina/ricina (α-sarci/ricin loop)

TFA - Ácido trifluoroacétio (trifluoroacetic acid)

TGO e TGP - transaminase glutâmico-oxalacética e transaminase glutâmico-pirúvica, respectivamente

RESUMO

A mamoneira (*Ricinus communis*) é uma planta de grande importância econômica devido ao seu principal produto, o óleo de mamona. Esse óleo é extraído das sementes de mamona e apresenta características únicas, tais como alta viscosidade, densidade e estabilidade, conferindo-lhe grande aplicabilidade industrial. A extração de óleo leva à geração de um coproduto, a torta de mamona. Além de ser utilizada como adubo orgânico, ela é rica em proteínas e fibras, o que a torna interessante para uso em rações animais. Entretanto, esse coproduto não pode ser usado com essa finalidade devido à presença da ricina, uma proteína altamente tóxica. A ricina é classificada como uma proteína inativadora de ribossomos do tipo 2, e é uma das fitotoxinas mais potentes já descritas. Vários métodos já foram descritos para a inativação da ricina e, consequentemente, para a destoxificação da torta de mamona. Algumas técnicas se mostraram promissoras como, por exemplo, o tratamento da toxina com óxido de cálcio (CaO), mas o mecanismo pelo qual esse composto químico consegue inativar a atividade citotóxica da ricina ainda não foi elucidado. Além disso, o armazenamento da torta de mamona também parece ser um método eficaz na destoxificação desse coproduto, mas carece de ensaios de toxicidade para sua validação. Assim, o presente trabalho tem por objetivos avaliar os efeitos da ricina sobre as células LLC-MK2, elucidar como o CaO age na proteína, inativando-a, e avaliar a eficiência do armazenamento para destoxificar a torta, através de ensaios biológicos. Para alcançar o primeiro objetivo, as células LLC-MK2 foram incubadas com a ricina purificada (1 µg/mL) e, após 48 horas, observou-se alterações significativas nas mitocôndrias, um indicativo de estresse oxidativo. Posteriormente, a ricina purificada foi tratada com uma solução de 0,1 M de CaO (0,6 mg/mL), sendo incubada por 8 horas, a 25 ºC. A amostra tratada foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida, cromatografia de filtração em gel e por espectrometria de massas. Em conjunto, os resultados obtidos permitiram concluir que as ligações peptídicas da ricina foram clivadas, principalmente, em resíduos de asparagina, mostrando que há um sítio de clivagem preferencial. A solução de CaO possui um pH elevado (~ 13), o que levou, possivelmente, a degradação da ricina. Assim, o pH alcalino da solução de CaO afetou a estrutura tridimensional da proteína, clivando-a em vários peptídeos, afetando também sua função citotóxica. Para avaliar a eficiência do armazenamento na destoxificação da torta de mamona, amostras iguais de torta foram estocadas em estufa a 37ºC, sendo coletadas seis amostras ao longo do tempo de estocagem (três meses). As análises eletroforéticas mostraram o desaparecimento total das bandas de ricina em todas as amostras armazenadas. A zimografia em gel contendo gelatina revelou atividade proteásica em todas as amostras testadas. Contudo, ao realizar o teste de citotoxicidade, foi observado que a ricina permaneceu ativa, em todas as amostras, matando as células. Esse resultado sugere que armazenamento, nas condições avaliadas, não é um método eficaz para inativar a ricina presente na torta de mamona, e destaca a importância da realização de ensaios biológicos para a validação de processos de destoxificação.

Palavras chave: *Ricinus communis,* ricina, torta de mamona, óxido de cálcio, destoxificação.

ABSTRACT

Castor bean (*Ricinus communis*) is a plant of great economic importance due to its main product, castor oil. This oil is extracted from the castor seeds, and has unique features such as high viscosity, density and stability, giving it great industrial applicability. The oil extraction leads to the generation of by-product, castor bean cake. In addition to be used as organic fertilizer, it is rich in protein and fiber, making it interesting for use in animal feed. However, this by-product cannot be used for this purpose due to the presence of ricin, a highly toxic protein. Ricin is classified as a type 2 ribosome-inactivating protein, and is one of the most potent phytotoxins has already been described. Several processes have already been described to inactivate of ricin and, consequently, to detoxify castor bean cake. Some of these methods showed to be promising, such as the treatment of toxin with calcium oxide (CaO), but the mechanism by which this chemical compound can inactivate the cytotoxic activity of ricin has not yet been elucidated. Moreover, the storage of castor bean cake also appears to be an effective method to detoxification of this by-product, but lacks toxicity assays for validation. Thus, the objectives of the present work were to evaluate the effects of ricin on LLC-MK2 cells, to elucidate how the CaO acts in the protein, inactivating it, and to evaluate the efficiency of storage to detoxify the castor bean cake through biological assays. To achieve the first objective, LLC-MK2 cells were incubated with purified ricin (1 µg/mL) and, after 48 hours, significant changes in mitochondria were observed, an indicative of oxidative stress. Subsequently, purified ricin was treated with a 0.1 M CaO solution (0.6 mg/mL) and incubated for 8 hours at 25 °C. Subsequently the treated sample was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis, gel filtration chromatography and mass spectrometry. The results clearly indicate that peptide bonds of ricin were cleaved, mainly, in asparagine residues, showing that there is a preferential cleavage site. The CaO solution had a high pH (~ 13), possibly leading to degradation of ricin. Thus, the alkaline pH of the CaO solution affected the three-dimensional structure of the protein, cleaving it in several peptides, also affecting its cytotoxic function. In order to evaluate the efficiency of storage in castor bean detoxification, equal samples of castor bean cake were stored (in oven) at 37 °C, and six samples were collected over the storage time (three months). The electrophoretic analyzes showed the total disappearance of the bands of ricin in all stored samples. The zymography on gel containing gelatin showed protease activity in all samples tested. However, when the cytotoxicity test was performed, it was observed that ricin remained active in all samples, killing the cells. This result suggests that storage, under the conditions evaluated, is not an effective method to inactivate ricin present in castor bean cake, and highlights the importance to carry out biological assays for the validation of detoxification processes.

Key words: *Ricinus communis,* ricin, castor bean cake, calcium oxide, detoxification.

1. INTRODUÇÃO

A mamona *(Ricinus communis)* é uma oleaginosa originária da África e que chegou ao Brasil no período colonial. Esta planta é de grande importância socioeconômica, apresentando como seu principal produto comercial o óleo de mamona (também conhecido como óleo de rícino), que apresenta características únicas, como alta viscosidade, densidade e estabilidade. Por sua versatilidade, este óleo apresenta uma ampla aplicabilidade, sendo utilizado na indústria cosmética e farmacêutica, na produção de lubrificantes e fluidos aeronáuticos, além de ser utilizado como matéria prima para a produção de biodiesel. Para certas finalidades, o óleo de mamona é quase insubstituível, como para a lubrificação de engrenagens sujeitas ao esfriamento e à ação da água, devido à sua capacidade de aderir bem às superfícies molhadas, ao contrário dos demais óleos (CHIERICE E CLARO NETO, 2001; PAES et al., 2015). No Brasil, a região nordeste tem destaque na produção de mamona, mais especificamente o estado da Bahia, principal estado produtor dessa oleaginosa. Ao longo da última década, este estado concentrou aproximadamente 80% da produção nacional (LIMA, 2007; FERREIRA et al., 2015). Além da importância econômica - comercialização do biodiesel e dos demais produtos oriundos do óleo - a cultura de mamona pode ter um papel relevante à agricultura familiar do semiárido nordestino por ter a possibilidade de promover o crescimento da economia nesta região, sendo geradora de emprego e, consequentemente, trazendo benefícios sociais (AZEVEDO et al.,1998). Segundo CUNHA et al. (2017), é fundamental o comprometimento governamental (Federal, Estadual e Municipal) com os produtores nordestinos por meio de políticas agrícolas e industriais adequadas, ou seja, políticas que favoreçam o produtor, que gerem uma remuneração satisfatória para que, consequentemente, venham a plantar mais. Ainda segundo estes mesmos autores, o fator principal de incentivo ao agricultor é estabelecer unidades esmagadoras diretamente ligadas aos produtores, onde estes possam se beneficiar não apenas das vendas de bagas de mamona, as quais hoje oferecem alto risco, mas também da comercialização do óleo bruto.

Da extração do óleo das sementes de mamona resulta um coproduto, a torta de mamona. Este coproduto apresenta elevado teor de nitrogênio, além de outros nutrientes, sendo por isso muito cotado como fertilizante orgânico (SEVERINO et al., 2004). A torta de mamona também apresenta uma quantidade expressiva de proteínas, o que a torna interessante para ser utilizada na composição de rações para animais. Entretanto, a presença de componentes tóxicos dificulta este uso (OLIVEIRA et al., 2010a). A ricina é a proteína responsável pela elevada toxicidade da torta de mamona. Ela é uma potente citotoxina capaz de inibir a síntese proteica, levando à morte celular (SCHEP et al., 2009). Assim, para que a torta possa ser utilizada como fonte proteica na alimentação animal, ela precisa ser previamente destoxificada. Muitos trabalhos já foram realizados com o objetivo de eliminar os componentes tóxicos da torta de mamona e, dentre estes, alguns se mostraram promissores. O tratamento da torta de mamona com compostos de cálcio, tal como o CaO, se mostrou eficiente na eliminação das propriedades tóxicas da ricina (FERNANDES et al., 2012). A vantagem do uso de CaO está no fato deste tratamento ser operacionalmente simples, prático e com grande viabilidade econômica (COBIANCHI et al., 2012; SILVA et al., 2015). O que ainda não está claro, contudo, é o mecanismo pelo qual o CaO inativa a citotoxicidade da ricina. Além disso, segundo CRESPO NETO (2009), o armazenamento da torta de mamona, em condições naturais, também representa um método promissor para a inativação da ricina e, consequentemente, para a destoxificação da torta. Contudo, este método carece de ensaios de citotoxicidade, uma forma confiável de determinação da inativação da atividade citotóxica da ricina. Assim, os objetivos centrais deste trabalho foram elucidar o mecanismo pelo qual o CaO leva à inativação da ricina, e avaliar a eficiência do armazenamento para a destoxificação da torta de mamona.

1.1 A mamoneira – descrição botânica, classificação, origem e aspectos econômicos

Ricinus communis (figura 1) é uma planta oleaginosa, perene, de hábito arbustivo e pertencente à família *Euphorbiaceae*, a qual engloba um grande número de tipos de plantas nativas da região tropical. Ela é

conhecida popularmente como mamoneira, mamona, palma-de-cristo, bafureira, ricínio, carrapateira, entre outras denominações, sendo uma planta heliófila, com razoável nível de xerofitismo, precisando de chuvas regulares durante a fase vegetativa e de períodos secos na maturação dos frutos (AZEVEDO et al., 1997; GÓES, 2006; JUNIOR et al., 2008). Em relação à arquitetura (hábito de crescimento, porte, coloração da folhagem e do caule), a mamoneira apresenta grandes variações (espécie polimórfica), tornando as cultivares bastante diferentes e caracterizadas (GONÇALVES et al., 2005; DA SILVA, 2009). Sua altura pode variar de 1 a 8 metros; possui raízes pivotantes que podem atingir até 3 metros de profundidade, e raízes laterais que podem atingir até 1 metro de profundidade. Em condições de pouca disponibilidade de água, a raiz principal apresenta uma maior penetração se comparado a um solo úmido. Suas folhas são grandes (podendo variar quanto à largura do limbo), pecioladas, com a cor podendo variar do verde claro ao vermelho escuro. Além disso, as folhas também podem variar de acordo com a cerosidade, comprimento do pecíolo e profundidade dos lóbulos. O caule é geniculado, espesso e ramificado, podendo apresentar variações quanto à cor (verde, vermelho ou arroxeado) e a presença de cera (TÁVORA, 1982; MOREIRA et al., 1996). Em relação ao aspecto reprodutivo, a mamoneira é uma planta monoica, possuindo como inflorescência-padrão o tipo panicular, com presença de flores femininas na parte superior e flores masculinas na parte inferior. A distribuição das flores pode ocorrer de forma irregular ao longo do racemo (entre 30% e 50% de flores femininas e 50% e 70% de flores masculinas), devido a fatores genéticos e ambientais. O racemo principal ou primário é o mais desenvolvido e apresenta maior quantidade de frutos. Os racemos variam quanto à forma, podendo ser cônica, cilíndrica ou oval, variando no comprimento (10 a 80 cm) e na quantidade de frutos, dependendo da cultivar (CLAASSEN E HOFFMAN, 1949; TÁVORA, 1982; MOSHKIN, 1986).

Figura 1 - *Ricinus communis*. Em destaque, um racemo. Fonte: SCHOLZ E DA SILVA, 2008.

A mamoneira possui a seguinte classificação taxonômica (MOSHKIN, 1986):

Subdivisão:	Fanerogamae ou Espermatophita
Filo:	Angiospermae
Classe:	Dicotiledonae
Subclasse:	Archichlamydeae
Ordem:	Geraniales
Família:	Euphorbiaceae
Gênero:	Ricinus
Espécie:	*Ricinus communis*

A mamoneira não tem sua origem bem definida, o que pode ser explicado, em parte, pela facilidade e rapidez com que se torna estabelecida com uma planta nativa. Inicialmente, esta planta tinha quatro centros de origem: (i) África Oriental (Etiópia), (ii) Noroeste e Sudoeste da Ásia e Península Arábica, (iii) Índia e (iv) China. Contudo, a Etiópia é considerada o local de origem mais provável devido à presença de alta diversidade (ANJANI, 2012). A mamoneira foi introduzida no Brasil durante a colonização

portuguesa, provavelmente com a vinda dos escravos africanos. O óleo extraído de suas sementes era utilizado para lubrificar as engrenagens dos engenhos de cana da época (MOREIRA et al., 1996; MELO et al., 2003; BELTRÃO E LIMA, 2007).

Embora seja uma planta nativa de clima tropical, a mamoneira apresenta boa capacidade de adaptação em uma ampla variedade de climas subtropicais e temperados, onde é cultivada o ano inteiro (BARNES et al., 2009). No Brasil, a mamoneira é encontrada em praticamente todo o seu território, desde o Rio Grande do Sul até a Amazônia. Por se tratar de uma planta tolerante a seca e exigente em calor e luminosidade, encontra-se disseminada por quase todo o Nordeste, cujas condições climáticas são adequadas ao seu desenvolvimento (MELO et al., 2003; ALVES et al., 2004).

No Brasil, a Bahia é o maior produtor de mamona (33 mil toneladas na safra 2015/16), representando 89% da produção nacional e, aproximadamente, 95% da produção do Nordeste; o Ceará está em segundo lugar no ranking nacional, com produção estimada de 1000 toneladas. Com exceção de Sergipe e Maranhão, todos os estados do nordeste têm tradição na exploração de mamona (ALVES et al., 2004; CONAB, 2016). A maioria das lavouras de mamona no nordeste é conduzida por agricultores familiares, que costumam consorciar a lavoura com culturas alimentares (principalmente o feijão), aumentando a segurança alimentar do produtor e diversificando sua renda (MIRAGAYA, 2005). Segundo CHIERICE E CLARO NETO (2001), é na região do semiárido que o cultivo de mamona apresenta maior vantagem competitiva, devido ao baixo custo de produção e, também, por ser umas das poucas alternativas viáveis de produção agrícola dessa região, dada a resistência à seca e à facilidade de manejo dessa espécie.

No âmbito mundial, o Brasil já foi o maior produtor de mamona, tendo produzido 573 mil toneladas em 1974. Em 2004, contudo, a produção nacional foi cerca de quatro vezes menor que a de 1974 (LIMA, 2007). Atualmente, a Índia é, disparado, o maior produtor mundial de mamona, com quase 2 milhões de toneladas, colocando-se muito a cima da produção chinesa de 110 mil toneladas, que ocupa o segundo lugar. Moçambique e Brasil ocupam o terceiro e quarto lugar, com 61 mil toneladas e 34,2 mil

toneladas, respectivamente. Em relação ao óleo, os três maiores produtores mundiais, na atualidade, são a Índia, a China e o Brasil, que participaram, em 2013, com mais de 92% da produção mundial (CONAB, 2016; FAO, 2016).

1.2 O fruto e a semente da mamoneira

O fruto da mamona é do tipo cápsula, globosa ou baga, podendo apresentar espinho ou não. Em relação à cor, o fruto apresenta, normalmente, cor verde ou vermelha (figura 2), também podendo apresentar cores intermediárias. Quando o fruto amadurece, ele pode se abrir ou não (fruto deiscente e indeiscente, respectivamente), e as sementes podem ou não serem liberadas (BELTRÃO et al., 2003; GONÇALVES et al., 2005; DA SILVA, 2009).

Figura 2 - Frutos da mamoneira em diferentes cores. Fonte: Disponível em http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/mamona/arvore/CONT000h4rb0y9002wx7ha0awymty4m52beo.html.

A mamoneira produz sementes muito variáveis, apresentando diferentes cores, formas, tamanhos, pesos, proporções de tegumento, presença ou ausência de carúncula e maior ou menor aderência do tegumento ao endosperma (figura 3) (MAZZANI, 1983). De acordo com TÁVORA (1982), o peso de 100 sementes pode variar de 10 a 100 g, com média de 30 g nas cultivares anãs e de 45 a 75 g nas cultivares de porte

médio. O comprimento das sementes de mamona varia de 0,8 a 3 cm, de 0,6 a 1,5 cm de largura e de 0,4 a 1 cm de espessura.

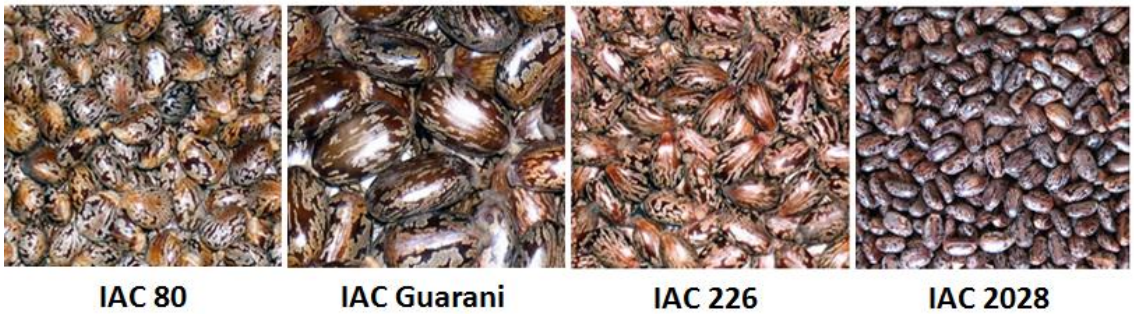

Figura 3 - Alguns exemplares de sementes de mamona de diferentes cultivares. Fonte: Disponível em http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/graos/mamona.php.

A tabela 1 apresenta a composição da semente de mamona; observa-se uma quantidade expressiva de óleo e proteínas.

Tabela 1 - Composição química média das sementes de mamona. A densidade de nutrientes varia com o nível de descasque e desidratação. Fonte: Adaptado de AKANDE et al., 2016.

Nutrientes	Variação
Umidade (%)	5-12
Proteína bruta (%)	21-48
Óleo bruto (%)	1,9-50
Carboidrato solúvel (%)	9,1-20,5
Fibra bruta (%)	2,5-24,5
Total de cinzas (%)	8,1-19,2
Energia bruta Kcal/Kg	3218-5690
Cálcio (%)	1,06-5,67
Fósforo (%)	0,3-0,73

A mamoneira é explorada comercialmente em função do teor de óleo em suas sementes, sendo este seu principal produto (COELHO, 1979). O óleo corresponde, em média, a 46 - 55% do peso total da semente, variando

entre as diferentes cultivares (BALDONI et al., 2011). O óleo de mamona apresenta grande versatilidade química no ramo industrial, podendo ser utilizado, além do mercado de biodiesel, em rotas de síntese para uma grande quantidade de produtos, incluindo cosméticos, produtos farmacêuticos, lubrificantes e polímeros. O óleo ainda pode ser usado na fabricação de fibra ótica, vidro à prova de balas e próteses ósseas, dentre várias outras aplicações (WEISS, 1983; CARNEIRO, 2003; CHIERICE e CLARO NETO, 2001; LIMA, 2007).

O óleo de mamona é único entre os óleos vegetais devido a ser a única fonte comercial de um ácido graxo hidroxilado, o ácido ricinoleico, o qual compõe cerca de 90% do óleo de mamona. A grande aplicabilidade industrial desse óleo se deve ao elevado teor do ácido ricinoleico em sua composição e à estrutura química do mesmo: o grupo hidroxila (carbono 12) é um ponto de reação química incomum e importante que complementa a ligação dupla (carbono 9) e o grupo carboxil (carbono 1) (figura 4). Essas particularidades estruturais dão a esse óleo características únicas, tais como uma alta solubilidade em metanol e etanol, a temperatura ambiente, caraterística esta que facilita muitas reações químicas, como o processo de transesterificação do óleo de mamona para biodiesel (CONCEIÇÃO et al., 2007; SEVERINO et al., 2012) e alta viscosidade em condições de amplitude térmica, possuindo também estabilidade à oxidação, o que o torna um ingrediente valioso para a produção de lubrificantes. Outros óleos vegetais perdem a viscosidade em altas temperaturas e se solidificam em baixas temperaturas (SAVI FILHO et al., 1999; SEVERINO et al., 2012).

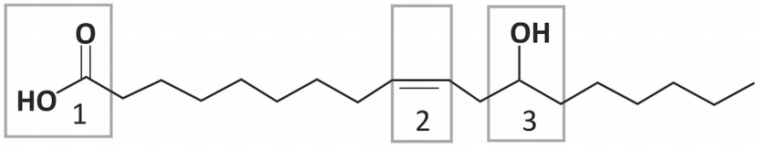

Figura 4 - Fórmula estrutural do ácido ricinoleico. Em destaque, pontos de reação na molécula de ácido ricinoleico: grupo carboxil (1), ligação dupla (2) e grupo hidroxil (3). Fonte: SEVERINO et al., 2012.

A extração do óleo da semente de mamona pode ser feita por prensagem mecânica, por extração por solvente ou por uma combinação entre estas técnicas. Na prensagem mecânica, as sementes são trituradas e depois ajustadas para baixo teor de umidade por aquecimento. Em seguida, as sementes são colocadas em prensas hidráulicas para extrair o óleo. O óleo de prensagem mecânica tem cor clara e baixo teor de ácidos graxos livres. Contudo, a prensagem mecânica removerá, aproximadamente, 45% do óleo da semente e o óleo restante poderá ser extraído apenas com solvente. A prensagem é um dos processos mais antigos de extração de óleos e é o método utilizado para extração do óleo industrial. Já no método de extração por solvente, o óleo das sementes trituradas é extraído com um solvente em um sistema Soxhlet. Os solventes utilizados para extração incluem heptano, hexano e éteres de petróleo (OGUNNIYI, 2006; JUNIOR et al., 2010; RAMALHO E SUAREZ, 2013).

1.3 Torta de mamona

A torta de mamona é o principal coproduto sólido proveniente da extração do óleo das sementes de mamona, sendo produzida na proporção de 1,2 toneladas para cada tonelada de óleo extraído; corresponde, então, a 55% do peso da semente. Contudo, esse valor pode variar de acordo com o teor de óleo da semente e do processo industrial de extração (ZUCHI et al., 2007; MOTA E PESTANA, 2011).

A torta de mamona tem seu uso predominante como adubo orgânico. Ela é uma fonte rica em nitrogênio (tabela 2), o qual é liberado de forma rápida e gradual e pode ser absorvido de forma mais eficiente do que fertilizantes nitrogenados como ureia e sulfato de amônio. Além de nitrogênio, a torta também apresenta quantidades consideráveis de fósforo e potássio. Em conjunto, essas características a tornam capaz de restaurar terras esgotadas (DIRECTORATE OF OILSEEDS RESEARCH, 2004; SEVERINO et al., 2004). Segundo SEVERINO et al. (2004), solos que recebem a torta de mamona apresentam uma maior atividade microbiana quando comparados com os solos que recebem esterco bovino ou bagaço de cana, uma vez que a torta é uma rica fonte de energia e de nutrientes. A mineralização da torta ocorre de forma intensa, e seus nutrientes são

rapidamente liberados e disponibilizados para as plantas. Nos trabalhos de LIMA et al. (2008), NASCIMENTO et al. (2008) e DA SILVA et al. (2012), constatou-se a eficácia do uso da torta de mamona como adubo orgânico (a qual foi utilizada no cultivo de mamoneiras nos três trabalhos), visto que o seu uso propiciou aumento significativo em diferentes características de crescimento das plantas, como altura, diâmetro caulinar, área foliar e matéria seca. Porém, NASCIMENTO et al. (2008) observaram que o crescimento das plantas começou a ser prejudicado quando as doses de torta utilizadas superaram 4%. Deve-se ressaltar, portanto, que nas doses inferiores a 4%, a torta de mamona manifestou apenas seus efeitos benéficos de fertilizante orgânico, promovendo aumento de todas as características de crescimento. Sendo assim, é aconselhável que a torta, mesmo sendo usada como adubo, passe pelo processo de destoxificação e desalergenização, pois a manipulação e a aplicação da torta pode causar alergia aos trabalhadores e aos moradores da proximidade para onde a poeira da torta pode ser levada pelo vento, além de poder provocar intoxicação em animais domésticos (SEVERINO, 2005).

Tabela 2 - Composição química da torta de mamona. Fonte: Adaptado de SAMPAIO et al., 2008.

Nutriente	Teor (%)
Proteína	41,07
Lipídios	1,34
Fibra	37,49
Nitrogênio	7,54
Fósforo	3,11
Potássio	0,66
Cálcio	0,75
Magnésio	0,51

Além de ser uma excelente fonte de nutrientes, a torta de mamona também apresenta propriedades nematicidas e inseticidas (DIRECTORATE OF OILSEEDS RESEARCH, 2004; GONÇALVES et al., 2005), podendo ainda ser utilizada como matéria-prima para a produção de aminoácidos,

colas, tintas, fio de nylon, plásticos (utilizados no interior de veículos, por exemplo), espumas, entre outros (MIRAGAYA, 2005).

A torta de mamona também chama a atenção por possuir uma quantidade significativa de proteínas (~ 42%), as quais estão presentes nas seguintes porcentagens: 60% de globulinas, 16% de albuminas, 4% de proteases e 20% de glutelinas e proteínas conjugadas. Esse elevado teor proteico a torna interessante para uso na alimentação animal, mas sua utilização para este fim é limitada devido à presença da ricina (ela permanece em níveis elevados na torta após a extração do óleo), uma proteína altamente tóxica e que representa aproximadamente 1,5% da torta de mamona (AMBEKAR E DOLE, 1957; BON, 1977; BALDONI et al., 2011). Além da ricina, há outros componentes que limitam o uso da torta de mamona, a saber: aglutinina, ricinina e a fração alergênica CB-1A (FORNAZIERI JÚNIOR, 1986). Entretanto, estes últimos componentes representam menor preocupação em relação à alimentação de animais, devido à presença em menor concentração ou efeitos tóxicos insignificantes (ANANDAN et al., 2005). Assim, a eliminação ou inativação total da toxicidade da torta de mamona é essencial antes que ela possa ser considerada útil como uma fonte de proteínas na alimentação animal. Além disso, mesmo se o destino final da torta for o aterro sanitário, é necessário eliminar a sua toxidade para evitar uma possível contaminação das águas e solos adjacentes (GODOY et al., 2009).

1.4 Componentes tóxicos da mamona

1.4.1 Aglutinina

A aglutinina (*Ricinus communis agglutinin* – RCA_{120}), uma das lectinas encontradas no endosperma da semente da mamona, é uma hemaglutinina que apresenta um peso molecular de aproximadamente 120 kDa. Ela é uma glicoproteína tetramérica, formada por dois heterodímeros, os quais estão unidos por forças não covalentes (figura 5). Cada heterodímero da aglutinina é formado por uma cadeia A (32 kDa) ligada por uma única ligação dissulfeto a cadeia B (37 kDa), se assemelhando, portanto, à estrutura da ricina. As cadeias A e B da aglutinina são semelhantes às da ricina, apresentando 93% e 84% de identidade (homologia), respectivamente. Esse fato reflete em

estrutura e propriedades bioquímicas similares, mas não idênticas. A aglutinina possui alta capacidade de aglutinação, mas baixa citotoxicidade (não tem a capacidade de inativar a síntese de proteínas), ao contrário da ricina. Além disso, as cadeias B da aglutinina também são glicosiladas tendo, contudo, a capacidade de se ligarem somente a resíduos de galactose (BAENZIGER E FIETE, 1979; ROBERTS E LORD, 1981; BUTTERWORTH E LORD, 1983; ROBERTS et al., 1985; HARTLEY E LORD, 2004; WU et al., 2006; SCHOFIELD et al., 2008; WANG et al., 2011; AKANDE et al., 2016).

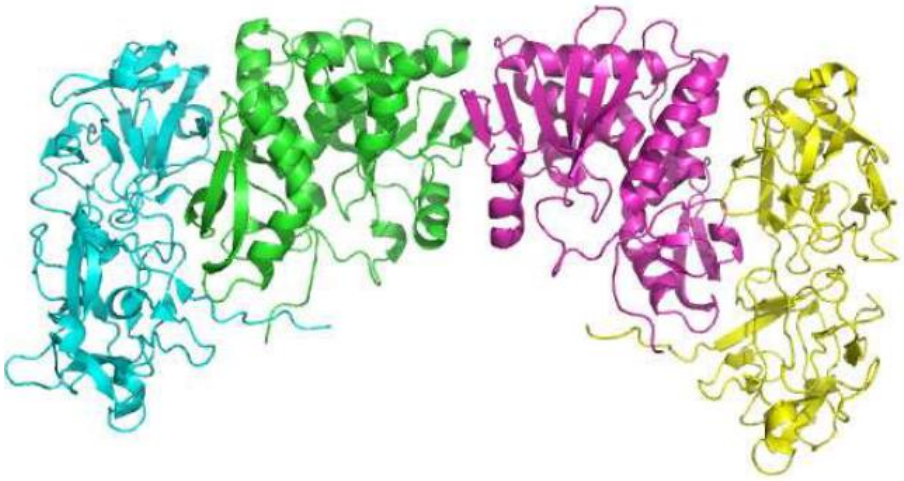

Figura 5 - Modelo cristalográfico da aglutinina. As duas cadeias centrais (verde e rosa) são as cadeias A da aglutinina, e as cadeias das extremidades (azul e verde) são as cadeias B. Fonte: MORAIS, 2010.

1.4.2 Ricinina

A ricinina (3-ciano-4-metoxi-N-metil-2-piridona) (figura 6) é um alcaloide tóxico de baixo peso molecular (MM = 164,2 g/mol) encontrado em todas as partes da mamoneira. Sua concentração pode variar entre as diferentes partes da planta; a semente, por exemplo, contém aproximadamente 0,2% de ricinina (WALLER E HENDERSON, 1961; MOSHKIN, 1986; HUSSEIN et al., 2015). Por estar presente em pequenas quantidades na planta, e também por apresentar baixa atividade tóxica, a ricinina não representa sérios problemas de toxicidade, sendo relativamente inofensiva (HORTON E WILLIAMS, 1989; AKANDE et al., 2016). A ricinina é responsável pelo efeito inseticida em *Ricinus communis,* apresentando também atividade anti-inflamatória e anti-hepatotoxicidade (BIGI et al., 2004;

SINGH E GEETANJALI, 2015). Esse alcaloide foi descoberto por Tuson, em 1864, nas sementes de mamona enquanto procurava por compostos medicamente ativos, antes mesmo de a própria ricina ser conhecida. Posteriormente, sua estrutura química foi identificada e sua biossíntese e metabolismo foram estudados (WALLER E SKURSKY, 1972; MANN E BYERRUM, 1974).

Segundo FARAH et al. (1988), o mecanismo de ação da ricinina pode estar relacionado à inibição da cadeia respiratória mitocondrial. Contudo, FERRAZ et al. (1999) acreditam na existência de outros mecanismos que teoricamente podem explicar a ação desta substância, incluindo a interação com neuroreceptores. Estes autores ainda demonstraram que a ricinina apresenta potencial para ser usada como uma droga capaz de aumentar a retenção da memória e, que em doses maiores, apresenta grandes propriedades estimulantes do sistema nervoso central, o que pode levar ao desenvolvimento de novas drogas neuroativas.

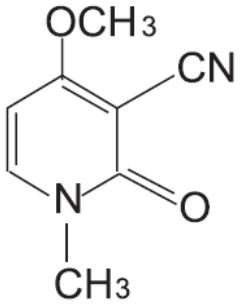

Figura 6 - Estrutura da ricinina. Fonte: JOHNSON et al., 2005.

1.4.3 Ricina

A ricina é uma fitotoxina encontrada exclusivamente no endosperma das sementes de mamona. Ela é considerada um dos venenos naturais mais mortais, sendo cotada como um agente ideal para o bioterrorismo, uma vez que é facilmente acessível, com relativa facilidade de extração e apresenta estabilidade em diferentes temperaturas (SCHEP et al., 2009; CHAN et al., 2010; AKANDE et al., 2016).

A ricina foi descoberta como sendo uma proteína pelo pesquisador Thomas Dixson, em 1887. Stillmark, um ano depois, trabalhando em sua tese de doutorado, confirmou que se tratava de uma proteína e sugeriu o

nome ricina (OLSNES, 2004). Ele chegou a purificar a ricina e interpretou que a natureza tóxica dessa proteína estava relacionada à sua habilidade de aglutinar eritrócitos. Algum tempo depois, foi descoberto que a aglutinação não foi devido à ricina e sim a presença de outra toxina, a aglutinina (TYAGI et al., 2015). A atividade bioquímica da ricina a classifica como uma proteína inativadora de ribossomo do tipo 2 (RIP tipo 2), sendo o principal representante desse grupo (PITA et al., 2004).

1.4.3.1 Proteínas Inibidoras de Ribossomo (RIPs)

As RIPs são um grupo de proteínas que possuem a capacidade de inativar cataliticamente os ribossomos, de modo irreversível, resultando na inibição da síntese proteica. Essas proteínas são conhecidas por serem produzidas por uma grande variedade de plantas, onde foram inicialmente detectadas. A ricina e a abrina (presente nas sementes de *Abrus precatorius*) são duas toxinas proteicas já bem descritas. Elas se tornaram conhecidas a mais de um século, antes mesmo de surgir a denominação de RIPs, o que aconteceu muito tempo depois, quando descobriram que elas danificavam os ribossomos (STIRPE, 2004; NARAYANAN et al., 2005). Além da ricina e da abrina, há outras proteínas citotóxicas de plantas, tais como modecina (*Modecca digitata*), curcina (*Jatropha curcas*), gelonina (*Gelonium multiflorum*) e tricosantina (*Trichosantes kirilowii)* (ENDO et al., 1987; STIRPE et al., 1988; NARAYANAN et al., 2005).

As RIPs são classificadas em dois grandes grupos, de acordo com a sua estrutura, podendo ser do tipo 1 (monoméricas) ou do tipo 2 (diméricas). As RIPs do tipo 1 apresentam apenas uma única cadeia (cadeia A, ~ 30 kDa) com atividade enzimática; dentre estas estão a tricosantina, gelonina e curcina. As RIPs tipo 2 apresentam uma cadeia A, similar a do tipo 1, ligada por uma ponte dissulfeto a cadeia B (ligeiramente maior, ~ 35 kDa), a qual apresenta propriedades de lectina. Entre estas estão a abrina, modecina, e a ricina (BARBIERI et al., 2004). Um grupo RIP tipo 3 chegou a ser proposto a fim de incluir duas outras proteínas com estrutura incomum: uma RIP b-32 isolada de milho, que é sintetizada como uma proenzima que é ativada após a remoção de um curto segmento peptídico interno, gerando dois segmentos de 16,5 e 8,5 kDa (WALSH et al., 1991); e uma RIP de cevada, a JIP60, em

que um segmento semelhante à cadeia A da RIP de tipo 1 está ligada a um segmento de tamanho similar sem função conhecida (REINBOTHE et al., 1994). Contudo, esses dois casos são considerados como exceções entre as RIPs tipo 1 (STIRPE, 2004). Aquelas que possuem estrutura semelhante às RIPs tipo 2, mas sem função definida para a cadeia B, são classificadas como RIPs tipo 2 (STIRPE E BATELLI, 2006), que é o caso da nigrina (de *Sambucus nigra)*. Uma representação esquemática da estrutura das RIPs está apresentada na figura 7.

A cadeia A de ambos os tipos de RIPs possuem atividade N-glicosidade, ou seja, possuem a capacidade de remover um resíduo de adenina do RNA ribossomal 28 S pela clivagem de uma ligação N-glicosídica simples. Segundo STIRPE (2013), as RIPs também são capazes de remover adenina do DNA e de outros polinucleotídeos, embora com uma eficiência variável. Assim, a denominação de adenina polinucleotídeo glicosilase foi proposta para essas proteínas (BARBIERI et al., 2001). Já a cadeia B auxilia no transporte da RIP para dentro da célula (OLSNES et al., 1975; OLSNES, 2004; NARAYANAN et al., 2005). Segundo LORD et al. (1994), a cadeia A, sozinha, normalmente não apresentam toxicidade pela incapacidade de penetrar na célula e atingir os ribossomos; estão, inclusive, presentes em produtos comumente utilizados na alimentação humana, como gérmen de trigo e cevada. Sendo assim, as RIPs tipo 1 são muito menos tóxicos que as tipo 2, pois, por não possuírem a cadeia B, não se ligam às células, nas quais entram com dificuldade (STIRPE, 2013).

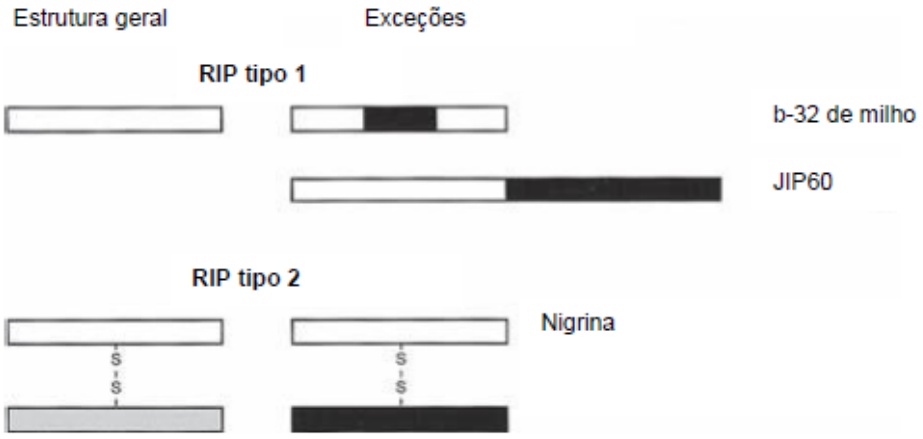

Figura 7 - Estrutura das RIPs tipo 1 e 2. Cadeia ativa (barra aberta), cadeia lectina (barra cinza) e cadeia com função desconhecida (barra preta). Pontes dissulfeto (-S-S-). Fonte: Adaptado de STIRPE E BATELLI, 2006.

1.4.3.2 Estrutura e síntese da ricina

A ricina é uma glicoproteína globular heterodimérica formada por duas cadeias polipeptídicas estruturalmente e funcionalmente distintas, as quais são unidas covalentemente por uma única ligação dissulfeto (figura 8). Um desses polipeptídios, a cadeia A (ou RTA), com massa molecular de 32 kDa, é composta por 267 resíduos de aminoácidos formando oito α-hélices e seis folhas-β; há a predominância do padrão α-hélice (36%) em sua estrutura. (MONTFORT et al., 1987; MAY et al., 1989; OLSNES e KOZLOV, 2001; HARTLEY e LORD, 2004; COOK et al., 2006; BALDONI et al., 2011). O outro polipeptídio, chamado de cadeia B (ou RTB), é dividido em dois domínios tridimensionalmente iguais, cada um possuindo dois pares de pontes dissulfeto e uma galactose. Essa cadeia apresenta massa molecular de 34 kDa, sendo que cada domínio possui, aproximadamente, 120 resíduos de aminoácidos organizados em 12 fitas-β antiparalelas conectadas por voltas-β e *loops; a* folha-β (37%) é a estrutura secundária predominante (HARTLEY e LORD, 2004; BRADBERRY, 2007).

Na ricina, os resíduos Glu 177 e Arg 180, que estão localizados no seu sítio ativo, são particularmente importantes para a atividade catalítica da RTA e uma mutação em um desses resíduos reduz fortemente a atividade enzimática dessa cadeia. Estes aminoácidos são conservados em toda a

família de proteínas RIP e são, em todos os casos, cruciais para o efeito enzimático (OLSNES e KOZLOV, 2001). A sequência de aminoácidos da ricina foi determinada por FUNATSU et al. (1979).

A biossíntese da ricina ocorre exclusivamente nas células do endosperma, no estágio de maturação das sementes. É nesse momento em que as proteínas de armazenamento são sintetizadas. Após a síntese, as proteínas se acumulam em vacúolos de armazenamento e quando a semente madura germina (durante os primeiros dias após a germinação), elas são hidrolisadas para fornecer uma fonte de aminoácidos para a síntese de proteínas codificadas por genes que são expressos na fase de desenvolvimento da plântula. Assim, após alguns dias de crescimento pós-germinativo, as reservas proteicas armazenadas, incluindo a ricina, desapareceram completamente, à medida que a planta em desenvolvimento é capaz de sintetizar os aminoácidos dos quais necessita através da fotossíntese. A função biológica da ricina é, portanto, atuar como proteína de armazenamento, com a vantagem adicional da sua potente toxicidade para impedir a predação (LORD E SPOONER, 2011).

A ricina é inicialmente sintetizada como uma única cadeia polipeptídica (pré-pro-ricina), a qual contém as sequências das cadeias A e B e uma sequência sinal amino-terminal. Essa sequência sinal é clivada após direcionar a pré-pró-ricina ao retículo endoplasmático. Nessa organela, a pró-ricina é N-glicosilada em quatro sítios, sendo dois dentro de cada cadeia (A e B). Adicionalmente, são formadas cinco pontes dissulfeto pela atividade da enzima dissulfeto isomerase, sendo quatro delas dentro da cadeia B e apenas uma ligando as cadeias A e B. Importante ressaltar que a pró-ricina ainda é cataliticamente inativa, pois a cadeia B bloqueia o sítio ativo da cadeia A. Na verdade, a cadeia B bloqueia estericamente o sitio ativo da cadeia A até mesmo na ricina madura. Sendo assim, é essencial que ocorra a separação de ambas as cadeias para que a RTA exerça sua atividade catalítica. De fato, a biossíntese da ricina em uma forma precursora inativa pode ser um mecanismo para proteger os ribossomos da própria planta. Após o armazenamento nos vacúolos, a pró-ricina é proteoliticamente clivada para libertar o heterodímero maduro da ricina (LORD et al., 1994; TYAGI et al., 2015).

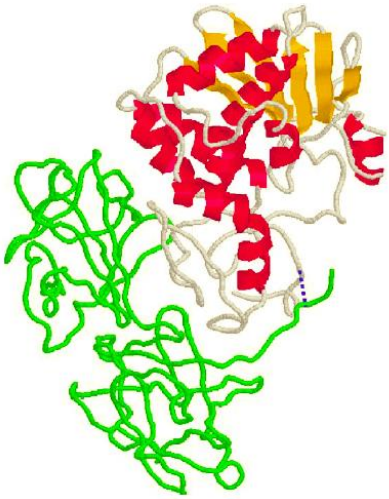

Figura 8 - Estrutura tridimensional da ricina. A cadeia B (ou RTB) está colorida em verde, enquanto a cadeia A (ou RTA) apresenta diferentes cores, de acordo com as estruturas presentes: α-hélices em vermelho, folhas-β em laranja e as alças em cinza. Em azul, o sítio da única interação intercadeia – a ponte dissulfeto. Fonte: HARTLEY E LORD, 2004.

1.4.3.3 Mecanismo de ação, internalização e transporte intracelular da ricina

A cadeia A da ricina é uma rRNA N-glicosidase e tem a capacidade de inibir a síntese de proteínas em ribossomos eucarióticos, inativando cataliticamente a subunidade ribossomal 60S. Essa inativação ocorre pela clivagem de uma ligação N-glicosídica simples, que libera uma adenina específica (adenina 4324 em ribossomo 28S de rato) de um *loop* (α-*sarcin/ricin loop* - SRL) exposto de um RNA ribossomal 28S (figuras 9 e 10). Esse *loop* está envolvido na ligação do fator 2 de elongação e os ribossomos modificados são, então, incapazes de dar suporte à síntese proteica (HARTLEY e LORD, 2004; BALDONI et al., 2011). Essa inativação é tão eficiente que uma única molécula de ricina é capaz de inativar 1.500 ribossomos por minuto, levando à morte celular (DEMANT et al., 2012). A cadeia B é uma lectina que se liga aos receptores de superfície das células contendo galactose ou N-acetil-galactosamina e facilita a internalização da ricina nas células por endocitose mediada por receptores. A RTB, portanto, é a subunidade não tóxica da ricina, tendo a função de se ligar à célula-alvo e

transportar a RTA para o citoplasma da mesma (MONTFORT et al., 1987; BOLIVAR et al., 2003; HARTLEY e LORD, 2004; BRADBERRY, 2007).

O mecanismo de entrada da ricina na célula se dá da seguinte forma: a cadeia B da ricina interage com resíduos terminais de galactose ou N-acetil-galactosamina de glicoproteínas e glicolipídios da superfície celular e, dessa forma, a proteína é endocitada. A ricina pode utilizar diferentes mecanismos endocíticos, tais como os mediados por clatrina e caveolina dependentes ou independentes, para entrar nas células. Mas, independentemente do mecanismo endocítico utilizado, a ricina é direcionada para endossomos iniciais, tendo vários destinos possíveis: a maior parte da ricina endocitada é reciclada e retorna para a superfície celular, enquanto algumas são transportadas por endossomos tardios a lisossomos, onde são degradadas proteoliticamente. Contudo, aproximadamente 5% da ricina total endocitada é transportada para a rede trans-Golgi, através do transporte vesicular e, em seguida, para o lúmen do retículo endoplasmático pelo transporte retrógrado. No retículo endoplasmático ocorre a separação das cadeias A e B da ricina pela redução da ponte dissulfeto pela dissulfeto isomerase (PDI). Essa etapa é crucial para que a cadeia A consiga atuar na inibição da síntese proteica, uma vez que a cadeia B exerce um impedimento estérico sobre o seu sítio ativo. A cadeia A é, então, retro-translocada para o citosol por um mecanismo envolvendo o complexo Sec61 (uma proteína chaperona), facilitando o transporte através das membranas, além de promover a sua renaturação. Com sua conformação restabelecida, a cadeia A é enzimaticamente ativada por uma protease-resistente e interage com o RNA ribossomal, realizando a clivagem de uma ligação glicosídica específica dentro da subunidade 60S do rRNA, inibindo a síntese de proteínas (figura 11). Após a inibição da síntese proteica, um processo de morte celular programada (apoptose) se segue. Os detalhes deste processo ainda não estão bem esclarecidos, mas há evidência de que as cadeias A e B da ricina estão envolvidas e que é um mecanismo independente daquele que inibe a síntese de proteínas. A RTB, por sua vez, não é direcionada para o citosol para a degradação, permanecendo no interior do lúmen do retículo endoplasmático onde é degradada pelo complexo CDC48 (OLSNES e

KOZLOV, 2001; HARTLEY e LORD, 2004; BRADBERRY, 2007, TYAGI et al., 2015).

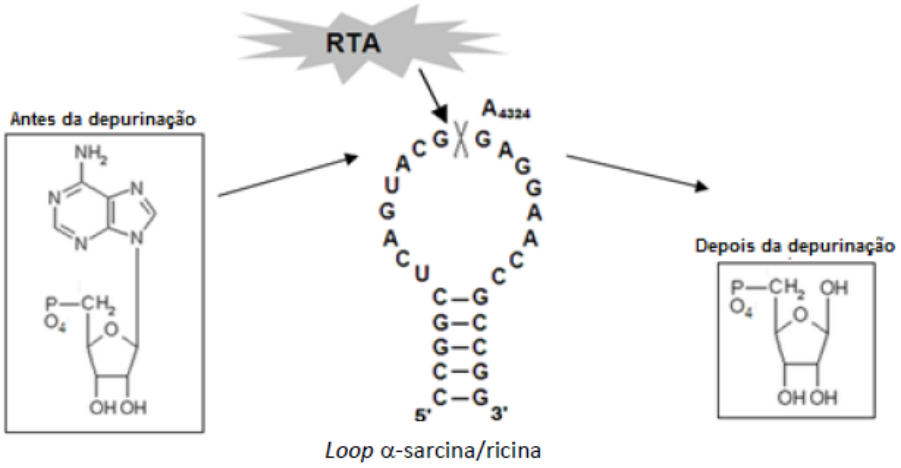

Figura 9 - Loop de rRNA e o sítio de depurinação pela ação da ricina (RTA). A imagem esquematiza a remoção da adenina (A4324) pela atividade N-glicosidase da cadeia A da ricina. Fonte: Adaptado de FERNANDES E MACHADO, 2012.

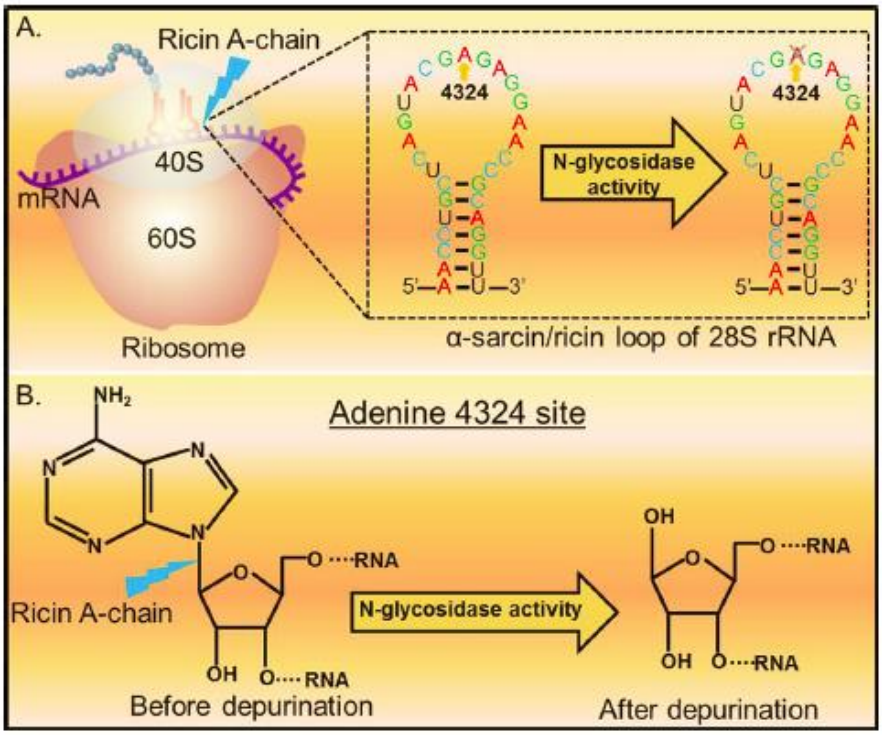

Figura 10 - Mecanismo de ação da ricina. No citosol, a RTA inativa ribossomos pela depurinação do rRNA 28S na subunidade ribossomal 60S. Em A, a ricina remove uma adenina da posição 4324 do loop α-sarcina do rRNA 28S pela sua atividade N-glicosidase. Em B, o sítio da adenina antes e depois da depurinação. Fonte: TYAGI et al., 2015.

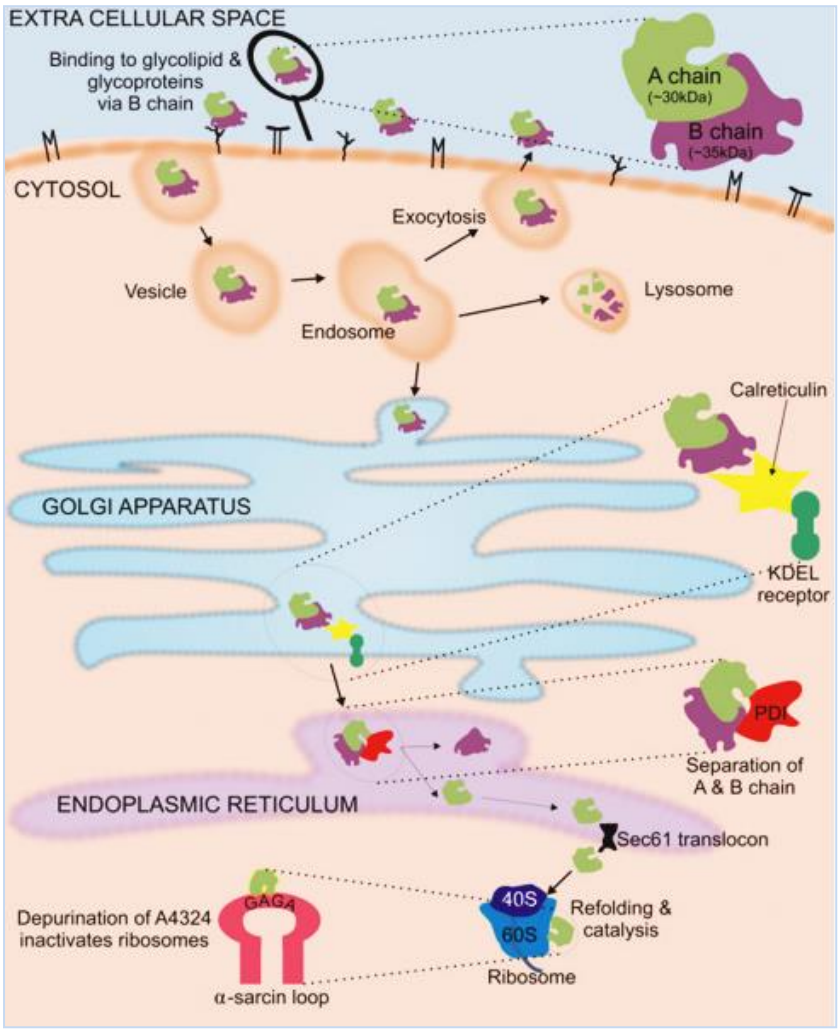

Figura 11 - Representação esquemática da entrada da ricina (RIP tipo II) em uma célula. A cadeia B se liga a uma galactose terminal nos receptores de superfície celular e toda a toxina é endocitada. A toxina alcança o complexo de Golgi e, através do transporte retrógrado, chega ao retículo endoplasmático (RE). A separação das cadeias A e B no RE (pela proteína dissulfeto isomerase) é seguida pela saída da cadeia A para o citosol através do translocador Sec61. No citosol, a cadeia A depurina a adenina 4324 do *loop* α-sarcina na subunidade ribossomal 60S e, assim, inibe a síntese proteica irreversivelmente. Fonte: BAGARIA E KARANDE, 2014.

1.4.3.4 Possíveis aplicações da ricina

A ricina é considerada um agente ideal para o bioterrorismo, pois além da sua alta letalidade, é facilmente acessível, relativamente fácil de extrair e apresenta estabilidade em diferentes temperaturas (SCHEP et al., 2009). Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) categorizam a ricina como um agente de Categoria B (a segunda prioridade mais alta), uma vez que é moderadamente fácil de disseminar, resultando em baixa

mortalidade, mas morbidade moderada a alta, necessitando do reforço específico da capacidade de diagnóstico e vigilância da doença dos CDC (AUDI et al., 2005). A ricina já era cotada como arma biológica desde a 1ª guerra mundial, pelos EUA (Serviço de Guerra Química dos EUA). Durante a 2ª guerra, os militares britânicos chegaram a desenvolver uma bomba contendo ricina (bomba W, como chamaram), mas esta nunca foi usada. Os países comunistas também chegaram a cogitar o uso da ricina. Contudo, não se sabe até que ponto a ricina foi estocada para fins militares, mas há evidências de que ela foi usada para assassinar um jornalista búlgaro, Georgi Markov, na Grã-Bretanha, que relatou informações comprometedoras sobre a vida decadente da liderança comunista búlgara. Em setembro de 1978, Markov foi atingido por um guarda-chuva carregado por um homem que se acredita ter pertencido à polícia secreta búlgara. O objeto continha uma cápsula de platina de 1,52 mm de diâmetro com dois pequenos orifícios, onde foi encontrado 0,2 mg de ricina (OLSNES, 2004). Mais recentemente (2003 e 2004), a ricina foi achada em um setor do correio da Carolina do Sul que prestava serviços ao escritório do senador Bill Frist, e também dentro de uma carta endereçada à Casa Branca. (AUDI et al., 2005). A toxicidade da ricina depende da via de exposição, que pode ocorrer por diversos meios, como feridas expostas, contato com os olhos, inalação, ingestão e aplicação direta na corrente sanguínea. Para causar a morte de um humano, por exemplo, as formas injetadas e por inalação exigem uma quantidade menor (LD_{50} = 22 µg/kg) se comparado com a ingestão (20-30 mg/kg) (SAEIDNIA E ABDOLLAHI, 2013). Os sintomas da intoxicação ocorrem, frequentemente, algumas horas após a ingestão da toxina, e os sintomas consistem em vômito, diarreia e dor abdominal. Esses sintomas podem progredir para hipotensão e disfunções renal e hepática, problemas neurológicos e cardiovasculares. A morte ocorre alguns dias depois por falência múltipla dos órgãos. Ainda não há um antídoto disponível para a intoxicação com ricina. Sendo assim, o tratamento é sintomático e de suporte, onde, dependendo da situação, é realizada a indução do vômito, administração de carvão ativado, sucralfato, lavagem gástrica e intensa fluidoterapia intravenosa (AUDI et al., 2005; FONSECA E SOTO-BLANCO, 2014).

A potente citotoxicidade da ricina também tem sido explorada terapeuticamente, sendo utilizada para sintetizar imunotoxinas que mostram atividade específica anti-câncer (RAO et al., 2005). Essa atividade anti-câncer da ricina foi relatada antes mesmo de se conhecer sobre sua estrutura e seu mecanismo de ação. O primeiro relato desse efeito foi observado em sarcomas em ratos no início da década de 50, por Mosinger (OLSNES, 2004; TYAGI et al., 2015). As imunotoxinas são moléculas quiméricas resultantes da fusão da toxina (no caso da ricina, apenas a cadeia A, pois a cadeia B iria se ligar de forma não específica a quase todas as células, as quais seriam mortas) a uma porção que a direciona para a célula alvo. Essa porção de direcionamento é, principalmente, um anticorpo monoclonal, mas também podem ser hormônios ou fatores de crescimento, cujos receptores são mais especificamente expressos em células tumorais. Dessa forma, a toxina é encaminhada até a célula cancerígena, onde irá exercer sua atividade anti-câncer pela indução de apoptose nestas células (STIRPE, 2013; ALEWINE et al., 2015; TYAGI et al., 2015). Resultados promissores já foram alcançados (*in vitro* e em animais experimentais) na utilização de imunotoxinas. Contudo, apesar da alta seletividade, as imunotoxinas produzidas com a cadeia A da ricina foram pouco eficientes em relação às células cancerígenas. Isso aconteceu, principalmente, porque a maioria das imunotoxinas foi rapidamente degradada nos lisossomos, sobrando poucas moléculas para serem translocadas para o citosol e exercerem seu efeito tóxico. Posteriormente, foi descoberto que a eficiência dessa imunotoxina poderia ser aumentada na presença da cadeia B livre, por exemplo. Esse aumento estaria ligado à redução do tráfego das imunotoxinas para os lisossomos e concomitante aumento do tráfego para o complexo de Golgi e citosol, respectivamente. Assim, ficou claro que a cadeia B tem um papel importante na rota intracelular da ricina, o que é essencial para que a cadeia A exerça sua citotoxicidade. Entretanto, apesar dos avanços notórios na terapia com imunotoxinas, muitos estudos ainda precisam ser feitos para que se consiga utilizar a ricina com essa finalidade (TYAGI et al., 2015).

O uso da ricina também vem sendo estudado dentro da engenharia genética, tendo sua atividade inseticida explorada. Juntamente com a

saporina, elas foram as primeiras RIPs estudadas que se mostraram tóxicas às larvas de insetos que se alimentaram delas. Posteriormente, várias investigações foram realizadas a fim de determinar se a transfecção com genes RIP poderia proteger as plantas da depredação por insetos. Foi, então, observada uma maior resistência para vários insetos em plantas transfectadas com genes de RIPs (tipo 1 e 2) (STIRPE, 2013).

1.5 Métodos de inativação da ricina

A transformação da torta de mamona em um produto atóxico, que possa ser usado para suplementação na alimentação animal, já vem há tempos despertando a atenção de muitos pesquisadores no mundo, tendo-se obtido resultados com diferentes graus de sucesso e limitações. Diferentes tipos de técnicas têm sido utilizados com essa finalidade, podendo ser classificadas como: métodos físicos (tais como aquecimento e pressão), químicos (uso de substâncias ácidas, básicas, etc), recursos biotecnológicos (microorganismos e genética) e a associação de duas ou mais técnicas já citadas (AKANDE et al., 2016).

Um dos primeiros registros da tentativa de desenvolvimento de um método que eliminasse, ao mesmo tempo, a toxicidade e a alergenicidade da torta de mamona foi feito por GARDNER et al. (1960), tendo sido desenvolvidos métodos eficazes, mas que ainda careciam de avaliação não só em relação à viabilidade industrial e econômica desses processos, como também das características nutricionais e da palatabilidade do produto final. Esses autores testaram diversos processos para a destoxicação e desalergenização da torta, que incluíram métodos físicos (cozinhar a torta de mamona sob várias condições de umidade e temperatura; utilização de calor seco a elevadas temperaturas), químicos (utilização de hidróxido de sódio, ácido clorídrico, hipoclorito de sódio, cloreto de sódio, sulfato de amônia, entre outros) e tratamentos biológicos (fermentação aeróbia e digestão enzimática). Os resultados indicaram que todos os tratamentos foram eficazes na inativação da ricina e do fator alergênico, em graus variados, sendo que os mais eficientes foram: aquecimento seco a 207 ºC por 125 min, cozimento da torta em flocos na presença de 2% de NaOH e cozimento com 0,9% de ácido clorídrico (HCl) e 3% de formaldeído (CH_2O). Para

atestar a eficiência desses métodos, os autores utilizaram o teste de hemaglutinação, pois na época em que o trabalho foi realizado, a aglutinação ainda era equivocadamente atribuída à ricina.

Anos mais tarde, FREITAS (1974), avaliou a destoxificação e desalergenização da torta de mamona mediante o uso de radiação ionizante, e concluiu que somente a radiação de elevada intensidade (20 Mrad), aplicada à torta misturada com água na proporção de 1:6 (v:v), foi capaz de eliminar ambos os fatores nocivos. Devido à elevada radiação e, consequentemente, elevado custo de energia, essa técnica se mostrou inviável para uma produção em escala industrial.

Em 2005, ANANDAN et al. empregaram tratamentos físicos e químicos, separadamente, na tentativa de destruir a ricina. Os tratamentos físicos foram selecionados com base no fato de que a ricina é termolábil e solúvel em água. Os tratamentos físicos aplicados à torta de mamona foram: imersão da torta em água por diferentes tempos; vaporização; imersão em água fervendo, por diferentes tempos; autoclavagem; e aquecimento em calor seco em diferentes tempos e temperaturas. Embora todos os métodos físicos aplicados tenham diminuído o conteúdo de ricina, em diferentes proporções, o único que resultou na total destruição da toxina foi a autoclavagem (15 psi por 60 minutos). No entanto, esse método exige muita energia, tornando-se economicamente inviável quando são consideradas grandes quantidades de torta. Já no tratamento químico da torta, ANANDAN et al. (2005) utilizaram as seguintes substâncias: amônia, formaldeído, óxido de cálcio, hidróxido de sódio, cloreto de sódio e ácido tânico (em diferentes concentrações e tempos). Esses autores observaram que o tratamento com $Ca(OH)_2$ (40g de $Ca(OH)_2$ /kg de torta) destruíram completamente a ricina, como avaliado por SDS-PAGE. Contudo, ensaios de citotoxicidade não foram realizados nesse estudo.

Em 2009, GODOY et al. utilizaram uma técnica de biodestoxificação para, ao mesmo tempo, inativar a ricina, reduzir a alergenicidade da torta de mamona e produzir uma lipase ácida e termoestável. Para isso, eles realizaram a fermentação em estado sólido (FES) utilizando o fungo *Penicillium simplicissimum*, o qual foi demonstrado ser um excelente produtor de lipase. Os autores observaram que o fungo foi capaz de crescer

e produzir a enzima, além de reduzir o teor de ricina (para níveis não detectáveis) e o potencial alergênico da torta. Assim, a FES possibilita um aumento na utilidade da torta de mamona, pois, além de destoxificar e viabilizar o seu uso na alimentação animal, também promove a produção de enzimas úteis, tais como as lipase. Contudo, nesse trabalho não foi utilizado nenhum ensaio biológico que pudesse confirmar a real eficiência da metodologia testada, sendo realizadas apenas técnicas convencionais (SDS-PAGE e cromatografia) para tal. Contudo, em 2012, GODOY et al. realizaram um ensaio *in vitro*, utilizando células Vero, para confirmar a eliminação da toxicidade da torta de mamona pela destoxificação por *P. simplicissimum* através da fermentação em estado sólido. Os resultados mostraram que o extrato proteico obtido da torta fermentada por 72 horas não foi tóxico às células, e estas cresceram similarmente ao controle negativo (PBS pH 7), confirmando a eficiência do tratamento. Além disso, esse estudo mostrou a importância de se realizar ensaios biológicos *in vitro* para validar processos de destoxificação.

Também em 2009, BARNES et al. investigaram a eficácia de métodos previamente usados para a inativação da ricina na torta. As metodologias testadas foram: pressão a quente e a frio, fervura a 100 ºC por 60 minutos, autoclavagem a 121 ºC por 60 minutos e utilização de produtos químicos desnaturantes de proteínas (guanidina, ureia e hidróxido de cálcio). Foram testadas diferentes tipos de amostras, a saber: semente intacta, semente moída e semente com o óleo já extraído (torta), aquecida ou não. Os resultados mostraram que a fervura e a autoclavagem apresentaram vários graus de efetividade dependendo do tipo de amostra utilizada. A fervura só foi notoriamente eficiente na desnaturação da ricina na torta prensada a frio, enquanto a autoclavagem foi eficiente tanto para a torta prensada a frio quanto para a semente moída. Além disso, a utilização da prensagem a quente para a extração do óleo mostrou reduzir significativamente a quantidade de ricina na torta resultante. Assim, para os autores, a prensagem a quente também representa um método viável para neutralizar a ricina. No entanto, os resultados obtidos neste estudo não foram testados em animais ou em cultura de células; e para a utilização desses métodos em um ambiente industrial que envolve maiores quantidades de amostras,

cuidados e ajustes devem ser tomados para assegurar a qualidade do produto formado.

Nosso grupo de pesquisa também investigou metodologias que fossem capazes de destoxificar a torta de mamona. Em 2009, CRESPO NETO demonstrou a ação de metaloproteases na degradação da ricina durante o período de armazenamento da torta, mostrando ser uma forma eficiente de destoxificação deste coproduto. Acredita-se que estas proteases possam ter origem na própria semente, possivelmente induzidas pelo seu esmagamento. Contudo, nenhum teste de citotoxicidade foi feito, nesse trabalho, para validar essa metodologia como realmente eficaz na destoxificação da torta. Em 2012, FERNANDES et al. utilizaram dois processos para destoxificação e inativação dos alérgenos presentes na torta de mamona. Esses autores utilizaram $Ca(OH)_2$ ou CaO no tratamento da torta e observaram que esse coproduto perdeu completamente as propriedades tóxicas e alergênicas. Quando realizaram a FES, foi observado que o fungo *Aspergillus niger* cresceu utilizando a torta como um substrato e, após 24 h, a citotoxicidade da ricina reduziu para menos de 2%. Além disso, esses autores estabeleceram um teste biológico para detectar a ricina e validar esses processos de destoxificação, demonstrando, então, que o tratamento alcalino e a FES (utilizando o fungo *A. niger*) foram eficientes na inativação da ricina e dos alérgenos, permitindo a formação de um coproduto livre de toxicidade e de alergenicidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Analisar os efeitos citotóxicos da ricina e elucidar os mecanismos de inativação desta toxina por diferentes métodos de destoxificação.

2.2 Objetivos específicos

- Purificar a ricina e avaliar os danos, a nível ultraestrutural, em diferentes organelas celulares;

- Avaliar a degradação da ricina e a produção de proteases durante o armazenamento da torta de mamona, um dos processos propostos para destoxificação deste coproduto;
- Verificar o efeito citotóxico da torta de mamona, após o armazenamento em estufa;
- Analisar o efeito do óxido de cálcio, outro tratamento proposto para destoxificação da torta de mamona, sobre a estrutura da ricina;
- Investigar o mecanismo pelo qual o óxido de cálcio inativa a ricina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das sementes de mamona

As sementes de mamona (cultivar IAC-226) foram obtidas no Instituto Agronômico de Campinas - São Paulo, Brasil.

3.2 Obtenção da torta de mamona

As sementes obtidas foram esmagadas com o auxílio de almofariz e pistilo. O produto da prensagem foi seco em papel toalha para a remoção do óleo e, consequentemente, obtenção da torta de mamona.

3.3 Armazenamento da torta de mamona

A torta de mamona obtida foi dividida em pequenas porções iguais (10g) e estas foram colocadas em placas de petri, dentro de um dessecador. Essas pequenas porções de torta foram armazenadas em estufa, a 37 ºC, por diferentes períodos de tempo (24 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias e 3 meses). Uma porção da torta não foi levada a estuda (torta controle – 0 h).

3.4 Extração de proteínas da torta

3.4.1 Extração da ricina

A extração da ricina foi feita na torta não tratada (tempo 0 h) e nas armazenadas por diferentes tempos (24 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28

dias), conforme descrito por CRESPO NETO (2009). Para a extração, foi utilizada água destilada, na proporção de 1 g de torta/10 mL de água. Posteriormente, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 41000 x g, sendo o pellet resultante descartado e o sobrenadante estocado para posterior utilização.

3.4.2 Extração de proteases

Para a extração de proteases, às tortas (não tratadas e armazenadas por diferentes tempos) foi adicionado um tampão contendo fosfato de potássio 50 mM, cloreto de potássio 10 Mm, EDTA 1 mM, e DTT 1 mM, pH 7,4. Foram adicionados 30 mL de tampão para cada 10 g de torta. Os homogenatos foram agitados no mixer por 30 minutos e, posteriormente, foram filtrados em quatro camadas de gaze. Em seguida, os filtrados foram centrifugados a 270 x g por 10 minutos a 4 ºC (para remover as células não destruídas e os resíduos celulares) e os sobrenadantes novamente centrifugados a 10500 x g por 15 minutos a 4 ºC. O sobrenadante resultante foi coletado para futuros ensaios.

3.5 Dosagem de proteínas

A determinação da concentração de proteínas em todas as amostras utilizadas nesse trabalho foi feita pelo método de BRADFORD (1976), sendo utilizada albumina sérica bovina (BSA) para a curva padrão. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro (Thermo Plate, TP Reader) a ʎ595 nm.

3.6 Análise dos efeitos do armazenamento da torta de mamona sobre a ricina

3.6.1 SDS-PAGE

A ricina extraída das tortas de mamona (procedimento descrito no item 3.4.1) foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo o método descrito por LAEMMLI (1970). O gel final foi composto por um gel separador (15 cm x 9 cm x 0.15 cm; L x A x E) e um gel concentrador (15 cm x 2.5 cm x

0.15 cm; L x A x E). Em cada ensaio eletroforético foram utilizadas 135 µg de proteínas por poço; três partes de cada amostra foram adicionadas a uma parte de tampão de amostra 4x, que contém Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; dodecil sulfato de sódio (SDS) 4%; azul de bromofenol 1%; glicerol 12% e β-mercaptoetanol 2%. A eletroforese foi realizada a aproximadamente 100 V (em tampão de eletroforese Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 1,4%, SDS 0,1%), por 2 horas, no sistema Bio-Rad Mini-Protean 3 Cell. O gel foi corado com azul brilhante de Coomassie R-250 (Sigma-Aldrich), para revelar as proteínas, e descorado com uma solução de metanol 40% contendo ácido acético 10%. Após essa etapa, o gel foi fotografado e analisado. Os marcadores de peso molecular foram usados como padrão (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, Bio-Rad, 6,5-200 kDa).

3.6.2 Detecção de atividade proteásica - Zimografia

As proteases extraídas das tortas de mamona (procedimento descrito no item 3.4.2) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.6.1, porém sob condições não redutoras e na presença de 0,1% de gelatina bovina. Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado duas vezes por 30 minutos em Triton X-100 2,5% e, posteriormente, incubado em tampão de incubação (Tris-HCl 0,1 M pH 8,0) a 37 ºC, por 24 horas. Ao término desse período, o gel foi corado com azul brilhante de Coomassie R-250, descorado com uma solução de metanol 40% contendo ácido acético 10%, fotografado e analisado.

3.6.3 Avaliação da atividade citotóxica das tortas de mamona armazenadas

3.6.3.1 Cultura de células Vero

Todos os ensaios de citotoxicidade realizados neste trabalho foram feitos em colaboração com o Dr. Edésio José Tenório de Melo, do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF.

Nestes ensaios foram utilizadas células Vero (células aderentes epiteliais de rim de *Cercopithecus aethiops*, conhecido como Macaco Verde

ou *Green Monkey*). Estas células foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm^2 (TPP/90025) em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 5% de soro fetal bovino, a 37 ºC e na presença de 5% de CO_2.

Para realizar o teste de citotoxicidade, as células da cultura em monocamada foram desprendidas da garrafa utilizando uma solução de tripsina (tripsina 0,5 mg/mL + EDTA 0,2 mg/mL), durante 1 minuto, a 37 ºC. Posteriormente, as células foram ressuspendidas em meio de cultura (DMEM + 5% de soro fetal bovino) e foi feita a contagem das células em microscópio óptico invertido. Esta suspensão foi dividida em uma placa de 24 poços, na proporção de 4 x 10^3 células por poço. A placa de cultura foi mantida a 37 ºC por 48 horas até as células atingirem o estágio de monocamada.

3.6.3.2 Avaliação da atividade citotóxica

Para avaliar a toxicidade das tortas armazenadas, os extratos proteicos obtidos da torta não tratada (tempo 0 h – controle positivo) e das tortas armazenadas por 24 horas e 3 meses foram, primeiramente, esterilizadas utilizando um filtro com poro de 0,22 µm, em capela de fluxo laminar. Também foi feito um controle negativo, no qual as células foram incubadas apenas com PBS pH 7,2. As células foram, então, incubadas com meio de cultura (DMEM + 5% de soro fetal bovino); PBS pH 7,2; torta não tratada (tempo 0 h) e tortas armazenadas por diferentes períodos (24 horas e 3 meses). Todas as amostras utilizadas nesse experimento foram testadas em três concentrações diferentes, como já estabelecido por FERNANDES (2014) como sendo concentrações tóxicas às células: 10 ng/mL, 100 ng/mL e 1 µg/mL. O tempo de incubação total foi de 48 horas. A seguir, as células foram lavadas três vezes com solução de PBS, pH 7,2 e, então, fixadas com solução de Bouin (ácido pícrico e formaldeído [4:1]) por 5 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas quatro vezes com PBS e coradas com solução de Giemsa diluído em PBS (9:1) por 6 horas em temperatura ambiente. As lamínulas foram embebidas em solução decrescente de acetona-xilol (90-10%, 70-30%, 30-70%, 10-90%) e, após essa etapa, foram montadas em lâminas histológicas com entelan e deixadas secando por 48

horas. Após esta etapa, as lâminas foram observadas em microscópio óptico e fotografadas com objetiva de 40x. A citotoxicidade da ricina foi avaliada pelas alterações morfológicas celulares observadas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.7 Extração e purificação da ricina

A ricina foi extraída a partir da torta de mamona e purificada seguindo a metodologia descrita por ANANDAN et al. (2005). Amostras de torta de mamona (500 g) foram trituradas em grau com auxílio de um pistilo, embebidas com 2.5 L de água destilada. Esta suspensão foi acidificada com HCl até atingir pH 3,8, e foi mantida sob agitação por 6 horas a 30 ºC. Após sedimentação dos sólidos, o sobrenadante foi filtrado em papel filtro Whatman Nº 1. O precipitado foi ressuspendido em 1.5 L de água destilada (sem HCl) e ficou sob agitação por 3 horas e, novamente, filtrada. Esta etapa foi repetida mais uma vez. O filtrado, cerca de 5 L, contendo toda ricina e porções de ricinina, foi evaporado em centrífuga a vácuo (Christ, RVC 2-18 CD plus) até 300 mL. Esta solução foi tratada com NaCl até a saturação e foi, a seguir, centrifugada a 2000 x g por 20 minutos para separar o precipitado contendo ricina. O precipitado foi dissolvido em 200 mL de água deionizada e re-precipitado com sulfato de amônio (90% de saturação). Após duas outras precipitações com o mesmo sal, o precipitado foi diluído em 200 mL de água deionizada e dialisado a 4 ºC por um período de 72 horas, contra tampão Tris pH 6,8. A troca do tampão foi feita uma vez a cada 2 horas, nas primeiras 12 horas e, subsequentemente, uma vez a cada 6 horas no tempo restante. Após 72 horas, o dialisado foi centrifugado a 2000 x g por 10 minutos para separar a matéria insolúvel do sobrenadante contendo a ricina. A solução foi concentrada a vácuo e armazenada a - 20ºC para posterior utilização.

3.8 Cromatografia de filtração em gel

A fim de melhorar a qualidade da amostra obtida, eliminando possíveis contaminantes, esta foi fracionada em coluna (50 x 1,5 cm) com Sephadex G-75 (Sigma-Aldrich). O eluente utilizado foi o ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e, para o empacotamento da coluna, a resina foi

embebida em TFA 0,1%. Depois de empacotada, a coluna foi equilibrada com o eluente (três vezes o volume da coluna) no fluxo de uso. Cerca de 1 mL de amostra (10 mg) foi aplicada no topo da coluna e frações de 1 mL foram coletadas, por tubo, em intervalos de 60 segundos, por meio de um coletor automático (Bio Rad, Model 2110 Fraction Collector). Os eluatos foram lidos a 280 nm em espectrofotômetro (PG Instruments Ltd, T70 UV/VIS Spectrometer). As frações de interesse (ricas em ricina) foram coletadas, concentradas a vácuo e estocadas a - 20 ºC para posterior utilização.

3.9 Caracterização da proteína isolada

3.9.1 SDS-PAGE

Esta etapa foi realizada conforme já descrito no item 3.6.1. Contudo, no primeiro gel foram utilizados 30 µg de proteína por poço e no segundo gel foram utilizadas duas concentrações diferentes de proteína por poço: 10 µg e 60 µg. Os marcadores de peso molecular utilizados nestes géis foram: PageRuler^{TM} Prestained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, 10-180 kDa e SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, Bio-Rad, 6,5-200 kDa.

3.9.2 Sequenciamento

As sequências N-terminais parciais de aminoácidos das bandas proteicas vistas no gel foram obtidas no sequenciador automatizado Shimadzu PPSQ-33A utilizando o princípio de degradação de EDMAN. As sequências de aminoácidos obtidas foram comparadas com a sequência N-terminal das cadeias A e B da ricina (RTA e RTB) utilizando o sistema de pesquisa BLAST.

3.9.3 Avaliação por Espectrometria de Massas

3.9.3.1 Preparo da amostra

A proteína isolada (2 µL - 5 µg) foi reduzida em 30 µL de DTT 10 mM por 30 minutos e a temperatura ambiente, seguida por uma alquilação em 30

µL de iodoacetamida 50 mM por 30 minutos, a temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, a digestão da ricina foi realizada adicionando 20 µL de solução de tripsina (Promega) (33 ng/µL), preparada em 50 mM de bicarbonato de amônio, e a amostra foi incubada por 16 horas a 37 ºC no *Mixing Block* (BIOER, MB-101). Após esta etapa, com o auxílio de ponteiras do tipo Zip Tip C18 (Millipore), a amostra foi dessalinizada, concentrada e purificada. A amostra resultante foi concentrada em centrífuga à vácuo até um volume de, aproximadamente, 50 µL. As amostras foram transferidas para *Total Recovery Vials* (Waters).

3.9.3.2 Identificação e análise da proteína

A fim de obter mais informações a respeito da homogeneidade e da sequência da proteína purificada, esta foi analisada por espectrometria de massas, utilizando um aparelho nanoAcquity UPLC conectado a um espectrômetro de massas modelo Synapt G2-Si HDMS (Waters). Para análises ESI-LC-MS/MS utilizou-se uma coluna HSS T3 1,8 µm (75 µm x 150 mm) a uma taxa de fluxo de 400 nL/min. Para eluição dos peptídeos, um gradiente binário foi usado, em que a fase A consistia em água (Tedia) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich), e a fase B consistia de acetonitrila (Sigma-Aldrich) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich). O gradiente iniciou-se em 7-40% B em 0-33.21 minutos; 40-85% B em 33.21-37.21 minutos; 85-85% B em 37.21-41.21 minutos; 85-7% B em 41.21-43.21 minutos. As análises foram realizadas em positivo e em modo de resolução, em modo independente de aquisição de dados (DIA). A transferência de energia de colisão subiu de 20 V para 35 V, no modo de alta energia; com uma tensão de cone e capilar de 30 V e 2800 V, respectivamente, e temperatura de fonte de 70 °C. As taxas de varredura para aquisição dos espectros foram ajustadas para 0,5. O [Glu1]-fibrinopeptídeo B humano (Sigma-Aldrich) a 100 fmol/µL foi usado como um calibrador externo. O processamento dos espectros e a busca em banco de dados foram efetuadas pelo ProteinLynx Global Service v.3.02 (PLGS, Waters), com os seguintes parâmetros: Mínimo de fragmentos de íons por peptídeo: 2, Mínimo de fragmentos de íons por proteína: 5 e Mínimo de peptídeos por proteínas: 2, Clivagens perdidas: 1, Modificação fixa Carbamidometil C e

Modificação variável modificação M. Foi utilizado o banco de dado de proteínas da UniProt / Ricinus communis. A classificação funcional foi realizada utilizando o programa UniProtKB (http://uniprot.org).

3.9.4 Ensaio de citotoxicidade da ricina

3.9.4.1 Cultura de células LLC-MK2

Nestes ensaios foram utilizadas células LLC-MK2 (células da linhagem epitelial derivadas de rim de Macaca mulatta, conhecido como Macaco Rhesus). Estas células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 5% de soro fetal bovino, a 37 ºC e na presença de 5% de CO_2.

Para realizar o teste de citotoxicidade, as células LLC-MK2 da cultura em monocamada foram desprendidas de uma garrafa de 25 cm^2 (TPP/90025) utilizando uma solução de tripsina (tripsina 0,5 mg/mL + EDTA 0,2 mg/mL), durante 1 minuto, a 37 ºC. Posteriormente, as células foram ressuspendidas em meio de cultura (DMEM + 5% de soro fetal bovino) e foi feita a contagem das células em microscópio óptico invertido. Esta suspensão foi dividida em uma placa de 96 poços, na proporção de 4 x 10^3 células por poço. A placa de cultura foi mantida a 37 ºC por 48 horas até as células atingirem o estágio de monocamada para a incubação com ricina.

3.9.4.2 Avaliação da atividade citotóxica

Para avaliar a atividade citotóxica da ricina, a solução contendo a holotoxina foi, inicialmente, esterilizada utilizando um filtro com poro de 0,22µm, em capela de fluxo laminar, e, então, adicionada às células (alcançando uma concentração final de 1 µg/mL). Foi feito um controle negativo, no qual as células foram incubadas apenas com PBS pH 7,2. A incubação das células foi mantida em câmara de cultivo a 37 ºC por 48 horas. Após esse período, as células controle e tratadas foram lavadas por três vezes com PBS pH 7,2, a 37 ºC, para a análise morfológica e quantificação. Para isso, as células foram fixadas com solução de ácido pícrico e formaldeído (4:1) por 5 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas quatro vezes com PBS e coradas com solução de Giemsa diluído

em PBS (9:1) por 6 horas em temperatura ambiente. As lamínulas foram embebidas em solução decrescente de acetona-xilol (90-10%, 70-30%, 30-70%, 10-90%) e foram, então, montadas em lâminas histológicas com entelan e deixadas secando por 48 horas. Em seguida, as lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio óptico (Zeiss, Axioplan) em aumento de 40x. A citotoxicidade da ricina foi avaliada tanto pelas alterações morfológicas celulares observadas quanto pela contagem de células vivas. Foram quantificados 3 campos de 6 lamínulas diferentes e os resultados obtidos foram dados como média destas contagens. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.10 Avaliação dos efeitos da exposição à ricina por microscopia eletrônica de transmissão

Para observação dos efeitos da exposição à ricina, as células foram tratadas com a holotoxina, conforme descrito no item 3.9.4.2, e, posteriormente, foram fixadas em uma solução contendo glutaraldeído 2,5% (v/v) e formaldeído 4% (v/v) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8%, no escuro por 2 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas com concentrações crescentes de acetona (10%, 30%, 70%, 90%, 100% [2x]) e, então, embebidas em resina epóxi (Epon 812). As amostras foram levadas à estuda a 60 ºC em moldes de silicone para polimerizar, por 48 horas. Posteriormente, cortes ultrafinos (~ 100 nm) foram obtidos com o auxílio de um ultramicrótomo (Leica, Reichert Ultracut Ultramicrotome) e, posteriormente, foram contrastados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo 0,2% para visualização no microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1400Plus).

3.11 Tratamento da ricina com CaO

Segundo FERNANDES (2014), uma solução de CaO 0,6% (0,1 M) é suficiente para inativar a ricina. Assim, uma solução de ricina (0,6 mg/mL de CaO 0,1 M) foi mantida em agitação no *Mixing Block* (BIOER, MB-101) por 8 horas, a 25 ºC. Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 1 minuto a 1500 x g, e o sobrenadante foi coletado e estocado a - 20 ºC.

Para confirmar se o tratamento com CaO foi eficiente na inativação da ricina, células LLC-MK2 foram incubadas com a ricina tratada com CaO, como descrito no item 3.9.4. Após 48 horas, a toxicidade foi estimada pelas alterações morfológicas observadas e pela contagem do número de células LLC-MK2 vivas, a qual foi comparada com a das células tratadas com ricina.

3.12 Análise dos efeitos do tratamento com CaO - Determinação do mecanismo de inativação da ricina

3.12.1 SDS-PAGE

A ricina tratada com CaO foi submetida, inicialmente, à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, conforme já descrito no item 3.6.1. A ricina intacta também foi aplicada no gel, atuando como padrão para a comparação com a ricina tratada. Além disso, para verificar se o pH alcalino (por volta de 13) das amostras tratadas com CaO poderia estar impedindo as proteínas de entrarem no gel, foi realizada outro SDS-PAGE, agora a 15%, utilizando amostras com o pH ajustado para aproximadamente 6,0. Os marcadores de peso molecular utilizados nesses géis foram o PageRuler^{TM} Prestained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, 10-180 kDa, e o Multicolored Protein Markers, Sigma-Aldrich, 8-220 kDa.

3.12.2 Cromatografia de filtração em gel

Ricina (300 µL - 5 mg) foi aplicada em coluna (50 x 1,5 cm) com Sephadex G-75. As proteínas foram eluídas com TFA 0,1% e frações de 1 mL foram coletadas, por um coletor automático, em uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. Os eluatos foram lidos a 220 nm em espectrofotômetro.

A fim de comparar a estrutura da ricina intacta com a da ricina tratada com CaO, 5 mg (300 µL) da holotoxina foi tratada com CaO 10% (assim como descrito no item 4.8) e, então, foi aplicada em coluna (50 x 1,5 cm) com Sephadex G-75. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min, sendo coletados 1,0 mL/tubo. Os eluatos foram lidos a 220 nm em espectrofotômetro e os perfis cromatográficos obtidos, de ambas as amostras, foram comparados e analisados.

3.12.3 Espectrometria de massas

Para avaliar as possíveis modificações estruturais que poderiam estar ocorrendo na ricina para sua inativação após o tratamento com CaO, a amostra tratada foi submetida diretamente a uma análise por espectrometria de massas, utilizando o Espectrômetro Synapt G2-Si da Waters.

Neste experimento, a amostra não foi alquilada e reduzida, uma vez que ela já poderia estar clivada pela ação da incubação com a solução de CaO. Apenas a etapa do uso de ponteiras do tipo Zip Tip C18 (Millipore) foi realizada. A amostra final foi concentrada em centrífuga à vácuo (até um volume de 50 µL), foi transferida para *Total Recovery Vials* e, então, avaliada em espectrômetro de massas como já descrito no item 3.9.3.2.

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento e caracterização da ricina

O primeiro objetivo deste trabalho foi isolar a ricina para que esta fosse utilizada nas demais etapas.

A figura 12A mostra, em um gel SDS-PAGE 12%, que uma proteína foi parcialmente purificada, sendo possível visualizar duas bandas majoritárias: a primeira banda, com massa molecular ~34 kDa, que corresponde, possivelmente, a cadeia B da ricina; e a segunda banda, com massa molecular ~ 32 kDa, que corresponde, possivelmente, a cadeia A da ricina. Além destas duas bandas, pode-se visualizar neste gel um contaminante com peso molecular de ~21 kDa.

Para melhorar a qualidade da amostra isolada obtida, foi realizada uma cromatografia de filtração em gel. A partir do perfil cromatográfico obtido (figura 12C) foi possível identificar três frações (picos) diferentes: F1, correspondendo a frações com massa molecular maior que 75 kDa, F2 (maior pico) contendo frações com massa molecular entre 30 e 70 kDa, e F3, contendo peptídeos. A fração de interesse (F2) foi coletada e, a partir dela, foi feito um novo gel SDS-PAGE 12% para avaliar se a amostra continha apenas a proteína de interesse. A figura 12B apresenta um gel SDS-PAGE 12% da fração F2, onde é possível observar que a amostra apresenta, predominantemente, as duas bandas correspondentes esperadas

para as cadeias A e B da ricina (raia F2); além disso, nota-se se que mesmo quando uma quantidade maior de proteína (60 µg) foi aplicada no gel (raia F2*), o contaminante (~21 kDa) não aparece mais na amostra após a cromatografia.

A caracterização da proteína foi feita, inicialmente, pelo sequenciamento N-terminal parcial, utilizando o princípio da degradação de Edman, das sequências de ambas as bandas majoritárias visualizadas no gel. O alinhamento em banco de dados NCBI-Blast mostrou 100% de homologia com as regiões N-terminal das cadeias A e B da ricina (figura 12D).

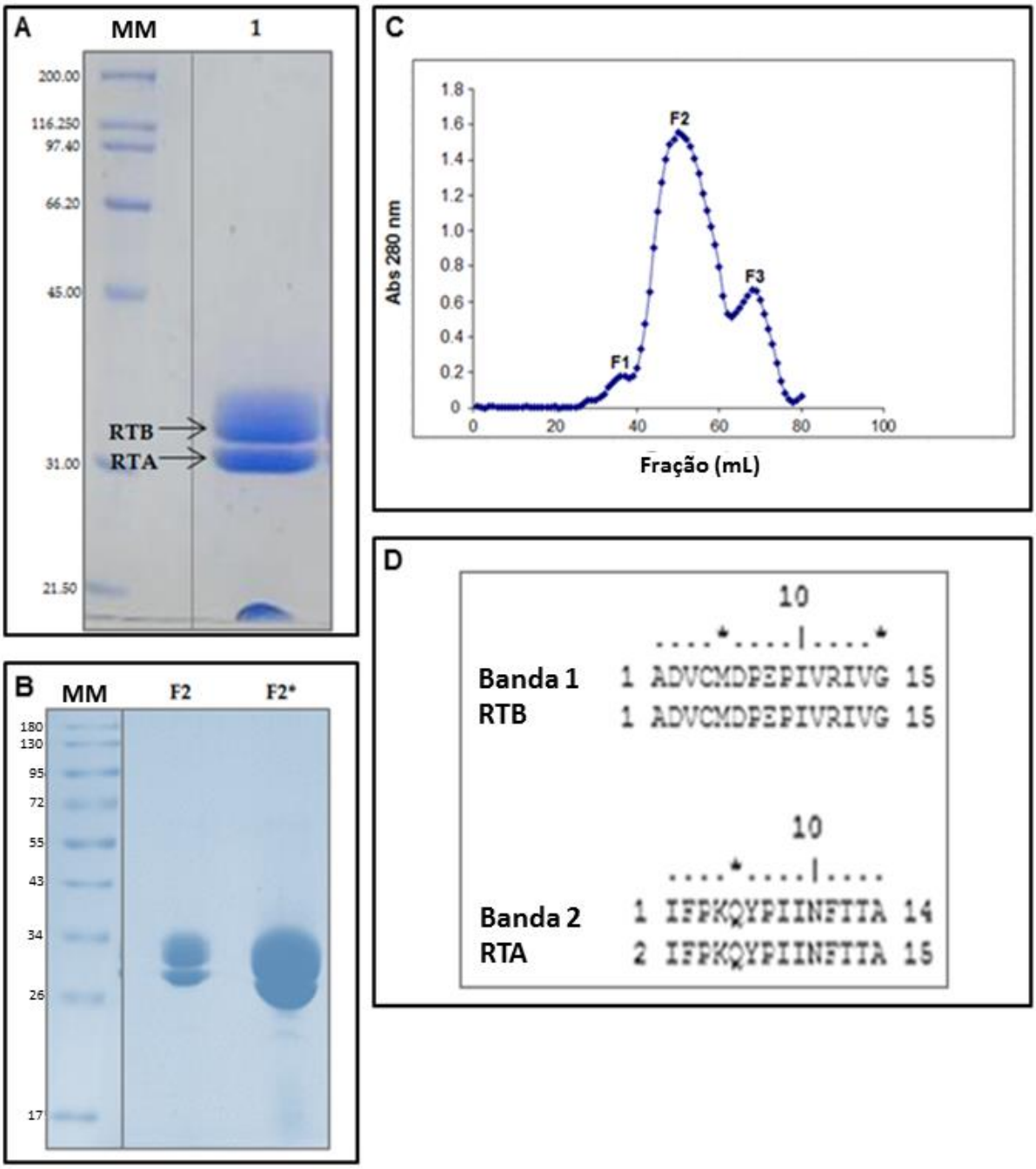

Figura 12 - Isolamento e caracterização da ricina. SDS-PAGE 12% da ricina purificada antes (A) e depois (B) da cromatografia de filtração em gel. Raias: MM - marcador de peso molecular; 1 - ricina purificada; F2 - fração da Sephadex G-75 (10 µg); F2* - fração da Sephadex G-75 (60 µg). Todas as amostras foram tratadas com β-mercaptoetanol e os géis foram corados com Azul de Coomassie. (C) Perfil cromatográfico da ricina parcialmente purificada obtida por cromatografia de filtração em gel em coluna Sephadex G-75. Os picos correspondentes às diferentes frações obtidas estão denominados como F1 = MM > 75 kDa; F2 = 70kDa > MM > 30 kDa; e F3 = peptídeos. (D) Alinhamento, feito através do BLAST, das sequências obtidas a partir da primeira e segunda banda da proteína, com as sequências N-terminal das cadeias A (RTA) e B (RTB) da ricina.

A homogeneidade e a sequência da proteína isolada foram determinadas com o auxílio do espectrômetro de massas. A tabela 3 mostra algumas das sequências de peptídeos obtidas, indicando a correspondência com a cadeia A e B da ricina e, consequentemente, com seu precursor.

Tabela 3 - Sequências de peptídeos obtidas e identificadas através do espectrômetro de massas, e suas respectivas massas moleculares.

Identificação	Massa molecular	Sequência
Preproricin	1638.8342	LSTAIQESNQGAFASPIQLQR
Preproricin	3440.7220	AGNSAYFFHPDNQEDAEAITHLFTDVQNR
Preproricin	1612.8231	SNTDANQLWTLK
Preproricin	1172.5405	VGLPINQR
Ricin A-chain	3307.5039	AGNSAYFFHPDNQEDAEAITHLFTDVQNR
Ricin A-chain	1310.5800	YTFAFGGNYDR
Ricin A-chain	896.5312	VGLPINQR
Ricin A-chain	2415.2739	LSTAIQESNQGAFASPIQLQRR
Ricin A-chain	832.4523	LTTGADVR
Ricin A-chain	3440.7220	ENIELGNGPLEEAISALYYYSTGGTQLPTLAR
Ricin A-chain	2505.2772	QYPIINFTTAGATVQSYTNFIR
Ricin A-chain	1172.5405	FQYIEGEMR
Ricin B-chain	932.4619	NGLCVDVR
Ricin B-chain	1294.5692	DNCLTSDSNIR
Ricin B-chain	1232.6052	ILSCGPASSGQR
Ricin B-chain	1862.0018	NDGTILNLYSGLVLDVR
Ricin B-chain	1390.6961	SNTDANQLWTLK
Ricin B-chain	2231.0952	AEQQWALYADGSIRPQQNR
Ricin B-chain	1546.7972	SNTDANQLWTLKR

Ressaltamos que 100% dos peptídeos identificados por espectrometria de massas corresponderam às proteínas ricina, aglutinina (em regiões 100% idênticas à ricina) e a seus precursores, confirmando a homogeneidade da proteína isolada.

4.2 Análise dos efeitos da citotoxicidade da ricina por microscopia eletrônica de transmissão

A fim de avaliar os danos, a nível ultraestrutural, nas células LLC-MK2 tratadas com ricina, estas foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão. A figura 13 apresenta as células controle (tratadas apenas com PBS pH 7,2 - 48 horas). Nestas células observou-se uma organização celular típica. O citoplasma apresentou-se ultraestruturalmente organizado e com abundância de organelas celulares. Foi possível identificar numerosas mitocôndrias (m), retículo endoplasmático rugoso (ret) e pequenos vacúolos (v).

Os resultados da análise ultraestrutural das células expostas à ricina (1 µg/mL - 48 horas) encontram-se na figura 14. É possível observar que o citoplasma destas células apresentou-se desorganizado e com vacuolização acentuada (cabeça de seta). A ultraestrutura mitocondrial também mostrou alterações significativas. Esta organela apresentou uma matriz vacuolizada e um volume aumentado (seta - inset). O núcleo (N) parece não apresentar alterações, a princípio; o nucléolo (n) encontra-se intacto. Assim, vacuolização citoplasmática e dilatação das mitocôndrias foram as alterações ultraestruturais mais evidentes observadas nas células LLC-MK2 tratadas com ricina, nas condições testadas. Esses resultados sugerem que a ricina induziu estresse oxidativo nas células LLC-MK2.

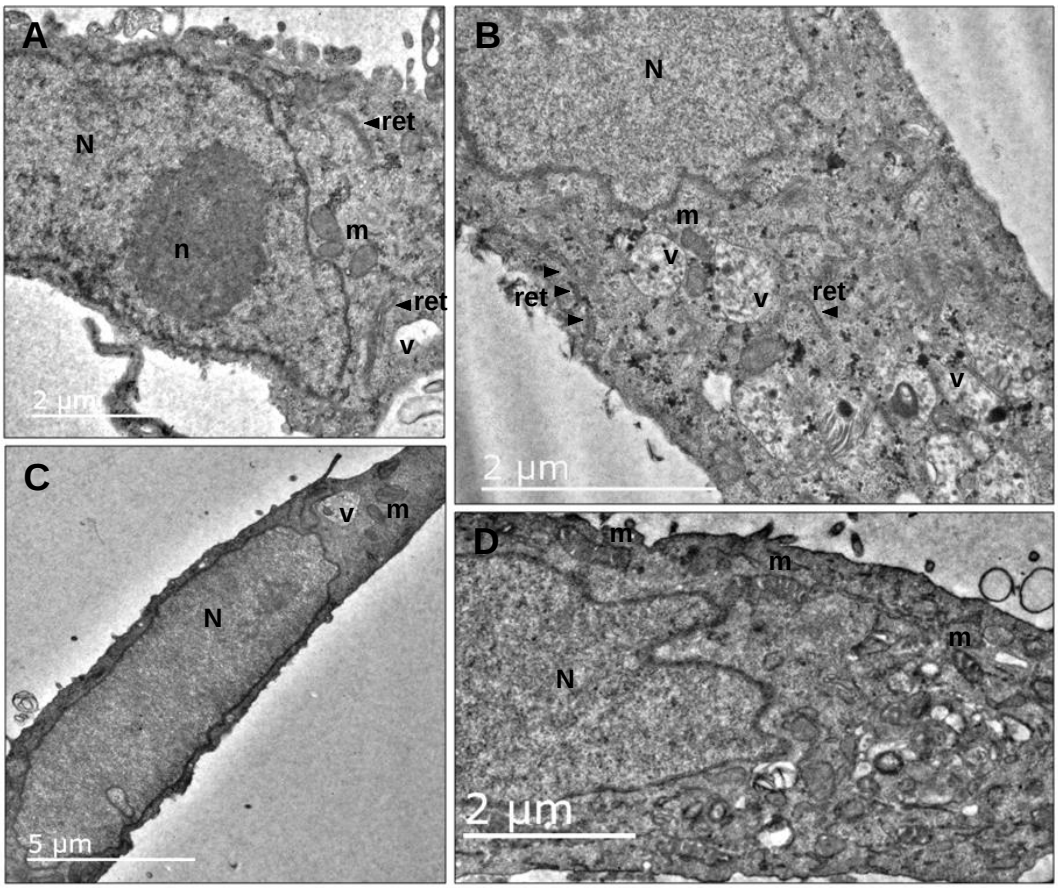

Figura 13 - Ultraestrutura das células LLC-MK2. Microscopia eletrônica de transmissão das células controle (tratadas apenas com PBS, pH 7,2). (A), (B), (C), (D) Observa-se células com uma organização celular normal, onde o citoplasma se apresenta ultraestruturalmente organizado e com várias organelas celulares. É possível observar mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (ret) e vacúolos de tamanhos variados (v). Núcleo (N), nucléolo (n). Barra $_{A,B,D}$: 2 µm. Barra $_{C}$: 5 µm. Todas as células foram contrastadas com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo 0,2%.

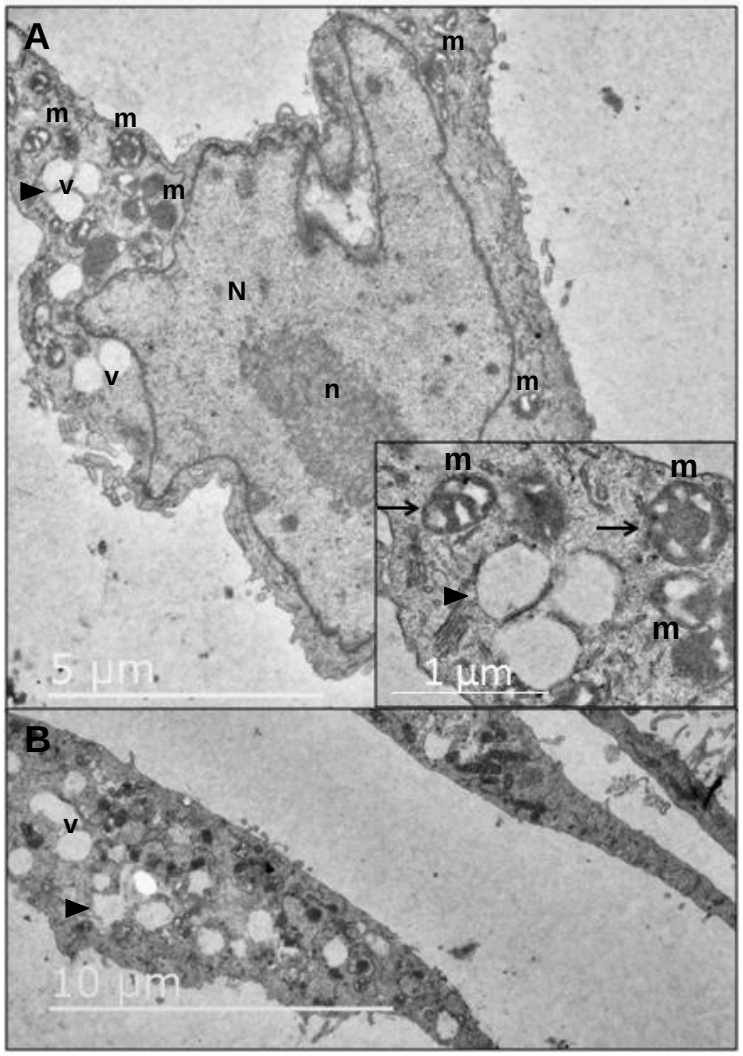

Figura 14 - Efeitos da ricina em células LLC-MK2. Microscopia eletrônica de transmissão de células LLC-MK2 tratadas com ricina (1 µg/mL) por 48 horas. (A) As principais alterações celulares observadas foram a vacuolização do citoplasma (cabeça de seta) e a deformação das mitocôndrias (m), que apresentaram um volume aumentado. N = núcleo, n = nucléolo, v = vacúolo. Barra: 5 µm. No inset é possível observar mais detalhadamente a ultraestrutura mitocondrial alterada (seta), além dos vacúolos (cabeça de seta). Barra $_{inset}$: 1 µm. (B) Célula evidenciando o citoplasma vacuolizado (cabeça de seta - v). Barra: 10 µm. Todas as células foram contrastadas com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo 0,2%.

4.3 Avaliação do armazenamento da torta como possível método de destoxificação

4.3.1 Análise do comportamento da ricina por SDS-PAGE 12%

A eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, sob condições desnaturantes, foi utilizada a fim de detectar possíveis mudanças no teor de ricina nas amostras de tortas armazenadas por diferentes períodos de tempo. A Figura 15 apresenta o perfil proteico das tortas armazenadas em estufa a 37°C, e é possível perceber que somente na torta sem tratamento (tempo = 0 h → raia 1) foi possível visualizar as duas bandas oriundas da molécula de ricina (setas pretas). Nos demais períodos de armazenamentos (24 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias) as bandas correspondentes à holotoxina desapareceram.

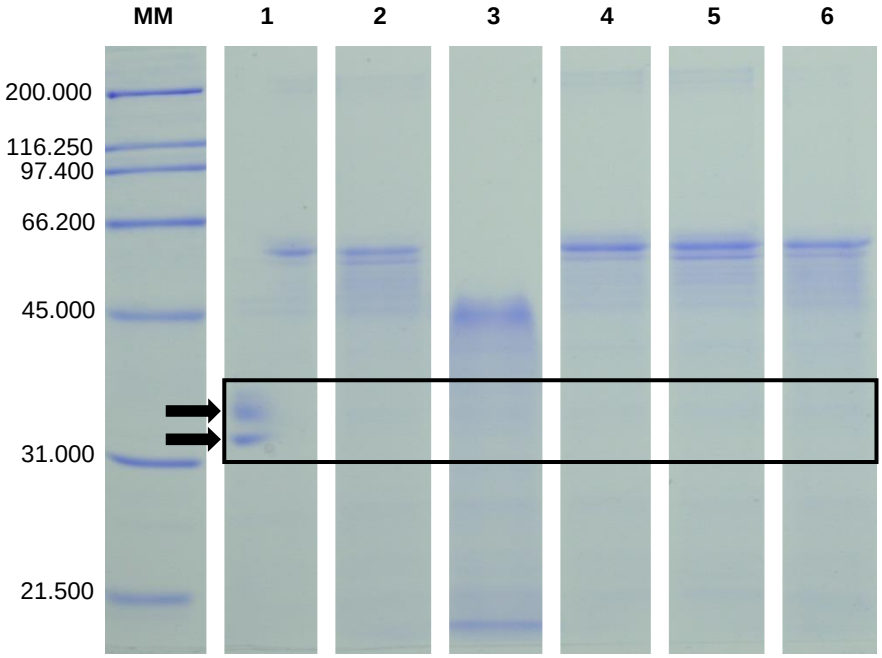

Figura 15 - Análise da ricina por SDS-PAGE nas amostras de torta de mamona. SDS-PAGE 12% do perfil proteico das amostras de torta de mamona armazenadas na estufa (37 º C). Raias: 1 - torta inicial (tempo 0 h); 2 - torta armazenada por 24 horas; 3 - torta armazenada por 7 dias; 4 - torta armazenada por 14 dias; 5 - torta armazenado por 21 dias; 6 - torta armazenada por 28 dias. Em cada poço foram aplicados, aproximadamente, 135 ug de proteínas. Todas as amostras foram tratadas com β-mercaptoetanol e o gel foi corado com Azul de Coomassie. As setas pretas indicam as bandas oriundas da molécula de ricina. MM = marcador de peso molecular (Da).

4.3.2 Detecção de atividade proteolítica na torta de mamona

O resultado anterior, observado no SDS-PAGE, poderia ser explicado pela presença de proteases nas amostras de tortas de mamona. Frente a isso, a presença de atividade proteolítica nas amostras de torta de mamona foi avaliada usando zimografia em gel contendo gelatina; cada raia do gel recebeu a mesma quantidade de proteína (135 µg). Na Figura 16 está apresentado o resultado da zimografia para as tortas armazenadas em estufa (37 ºC) nos tempos de 24 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias (raias 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente), e para a torta sem tratamento (0 h – raia 1). Observa-se a presença de proteases ativas em todos os tempos de armazenamento testados, incluindo no tempo 0 h (torta não armazenada). Contudo, existem três tempos onde a atividade proteolítica foi maior: tempos 0 h, 24 horas e 28 dias (raias 1, 2 e 6, respectivamente). Em conjunto, esses resultados sugerem que as proteases observadas na zimografia podem estar degradando a ricina.

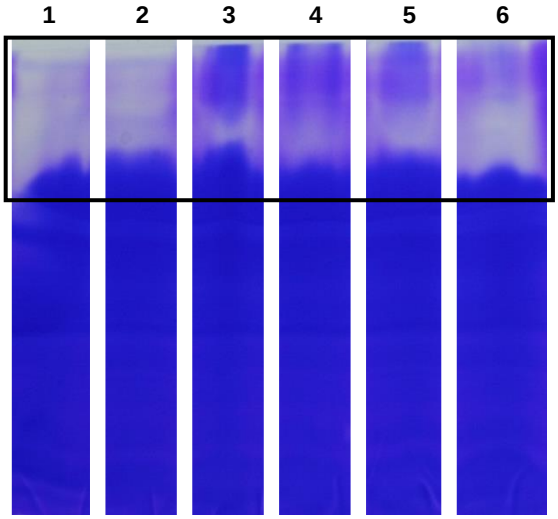

Figura 16 - Zimografia em gel contendo gelatina. Análise da atividade proteolítica presente nas amostras de torta de mamona armazenadas na estufa a 37 ºC (SDS-PAGE 12% copolimerizado com gelatina bovina 0,1%). Raias: 1 - torta inicial (tempo 0 h); 2 - torta armazenada por 24 horas; 3 - torta armazenado por 7 dias; 4 - torta armazenada por 14 dias; 5 - torta armazenada por 21 dias; 6 - torta armazenada por 28 dias. Em cada poço foram aplicados 135 ug de proteínas. A reação se estendeu por 16 horas a 37 ºC incubada em tampão Tris-HCl pH 8,0, sendo o gel posteriormente corado com Azul de Coomassie.

4.3.3 Ensaio de citotoxicidade em cultura de células Vero

Após verificar a ausência da ricina, por SDS-PAGE, nas tortas armazenadas por diferentes períodos (24 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias), foi realizado um pré-teste de citotoxicidade com as amostras de tortas armazenadas por 24 horas e 3 meses (maior tempo de armazenamento testado neste trabalho), e também com a torta sem tratamento (tempo 0 h), como controle positivo. A torta armazenada por 24 horas foi escolhida para o teste biológico porque foi o tempo onde se observou maior atividade proteásica com concomitante desaparecimento da ricina. A citotoxicidade das amostras testadas foi avaliada pela morfologia das células Vero (observação por microscopia óptica). Na figura 17 está apresentada uma micrografia das células não tratadas (apenas com meio de cultura), onde é possível observar que as células seguiram o padrão de crescimento normal, sem alterações morfológicas.

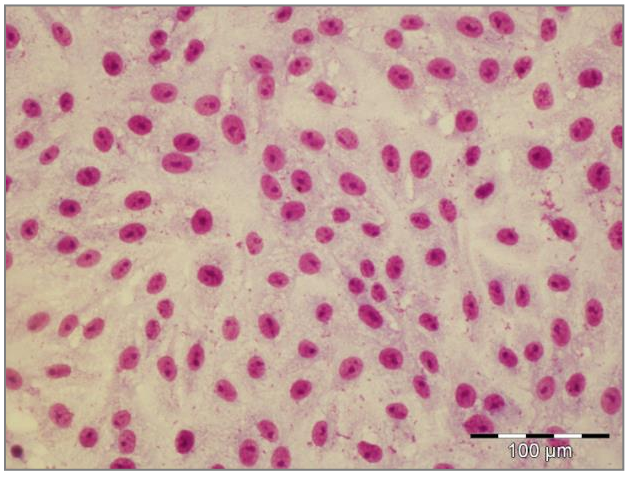

Figura 17 - Microscopia óptica de cultura de células Vero. As células foram crescidas em meio DMEM + 5% de soro fetal bovino. Esse experimento foi feito com troca de meio em 24 horas de incubação. Barra: 100 µm.

Já as células incubadas com os extratos proteicos oriundos das tortas de mamona, que foram submetidas a diferentes tempos de armazenamento, verificou-se uma drástica redução no número de células aderidas para os tempos dois (24 horas e 3 meses) e concentrações testadas (10 ng/mL, 100 ng/mL e 1 µg/mL) (figura 18). Esses resultados indicam que a ricina não apareceu no SDS-PAGE, possivelmente, por estar em menor concentração nas amostras de tortas armazenadas, mas essa possível redução no teor da

toxina não foi suficiente para destoxificar a torta. Nem mesmo o tempo de armazenamento máximo testado (3 meses) foi eficiente para destoxificar a torta de mamona (figura 15 – imagens 7, 8 e 9). Além disso, esse resultado também sugere que as proteases que foram detectadas na zimografia na presença de gelatina (figura 16) não agiram sobre a ricina (não a degradaram), sendo, portanto, ineficientes para destoxificar a torta.

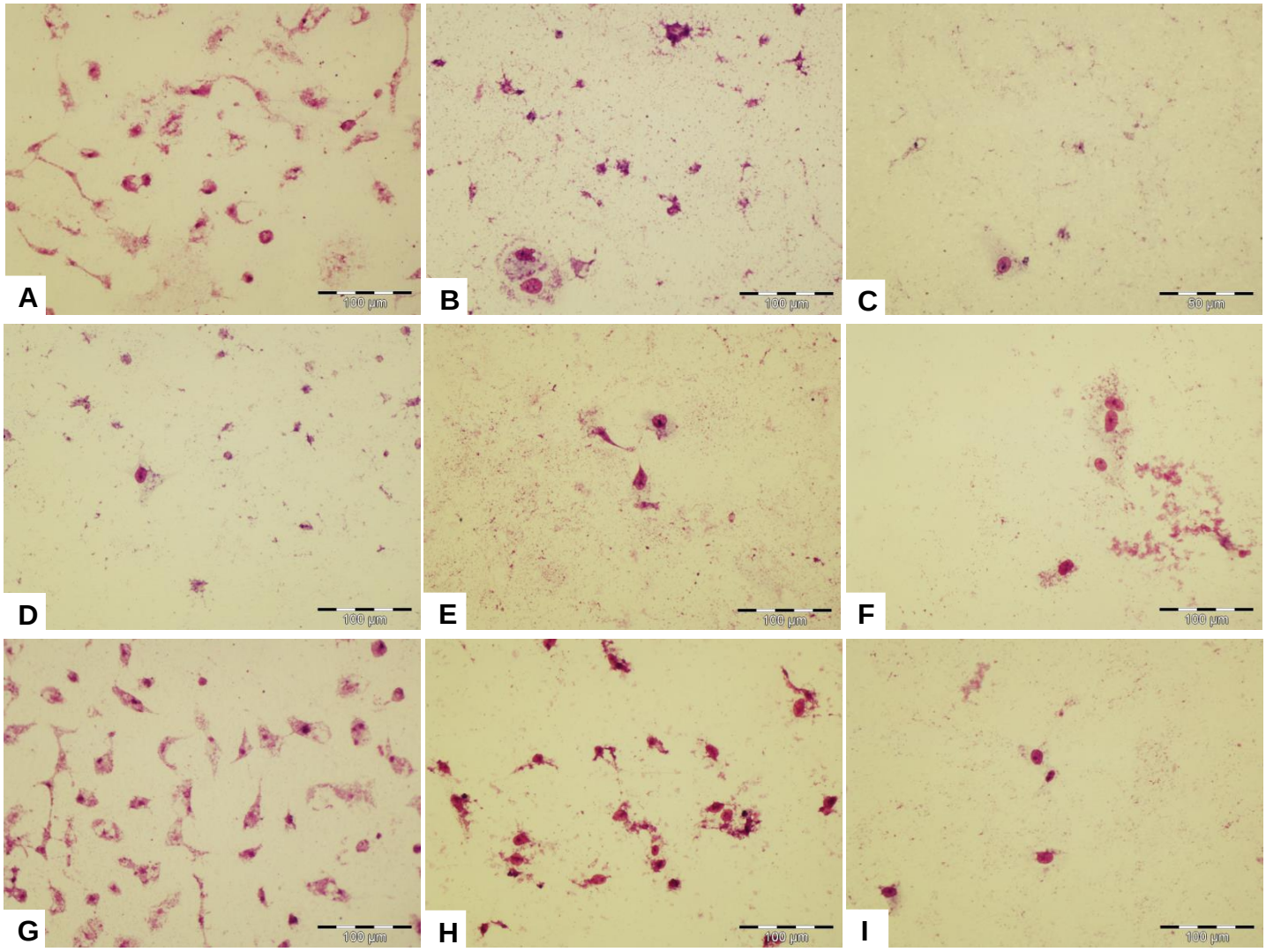

Figura 18 - Teste de citotoxicidade. Microscopia óptica de culturas de células Vero incubadas com as tortas de mamona armazenadas por diferentes tempos (0 h, 24 horas e 3 meses). A,B,C: Células incubadas com a torta de mamona sem o tratamento (tempo 0 h) e com diferentes concentrações de ricina (imagem 1: 10 ng/mL; imagem 2: 100 ng/mL e imagem 3: 1 µg/mL). D,E,F: Células incubadas com a torta armazenada por 24 horas e com diferentes concentrações de ricina (imagem 4: 10 ng/mL; imagem 5: 100 ng/mL e imagem 6: 1 µg/mL). G,H,I: Células incubadas com a torta armazenada por 3 meses e com diferentes concentrações de ricina (imagem 7: 10 ng/mL; imagem 8: 100 ng/mL e imagem 9: 1 µg/mL). Barra: 100 µm.

4.4 Avaliação do uso de CaO como método de destoxificação

O tratamento da ricina com CaO foi realizado com a finalidade de inativar a atividade citotóxica da ricina.

4.4.1 Análise do efeito do CaO sobre a ricina purificada por SDS-PAGE

Inicialmente, para verificar se houve modificação na estrutura da ricina após o tratamento com CaO, foi realizada uma análise da proteína por SDS-PAGE 12%. Na figura 19A é possível observar que as bandas correspondentes à molécula de ricina desapareceram após o tratamento com CaO (seta - raia 1). Entretanto, embora a ricina não seja detectada no gel após o tratamento, nenhuma outra banda também foi detectada. Este resultado levantou duas hipóteses: na primeira, o tratamento empregado teria impedido a entrada da amostra no gel, e na segunda, o tratamento poderia ter levado à formação de peptídeos que teriam sido excluídos do gel. Assim, foi avaliado o pH da amostra tratada e incubada com o tampão de desnaturação/redução (tris HCl, pH 6,8, contendo SDS e β-mercaptoetanol). Apesar da adição do tampão, o pH desta solução foi de ~13. A amostra foi, então, acidificada, atingindo o pH ~ 6 e foi novamente analisada por SDS-PAGE 15%. A figura 19B mostra inúmeras bandas no gel (raia 2), correspondentes à amostra de ricina tratada com CaO e com o pH ajustado; nota-se a predominância de peptídeos com massa molecular menor que 8 kDa.

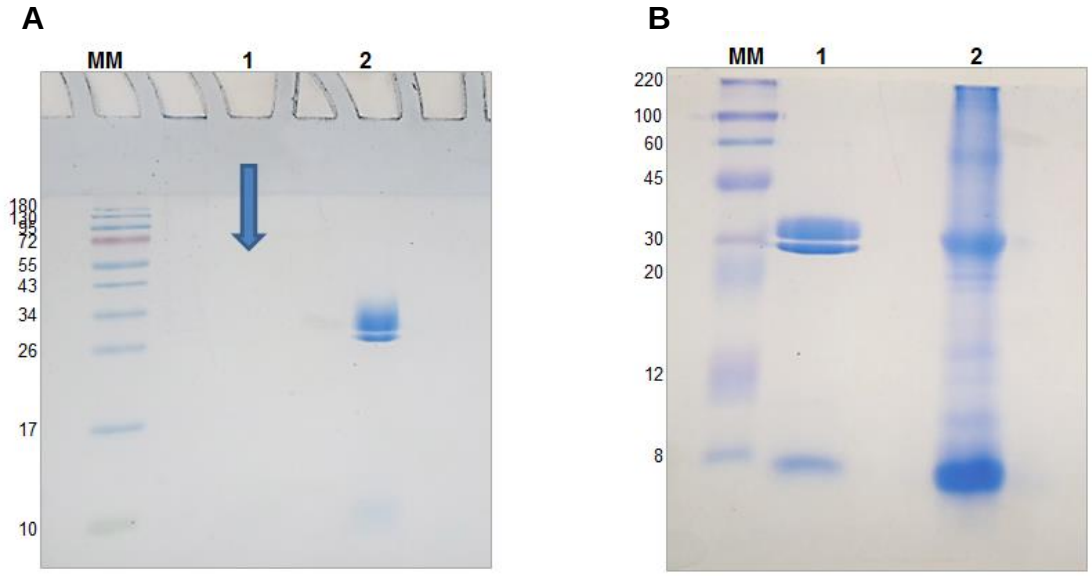

Figura 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da ricina tratada com CaO. (A) SDS-PAGE 12% carregado com a amostra tratada sem o ajuste do pH. Não é mais possível observar a holotoxina após o tratamento (seta - raia 1). Raias: MM - Marcador (kDa); 1 - ricina tratada com CaO; 2 - ricina. (B) SDS-PAGE 15% carregado com a amostra tratada que teve seu pH ajustado para próximo de 6. Raias: MM - Marcador (kDa); 1 - ricina; 2 - ricina tratada com CaO. Todas as amostras foram tratadas com β-mercaptoetanol e os géis foram corados com Azul de Coomassie.

4.4.2 Ensaio de citotoxicidade após tratamento da ricina com CaO

Para avaliar a eficiência da inativação da toxicidade da ricina pelo tratamento com CaO, células LLC-MK2 foram incubadas tanto com a ricina pura (na concentração de 1 µg/mL – controle positivo) quanto com a ricina tratada (na mesma concentração). A Figura 20 mostra as células crescidas na presença de PBS pH 7,2 (controle negativo), de ricina tratada com CaO e de ricina sem tratamento (imagens A, B e C, respectivamente). Encolhimento celular e aumento dos espaços intercelulares podem ser vistos nas culturas de células tratadas com ricina (figura 20C). Contudo, as células LLC-MK2 incubadas com a ricina tratada com CaO apresentaram crescimento similar às células controles (figura 20A, B). Como pode ser observado na figura 20B, as células incubadas com a ricina tratada mantiveram uma monocamada intacta e uma morfologia normal. A figura 20D mostra que o número de células LLC-MK2 vivas diminuiu consideravelmente quando foram incubadas com ricina por 48 horas. A concentração de células

diminuiu aproximadamente 80%, deixando somente poucas células ainda aderidas ao substrato. Esses resultados confirmam a eficácia deste tratamento químico na inativação da ricina; as células LLC-MK2 proliferaram normalmente quando expostas a ricina tratada com CaO.

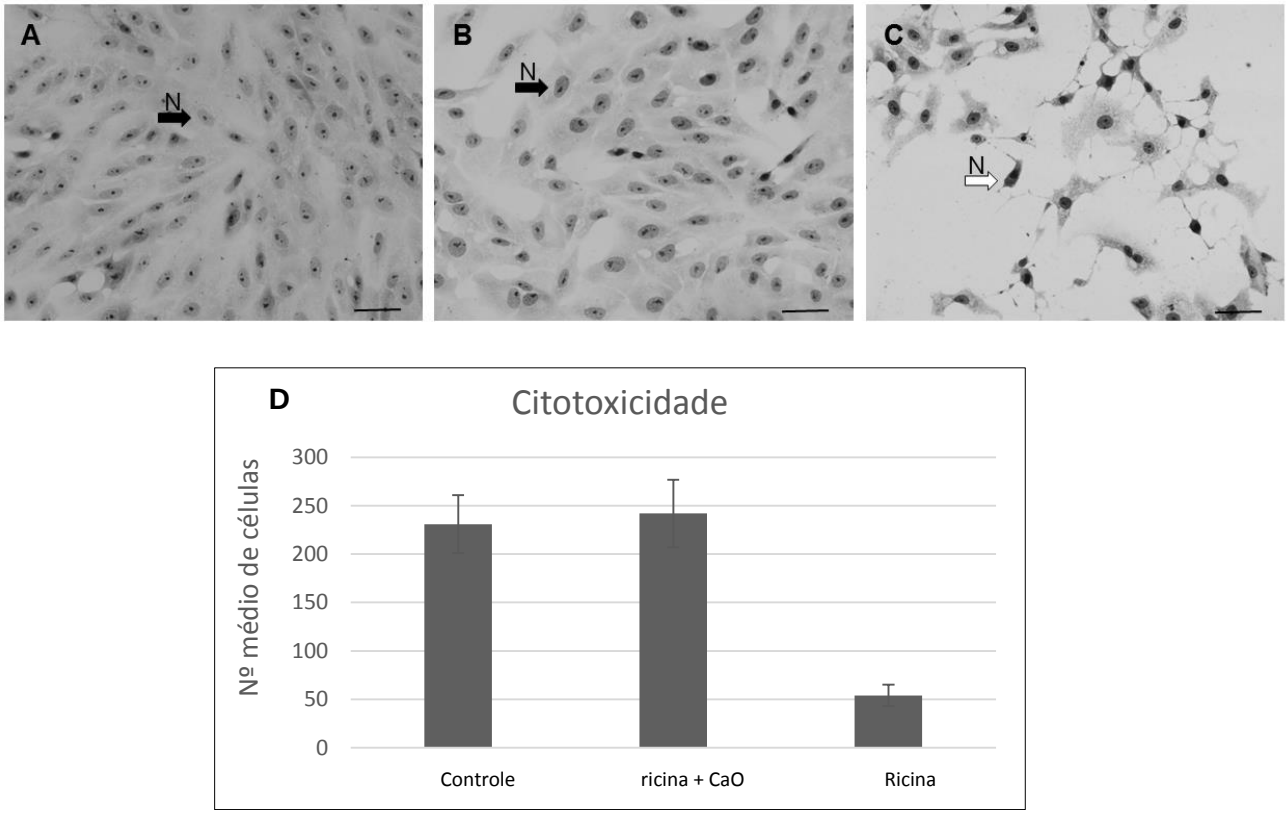

Figura 20 - Citotoxicidade da ricina e tratamento com CaO. Micrografias das culturas de células 48 horas após o tratamento com (A) PBS (controle, pH 7,2), (B) ricina tratada com CaO e (C) ricina. As células LLC-MK2 incubadas com a ricina tratada proliferaram normalmente, similarmente às células controles. Já as células tratadas com a ricina não se apresentaram uniformemente distribuídas em uma monocamada compacta. N = núcleo; barra = 100 µm. (D) Avaliação da citotoxicidade feita pela contagem das células em microscópio óptico após 48 horas.

4.4.3 Análise do efeito do CaO sobre a ricina por cromatografia de filtração em gel

Para avaliar a possível formação de peptídeos pela degradação da ricina e corroborar os resultados apresentados no gel SDS-PAGE 15% (figura 19B), a proteína sem e com tratamento com CaO foi aplicada em coluna contendo Sephadex G-75. A figura 21 mostra a diferença entre o

perfil cromatográfico da ricina sem tratamento (▪) e da ricina tratada com CaO (♦). A ricina não tratada mostrou uma única fração (pico F1) identificada como a fração contendo ricina. Em contraste, a ricina tratada com CaO mostrou duas frações (picos F1* e F2*) identificados como as frações contendo traços de ricina (F1*) e peptídeos (F2*), os quais foram, possivelmente, gerados pela degradação da ricina. Assim, comparando ambos os perfis cromatográficos, observa-se que a fração correspondente a ricina teve uma redução significativa na amostra tratada com CaO (F1*), com concomitante acumulação de peptídeos de baixo peso molecular. Estes peptídeos podem ser produtos da degradação da ricina. Além disso, a proteína remanescente pode, inclusive, ter sido desnaturada pelo meio alcalino gerado pelo tratamento com CaO.

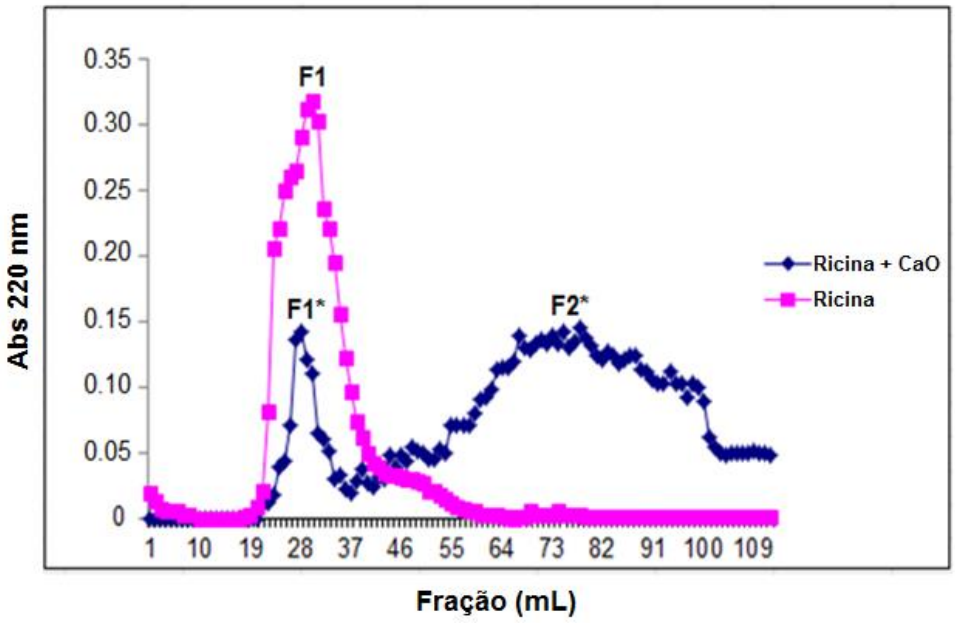

Figura 21 - Cromatografia de filtração em gel. Perfis de eluição da ricina sem (▪) e com tratamento com CaO (♦). As amostras foram aplicadas em coluna (50,0 x 1,0 cm) contendo Sephadex G-75 e aluídas com TFA 0,1% em uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. As frações foram lidas a 220 nm.

4.4.4 Análise das sequências dos peptídeos gerados pelo tratamento da ricina com CaO por espectrometria de massas

A análise proteômica mostrou que a ricina tratada com CaO foi degradada em sítios de clivagem preferenciais, gerando peptídeos com pesos moleculares variados. A análise das sequências geradas (figura 22) indicou que a cadeia peptídica foi clivada, preferencialmente, em resíduos de asparagina (“N”), com 25 sítios de clivagem, seguida dos resíduos de serina (“S”), com 11 sítios de clivagem, e glutamina (“Q”), treonina (“T”) e glicina (“G”) com 5 sítios de clivagem. Outros sítios de clivagem também foram observados, apesar de aparecerem em uma proporção menor, como em resíduos de arginina (“R”), lisina (“K”) e isoleucina (“I”), todos com 2 sítios de clivagem. As sequências e os pesos moleculares dos principais peptídeos identificados estão representados na tabela 4.

Na figura 22 é possível observar a localização dos peptídeos identificados por espectrometria de massas nas sequências das cadeias A e B da ricina. As letras em destaques indicam os resíduos C-terminais de cada peptídeo gerado, indicando os sítios de clivagem observados pelo tratamento com CaO.

Ricin A Chain

36IFPKQYPIINFTTAGATVQSYTNFIRAVRGRLTTGADVRHEIPVLPNRVGLPINQRFILV
ELSNHAELSVTLALDVTNAYVVGYRAGNSAYFFHPDNQEDAEAITHLFTDVQNRYTFAFGGN
YDRLEQLAGNLRENIELGNGPLEEAISALYYYSTGGTQLPTLARSFIICIQMISEAARFQYIEG
EMRTRIRYNRRSAPDPSVITLENSWGRLSTAIQESNQGAFASPIQLQRRNGSKFSVYDVSILIP
IIALMVYRCAPPPSSQFS 302

Ricin B Chain

315ADVCMDPEPIVRIVGRNGLCVDVRDGRFHNGNAIQLWPCKSNTDANQLWTLKRDNTIR
SNGKCLTTYGYSPGVYVMIYDCNTAATDATRWQIWDNGTIINPRSSLVLAATSGNSGTTLTV
QTNIYAVSQGWLPTNNTQPFVTTIVGLYGLCLQANSGQVWIEDCSSEKAEQQWALYADGSIRP
QQNRDNCLTSDSNIRETVVKILSCGPASGQRWMFKNDGTILNLYSGLVLDVRASDPSLKQ
IILYPLHGDPNQIWLPLF 576

Figura 22 - Análise estrutural da ricina por espectrometria de massas. Precursor da ricina (UniProtKB: locus RICI_RICCO ACCESSION P02879). Os resíduos 36-302 constituem a cadeia A da ricina e os resíduos 315-576 constituem a cadeia B da ricina. Os peptídeos marcados em preto foram identificados pelo espectrômetro de massas depois do tratamento com CaO, e os peptídeos em vermelho não foram identificados. Sequencia sinal (resíduos 1-35) e o peptídeo ativo processado (resíduos 303-314) não foram mostrados.

Tabela 4 - Principais peptídeos obtidos e identificados após o tratamento da ricina com CaO, e suas respectivas massas moleculares.

SEQUÊNCIA DO PEPTÍDEO	MM (Da)
PASSGQRWMFK**N**	1408,7
SNTDANQLWTLKRDN	1775,9
DVQNRYTFAFGGNYDRLEQLAGN	2648,3
VQTNIYAVSQGWLPTNN	1904,9
ALDVTNAYVVGYRAGN	1682,8
LFTDVQNRYTFAFGGN	1849,9
RHEIPVLPNRVGLPINQRFILVELSNHAELSVTLALDVTN	4487,5
NQLWTLKRDNTIRSN	1859.1
VGRNGLCVDVRDGRFHN	1914.1
IRPQQNRDNCLTSDSN	1860.9
SGNSGTTLTVQTNIYAVSQGWLPTNN	2723.9
YIEGEMRTRIRYN	1700.9
TFAFGGNYDRLEQLAGN	1872,8
TLARSFIICIQMISEAARFQYIEGEMRTRIRYNRRSAPDPSVITLEN	5518.3
SAYFFHPDNQEDAEAITHLFTDVQN	2910.1
FIRAVRGRLTTGADVRHEIPVLPN	2957,6
TDANQLWTLKRDNTIRSN	1945,0
SWGRLSTAIQESN	1448.5
GKCLTTYGYSPGVYVMIYDCN	2347.7
SWGRLSTAIQESNQGAFASPIQLQRRN	3016.3
IFPK**Q**	631.7
YPIINFTTAGATVQ	1332,7
DVQNRYTFAFGGNYDRLEQ	2178,0
LCLQANSGQVWIEDCSSEKAEQ	2438,1
NIRETVVKILSCGPASSGQ	1959,0
CLTSDSNIRETVVKILSC**G**	2038,0
LRENIELGNGPLEEAISALYYYSTGG	2560,2
IRETVVKILSCGPASSGQRWMFKNDG	2766,3
NHAELSVTLALDVTNAYVVGYRAG	2620,3
FTTAGATVQSYTNFIRAVRG	2160.4
GSKFSVYDV**S**	1088.2
ALMVYRCAPPPSSQFS	1753,8
RDNCLTSDSNIRETVVKILSCGPASS	2765,3
DANQLWTLKRDNTIRS	1931,0
AATDATRWQIWDNGTIINPRSS	2473,2
GSKFSVYDVS	1088.2

5. DISCUSSÃO

A ricina é classificada como uma RIP desde a década de 70 (HARTLEY E LORD, 2004), no entanto, os estudos para elucidar o mecanismo pelo qual essa toxina induz a morte celular ainda estão em andamento (TYAGI et al., 2015). Neste trabalho, inicialmente, buscamos entender qual o mecanismo de morte celular induzido pela ricina, uma vez que a citotoxicidade dessa holotoxina parece não ser exclusivamente devido à inibição da síntese proteica (PING LI et al., 2007). Esses autores utilizaram leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) para isolar mutantes da RTA não-tóxicos (incapacidade para matar as leveduras). Foram observados marcadores apoptóticos (tais como a condensação da cromatina, a fragmentação nuclear e a produção de espécies reativas de oxigênio) em leveduras que expressaram a RTA do tipo selvagem, além da inibição da síntese proteica, mas esses mesmos marcadores não foram observados nas células que expressaram os mutantes não-tóxicos, apesar destes terem depurinado ribossomos e inibido a tradução. Estes resultados fornecem evidências de que a inibição da síntese proteica não está sempre correlacionada com a citotoxicidade da ricina. De acordo com BAGARIA E KARANDE (2014), ainda não está claro se a inibição da síntese proteica leva à apoptose ou se estes dois eventos são independentes. Foi especulado que diferentes regiões da cadeia A podem ser responsáveis pela inibição da síntese proteica e apoptose (SHIH et al., 2001; BALUNA et al., 2000); e que a cadeia B, por si só, possui efeitos citotóxicos, sendo capaz de induzir apoptose (HASEGAWA et al., 2000). Nossos resultados preliminares mostraram, por microscopia eletrônica de transmissão, que as células LLC-MK2 tratadas com ricina (1 µg/mL por 48 horas) apresentaram duas características marcantes: vacuolização do citoplasma e alterações da ultraestrutura mitocondrial, o que pode indicar, em um primeiro momento, indução de estresse oxidativo pela ricina. KUMAR et al. (2003) observaram que a administração de ricina (25 mg/kg) em camundongos albinos suíços produziu estresse oxidativo, levando à perturbação do sistema de enzimas antioxidantes, além de outros efeitos nocivos, tais como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Em 2005, RAO et al. mostraram que a apoptose induzida pela ricina, em células HeLa, estava associada com o estresse oxidativo

(geração de espécies reativas de oxigênio) e ativação da cascata de caspase-3, seguidos por eventos que levam à morte celular por apoptose. De acordo com esses autores, a ricina aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio. Segundo OTT et al. (2007), a cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte de geração de espécies reativas de oxigênio intracelular e, ao mesmo tempo, um importante alvo dos efeitos danosos destas. Além disso, a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio parece ser parte integrante não só da morte celular apoptótica, mas também da necrótica. Assim, acreditamos que as alterações mitocondriais observadas nesse trabalho foram devido ao estresse oxidativo induzido pela exposição das células à ricina, e que essas modificações podem corresponder a um estágio inicial da toxicidade da ricina, podendo avançar para apoptose ou até mesmo para necrose celular. A apoptose envolve duas vias principais: uma delas é conhecida como via extrínseca ou mediada por receptor, a qual envolve a caspase 8 ou 10 (caspases iniciadoras), e a outra é conhecida como via intrínseca ou mitocondrial, a qual é ativada por estresse celular e envolve a caspase 9 (iniciadora). Essas caspases (tanto as da via extrínseca quanto da intrínseca) iniciam a ativação das caspase-3 e caspase-7 efetoras e estas conduzem à apoptose (FIANDALO E KYPRIANOU, 2012). Segundo TYAGI et al. (2015), a ricina está envolvida, principalmente, na indução de apoptose através da via intrínseca ou mitocondrial. Os resultados obtidos até o momento, neste trabalho, ainda são inconclusivos, sendo necessários mais estudos para esclarecer qual o mecanismo, ou mecanismos, de morte celular induzida pela ricina.

Na busca de processos de destoxificação efetivos e econômicos para agregar valor à torta de mamona, avaliamos a eficiência do armazenamento como método de inativar a ricina. Em 2009, CRESPO NETO descreveu o armazenamento como um processo viável para destoxificação. Esse autor mostrou a atividade constitutiva de duas metaloproteases que apresentaram suas atividades aumentadas nos períodos de 3 e 4 meses de armazenamento (estufa). Foi observado que a atividade proteolítica aumentou com o tempo de armazenamento; concomitantemente ao aumento da atividade proteolítica, as bandas oriundas da ricina desapareceram. Os resultados apresentados nesse trabalho sugerem que o processo de

esmagamento da semente para a extração do óleo (agressão abiótica) tornem as proteases presentes nas sementes aptas a disparar a degradação de proteínas de reserva, entre elas a ricina. Assim, uma forma eficaz e economicamente viável para destoxificar a torta de mamona foi proposta. Contudo, este autor não realizou nenhum teste biológico para confirmar a inativação da ricina nas tortas armazenadas. No presente trabalho, realizamos um processamento similar ao realizado por CRESPO NETO (2009). Observamos atividade proteolítica nas tortas armazenadas por diferentes períodos com concomitante desaparecimento da ricina, semelhante ao descrito por CRESPO NETO (2009). Adicionalmente, para confirmar a destoxificação da torta de mamona, foi realizado um teste biológico utilizando células Vero, e foi observado que as tortas armazenadas por 24 horas e por 3 meses (maior tempo de armazenamento testado neste trabalho) não perderam sua toxicidade (a ricina continuou ativa), matando as células em todas as concentrações testadas (10 ng/mL, 100 ng/mL e 1 µm/mL). Dessa forma, concluiu-se que a metodologia em questão não é eficaz para a destoxificação da torta de mamona. Nossos experimentos ressaltam, portanto, a importância da realização de ensaios de citotoxicidade (FERNANDES, 2010) para confirmar a inativação da ricina, uma vez que um dos métodos considerados eficientes para avaliar a destoxificação (análise da presença de bandas de ricina por SDS-PAGE), proposto por ANANDAN et al. (2005), não pode ser validado para atestar a inativação da toxina. Assim, como um dos objetivos deste trabalho era avaliar o(s) mecanismo(s) de destoxificação por armazenamento, e nas condições realizadas isto não foi possível, não se justificou caracterizar a(s) protease(s) presente(s) na semente e nem desenvolver as demais etapas relacionadas a esse processo.

Vários métodos de destoxificação já foram desenvolvidos na tentativa de inativar a ricina presente na torta de mamona, e algumas técnicas já foram descritas como promissoras, como mostrado no trabalho de FERNANDES et al. (2012). Esses autores utilizaram compostos de cálcio, tais como o CaO e o $Ca(OH)_2$, para inativar a ricina presente na torta de mamona, e foi observado que tal tratamento eliminou completamente a atividade citotóxica dessa proteína. A eficiência do tratamento foi confirmada

por teste biológico (utilizando culturas de células Vero), tendo-se obtido, portanto, um produto livre de toxicidade. Outros autores (ANANDAN et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007; BARNES et al., 2009) também descreveram como eficiente a inativação da ricina pelo CaO e $Ca(OH)_2$.

Além da eficácia na inativação da ricina, tem-se buscado técnicas que também sejam economicamente viáveis, em escala industrial, visto que toneladas de coprodutos (torta e farelo) de mamona são geradas pela extração do óleo anualmente. A escolha pelo tratamento com o CaO parece ser uma boa alternativa, uma vez que esse composto está disponível a um baixo custo (20 kg de CaO - R$ 33,90 [http://www.lafan.com.br]); é uma técnica operacionalmente simples, e com grande viabilidade econômica; apresenta a vantagem de minimizar os riscos de acidentes de trabalho devido ao menor poder alcalinizante do CaO (quando comparado com outros compostos de cálcio, tal como o $Ca(OH)_2$); e tem a capacidade de melhorar a qualidade de alguns alimentos, estando entre os principais aditivos minerais utilizados na preparação da alimentação de vários grupos de animais (OLIVEIRA et al., 2007; SILVA et al., 2015).

Vários trabalhos já foram realizados utilizando o CaO para a destoxificação de coprodutos de mamona e, posteriormente, incluindo-os na alimentação animal. Em 2011, BARROS et al. utilizaram farelo de mamona tratado com CaO, nas proporções de 33, 67 e 100%, para substituir o farelo de soja (alto custo) para alimentar bovinos, e concluíram que os animais não apresentaram problemas em relação à substituição dos farelos em qualquer proporção da substituição utilizada. COBIANCHI et al. (2012) utilizaram o farelo de mamona tratado com CaO para substituir (0; 0,33; 0,67 e 1,00 kg/kg) o farelo de soja nas rações dadas a vacas leiteiras. Além da avaliação em relação ao desempenho produtivo e eficiência da utilização de nutrientes pelos animais, também foram analisadas as enzimas hepáticas. Concluiu-se que o farelo tratado pode substituir até um terço da farinha de soja (inclusão de 50 g/kg) em dietas para vacas leiteiras com produção de 20 kg de leite/dia, sem afetar o consumo dos componentes digestíveis da dieta e o desempenho produtivo animal. ALMAGRO, em 2013, testou rações contendo 7, 14, 21 ou 28% de torta de mamona tratada com 8% de óxido de cálcio para alimentar lambaris (*Astyanax bimaculatus*). Foi realizado o pré-

teste, seguido de validação em viveiros, no qual, após 70 dias, alguns animais foram retirados para determinações gravimétricas (peso e tamanho), dosagens das enzimas transaminases (TGP e TGO e creatino quinase), além da análise morfológica de tecidos hepático, adiposo e intestinal. Foi observado que os alevinos alimentados com rações contendo torta de mamona cresceram de forma similar aos alevinos alimentados com ração padrão (controle), atingindo tamanho e pesos adequados para o abate após 70 dias. Observou-se também que não houve alterações nos valores das enzimas investigadas e nem no aspecto dos tecidos hepáticos, adiposo e intestinais. Esses resultados indicam que a torta de mamona destoxificada pode ser incluída na alimentação de lambaris sem prejuízo para o seu cultivo em sistema semi-intensivo de produção. Já BUENO et al. (2014) avaliaram o efeito da inclusão da torta de mamona destoxificada (em diferentes concentrações) na ração dada as galinhas poedeiras comerciais, e concluíram que a torta destoxificada pode ser incluída na ração desses animais em até 5,7% para otimizar o desempenho e não alterar a qualidade interna e externa dos ovos. Dessa forma, o uso do CaO como tratamento para inativar a ricina presente nos coprodutos de mamona, e sua posterior utilização na alimentação animal, parece ser uma alternativa interessante, mas ainda carece de estudos sobre viabilidade operacional e econômica em escala industrial.

Além da inativação da ricina, DEUS DE OLIVEIRA (2009) demonstrou que o CaO também modifica os principais alérgenos presentes na torta de mamona, tornando-a não alergênica. Deste modo, o tratamento com CaO também permite uma manipulação mais segura da torta por parte dos trabalhadores rurais que usam esse co-produto como fertilizante, bem como para os trabalhadores das usinas de processamento da semente.

Apesar de ter sido mostrado a eficácia do tratamento com compostos de cálcio para inativar a alergenicidade e a citotoxicidade da torta de mamona, ainda não consta na literatura nenhum trabalho que tenha utilizado a holotoxina purificada com o intuito de elucidar o mecanismo pelo qual ocorre a sua inativação. Assim, outro objetivo deste trabalho foi elucidar o mecanismo pelo qual o CaO inativa a ricina. Para isso, a holotoxina foi isolada e incubada com uma solução de CaO. A eficácia do tratamento foi

avaliada por teste biológico, utilizando culturas de células LLC-MK2. Foi observado que as células incubadas com a ricina tratada proliferaram normalmente, ratificando a eficiência do uso do CaO na inativação dessa toxina. Para determinar o mecanismo pelo qual a atividade tóxica da ricina foi inativada, realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), cromatografia de filtração em gel e espectrometria de massas. Inicialmente, verificamos que a solução de CaO utilizada para tratar a ricina apresentou um valor de pH superior a 12. Os resultados do SDS-PAGE e da cromatografia indicaram a formação de produtos de baixo peso molecular, sugerindo que a ricina foi degradada, gerando peptídeos. Pela espectrometria de massas, foram identificados peptídeos, de várias massas moleculares, e os respectivos sítios de clivagem. As ligações peptídicas foram clivadas, preferencialmente, em resíduos de asparagina, mas também ocorreram clivagens em resíduos de glutamina, glicina e serina em menor proporção. Esses achados são, possivelmente, devido à desamidação, um processo de degradação proteica espontâneo (não-enzimático) que ocorre principalmente em resíduos de asparagina (mas que também pode ocorrer em resíduos de glutamina). Resíduos de asparagina, em meio alcalino, podem se “ciclizar”, produzindo um intermediário chamado de succinimida (um anel com cinco membros). Estes resíduos são instáveis devido à desamidação da cadeia lateral amida, o que pode facilitar a clivagem da ligação peptídica neste ponto. A desamidação das cadeias laterais amidas dos resíduos de asparagina e glutamina é um dos modos de degradação mais fáceis e comuns de aminoácidos (DANIEL et al., 1996). Além disso, o mecanismo de desamidação em proteínas é pH-dependente: quanto maior o pH, maior a taxa de desamidação devido a uma maior desprotonação do nitrogênio da ligação peptídica, favorecendo sua clivagem (CAPASSO et al., 1997; www.ionsource.com). Assim, o pH alcalino da solução de CaO utilizado nesse trabalho provavelmente favoreceu, além da desnaturação da proteína, um aumento da taxa de formação de succinimida e, consequentemente, da clivagem das ligações peptídicas.

O pH da solução de CaO utilizada nesse trabalho foi acima de 12, o que parece ser determinante para a degradação da proteína. FERNANDES (2014), em sua tese, investigou se o íon cálcio era necessário para a

inativação da ricina ou se o elevado pH da solução de CaO (~12,4) era o responsável pela perda desnaturação da holotoxina. Para isso, o autor realizou um ensaio utilizando ácido etileno tetracético glicol (EGTA) como agente “quelante”, com o intuito de capturar o Ca^{2+} das soluções de CaO (que estavam em uma concentração eficiente para inativar a toxina). Foi observado que as células incubadas com a ricina tratada nessa condição (solução de CaO + EGTA) morreram, o que mostrou, em um primeiro momento, que o Ca^{2+} poderia ser essencial para a inativação da ricina. Contudo, a adição de EGTA na solução de CaO levou à diminuição do pH. Frente a isso, foram utilizados tampões em diferentes faixas de pH para tratar a ricina e, então, avaliou-se a sua citotoxicidade. Em pH 12 a toxina teve sua toxicidade reduzida; entretanto, os tampões com pH inferior a esse valor não foram eficientes para inativar a ricina. Assim, o elevado pH parece ser o responsável pela desnaturação e degradação da toxina e, consequentemente, pela sua inativação.

Alguns autores (OLIVEIRA et al., 2007; BARNES et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010b; COBIANCHI et al., 2012) propuseram que o tratamento com sais de cálcio leva à desnaturação da ricina, o que acarreta na inativação da atividade citotóxica da proteína. Nesses trabalhos, a ricina tratada foi analisada por SDS-PAGE, e a diminuição ou não visualização das bandas A e B da toxina os levaram a chegar a essa conclusão. Segundo DANIEL et al. (1996), desnaturação é a perda da estrutura terciária (e, muitas vezes, da estrutura secundária) da proteína, não envolvendo a clivagem de ligações covalentes, tais como a ligação peptídica. Além disso, a desnaturação é, pelo menos a princípio, reversível. Já a degradação, segundo os mesmos autores, é a perda da estrutura primária da proteína, com a clivagem de ligação covalente, sendo um processo irreversível. Sendo assim, fica evidente que o tratamento da ricina com soluções de sais de cálcio (elevado pH) não leva somente à desnaturação da proteína, como sugerido por esses estudos, e sim à degradação da mesma, devido a clivagem das ligações peptídicas e subsequente formação de peptídeos. Além disso, a análise de mudanças estruturais em proteínas por SDS-PAGE não é suficiente para alcançar resultados conclusivos, havendo a

necessidade de técnicas mais apuradas e sofisticadas, como a espectrometria de massas, para alcançar tal objetivo.

6. CONCLUSÕES

- A ricina parece induzir estresse oxidativo nas células.

- O armazenamento da torta de mamona, nas condições estudadas, não é um método eficiente para inativar a ricina e, consequentemente, para destoxificar a torta de mamona.

- O tratamento com CaO 0,6% (0,1 M) é eficiente na inativação da capacidade citotóxica da ricina purificada, como pôde ser observado pelos testes de citotoxicidade.

- O tratamento com CaO produz uma solução alcalina que promove a desnaturação da ricina e induz clivagens na cadeia polipeptídica em sítios preferenciais, como em resíduos de asparagina (N).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA, AGEITEC. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/mamona/arvore/CONT000h4rb0y9002wx7ha0awymty4m52beo.html>. Acessado 02/05/2017.

AKANDE, T.O.; ODUNSI, A.A.; AKINFALA, E.O. (2016). A review of nutritional and toxicological implications of castor bean (*Ricinus communis L.*) meal in animal feeding systems. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 100: 201-210.

ALEWINE, C.; HASSAN, R.; PASTAN, I. (2015). Advances in Anticancer Immunotoxin Therapy. The Oncologist, 20: 176-185.

ALMAGRO, W.S. (2013). Avaliação do uso de torta de mamona (*Ricinus communis L.*) destoxificada na ração para alimentação do *Astyanax bimaculatus* cultivado em sistema semi-intensivo. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro Darcy Ribeiro (UENF). Campos dos Goytacazes, RJ.

ALVES, M.O.; SOBRINHO, J.N.; CARVALHO, J.M.M. (2004). Possibilidades da mamona como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel no Nordeste Brasileiro. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, nº 01, 42 p.

AMBEKAR, V.R.; DOLE, K.K. (1957). Detoxification of castor cake. Indian Journal of Dairy Science, 10: 107-122.

ANANDAN, S.; ANIL KUMAR, G.K.; GHOSH, J.; RAMACHANDRA, K.S. (2005). Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. Animal Feed Science and Technology, 120: 159-168.

ANJANI, K. Castor genetic resources: A primary gene pool for exploitation. In: SEVERINO, L.S.; AULD, D.L.; BALDANZI, M.; CÂNDIDO, M.J.D.; CHEN,

G.; CROSBY, W.; TAN, D.; HE, X.; LAKSHMAMMA, P.; LAVANYA,C.; MACHADO, O.L.T.; MIELKE, T.; MILLER, T.D.; MORRIS, J.B.; MORSE, S.A.; NAVAS, A.A.; SOARES, D. J.; SOFIATTI, V.; WANG, M.L.; ZANOTTO, M.D.; ZIELER, H.A. (2012). A review of the challenges for increased production of castor. Journal of Agronomy, 104: 853-880.

AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, J.; SCHIER, J.; OSTERLOH, J. (2005). Ricin poisoning: a comprehensive review. Journal of the American Medical Association, 294: 2342-2351.

AZEVEDO, D.M.P.; BELTRÃO, N.E.M.; SANTOS, J.W.; VIEIRA, D.J.; NÓBREGA, L.B.; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; PEREIRA, J.R. (1998). Efeito de população de plantas do rendimento do consórcio de mamona com culturas alimentares. Revista Brasileira de Oleaginosas e fibrosas, 2(3): 193-202.

AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S (1997). Recomendações técnicas para o cultivo da mamoneira (*Ricinus communis L.*) no Brasil. In: JUNIOR, G.B.; GUERRA, H.O.C.; CAVALCANTI, M.L.F.; LACERDA, R.D. (2008). Consumo de água e eficiência do uso para duas cultivares de mamona submetidas a estresse hídrico. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 12(4): 350-355.

BAENZIGER, J.U.; FIETE, D. (1979). Structural Determinants of *Ricinus communis Agglutinin* and Toxin Specificity for Oligosaccharides. Journal of Biological Chemistry, 254(19): 9795-9799.

BAGARIA, S.; KARANDE, A.A. (2014). Abrin and Immunoneutralization: A Review. Toxinology, p. 1- 21.

BALDONI, A.B.; DE CARVALHO, M.H.; SOUSA, N.L.; NÓBREGA, M.B.M.; MILANI, M.; ARAGÃO, F.J.L. (2011). Variability of ricin content in mature seeds of castor bean. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 46(7): 776-779.

BALUNA, R.; COLEMAN, E.; JONES, C.; GHETIE, V.; VITETTA, E.S. (2000) The effect of a monoclonal antibody coupled to ricin a chain-derived peptides on endothelial cells *in vitro:* insights into toxin-mediated vascular damage. Experimental Cell Research, 258: 417-424.

BARBIERI, L.; VALBONESI, P.; BONDIOLI, M.; LUGO ALVAREZ, M.; DAL MONTE, P.; LANDINI, M.P.; STIRPE, F. (2001). Adenine glycosylase activity in mammalian tissues: an equivalent of ribosome-inactivating proteins. FEBS Letters, 505: 196-197.

BARBIERI, L.; CIANI, M.; GIRBÉS, T.; LIU, W.; VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; STIRPE, F. (2004). Enzymatic activity of toxic and non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins. FEBS Letters, 563: 219-222.

BARNES, D. J.; BALDWIN, B. S.; BRAASCH, D. A. (2009). Degradation of ricin in castor seed meal by temperature and chemical treatment. Industrial Crops and Products, 29: 509-515.

BARROS, L.V.; PAULINO, M.F.; DETMANN, E.; FILHO, S.C.V.; LOPES, S.A.; ROCHA, A.A.; VALENTE, E.E.L.; ALMEIDA, D.M. (2011). Replacement of soybean meal by treated castor meal in supplements for grazing heifer during the dry-rainy season period. R. Bras. Zootec., 40(4): 843-851.

BELTRÃO, N.E.M.; LIMA, R.L.S. (2007). Aplicação do óleo de mamona como fonte de energia: Biodiesel. In: AZEVEDO, D.M.P.; BELTRÃO, N.E.M. (2007). O agronegócio da mamona no Brasil. 2ª Edição, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília-DF, p. 395-416.

BELTRÃO, N.E.M.; DE SOUZA, J.G.; DOS SANTOS, J.W.; JERÔNIMO, J.F.; COSTA, F.X.; DE LUCENA, A.M.A.; QUEIROZ, U.C. (2003). Fisiologia da mamoneira, cultivar BRS 149 nordestina, na fase inicial de crescimento, submetida a estresse hídrico. Revista Brasileira de oleaginosas e fibrosas, 7(1): 659-664.

BELTRÃO, N.E. de M.; SILVA, L.C.; VASCONCELOS, O.L.; AZEVEDO, D.M.P. de; VIEIRA, D.J. Fitologia. In: AZEVEDO, D.M.P. de; LIMA, E.F. (2007). O agronegócio da mamona no Brasil. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 37-61.

BIGI, M. F. A.; TORKOMIAN, V. L.; DE GROOTE, S. T. C. S.; HEBLING, M.J.A.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, M.F.G.F. (2004). Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. Pest Management Science, 60: 933-938.

BOLIVAR, F.M.; WRIGHT, R.; FUNK, V.; SENTZ, D.; BARROSO, L.; WILKINS, T.D.; PETRI, W.; CRAMER, C.L. (2003). A non-toxic lectin for antigen delivery of plant-based mucosal vaccines. Vaccine, 21: 997-1005.

BON, J.H. (1977). Solubilização das proteínas da mamona por enzimas proteolíticas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro.

BRADBERRY, S. (2007). Ricin and abrin. Medicine, 35: 10.

BRADFORD, M.M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

BUENO, C.F.D.M.; VELOSO, A.L.C.; FILHO, D.E.F.; DIAS, A.N.; FERNANDES, V.; DO COUTO, F.A.P.; JÚNIOR, J.B.M.; CARNEIRO, W.A. (2014). Torta de mamona destoxificada para alimentação de poedeiras comerciais. Ciência Rural, 44(3): 538-543.

BUTTERWORTH, A.G.; LORD, M. (1983). Ricinus communis agglutinin subunits are all derived from a single-size polypeptide precursor. European Journal of Biochemistry 137: 57-65.

CÂNDIDO, M.J.D.; BONFIM, M.A.D.; SEVERINO, L.S.; OLIVEIRA, S.Z.R. (2008). Utilização de coprodutos da mamona na alimentação animal. III Congresso Brasileiro de Mamona. Energia e Ricinoquímica. Salvador, BA.

CAPASSO, S.; MAZZARELLA, L.; KIRBY, A.J.; SALVADORI, S. (1997). Succinimide-mediated pathway for peptide bond cleavage: kinetic study on an Asn-Sar containing peptide. Biopolymers. 40: 543-551.

CARNEIRO, R.A.F.A. (2003). Produção do biodiesel na Bahia. Revista Conjuntura e planejamento, 112: 35-43.

CHAN, A.P.; CRABTREE, J.; ZHAO, Q.; LORENZI, H.; ORVIS, J.; PUIU, D.; MELAKE-BERHAN, A.; JONES, K.M.; REDMAN, J.; CHEN, G.; CAHOON, E.B.; GEDIL, M.; STANKE, M.; HAAS, B.J.; WORTMAN, J.R.; FRASER-LIGGETT, C.M.; RABINOWICZ, J.R.P.D. (2010). Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis.* Nature biotechnology, 28(9): 951-955.

CHIERICE, G.O; CLARO NETO, S. Aplicação Industrial do óleo. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (2001). O Agronegócio da mamona no Brasil. 2.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 417-447.

CLAASSEN, C.E.; HOFFMAN, A. (1949). The inheritance of the pistillate character in castors and its possible utilization in the production of commercial hybrid seed. In: BERTOZZO, F.; LARA, A.C.C.; ZANOTTO, M.D. (2011). Melhoramento genético da mamona visando incremento de flores femininas. Bragantia, 70(2): 271-277.

COBIANCHI, J.V.; OLIVEIRA, A.S.; CAMPOS, J.M.S.; GUIMARÃES, A.V.; FILHO, S.C.V.F.; COBIANCHI, F.P.; OLIVEIRA, T.E.S. (2012). Productive performance and efficiency of utilization of the diet components in dairy cows fed castor meal treated with calcium oxide. Revista Brasileira de Zootecnia, 41(10): 2238-2248.

COELHO, I. (1979). Avaliação das exportações tradicionais baianas: caso de sisal e mamona. Tese de Mestrado. Universidade Federal da Bahia (UFB). Salvador, Bahia.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. (2016). Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_07_08_17_35_34_mamonajunho2016.pdf>. Acessado em 20/02/2017.

CONCEIÇÃO, M.M.; CANDEIA, R.A.; SILVA, F.C.; BEZERRA, A.F.; FERNANDES JR., V.J.; SOUZA, A.G. (2007). Thermoanalytical characterization of castor oil biodiesel. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 11: 964-975.

COOK, D.L.; DAVID, J.; GRIFFITHS, G.D. (2006). Retrospective identification of ricin in animal tissues following administration by pulmonary and oral routes. Toxicology, 223: 61-70.

CRESPO NETO, H. (2009). Avaliação dos teores de ricina e de proteases durante o armazenamento de torta de mamona (*Ricinus communis L.*). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

CUNHA, G.H.M.; ROCHA, U.R.; OLIVEIRA, A.B. (2017). Economia da mamona: uma visão do mercado brasileiro no inicio do século XXI. Revista Contribuciones a las Ciencias Sociales. Disponível em: http://www.eumed.net/rev/cccss/2017/01/mamona.html.

DA SILVA, S. D.; PRESOTTO, R.A.; MAROTA, H. B.; ZONTA, E. (2012). Uso de torta de mamona como fertilizante orgânico. Pesquisa Agropecuária Tropical, 42(1): 19-27.

DA SILVA, L.C.A. (2009). Análise de viabilidade econômica de plantas de extração de óleo de mamona com e sem detoxicação da torta. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, Minas Gerais.

DANIEL, R.M.; DINES, M.; PETACH, H.H. (1996). The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures Biochemical Journal, 317, 1:11.

DEMANT, C.A.R.; AULD, D.; DEMANT, A.R.M. (2012). Development of a bioassay to quantify the ricin toxin content of castor bean (*Ricinus communis L*.) seeds. Acta Scientiarum. Agronomy, 34(4): 397-402.

DEUS DE OLIVEIRA, N. (2009). Desenvolvimento de uma tecnologia para desativar epitopos alergênicos de albuminas 2S presentes em torta de mamona (*Ricinus communis L.*). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

DIRECTORATE OF OILSEEDS RESEARCH. (2004). Diversifiel uses of Castor. In: International Seminar On Castor Seed, Castor Oil and its Value Added Products. Proceedings Ahmedabad: The Soplvent Extractors Association of India, p.50-57.

ENDO, Y.; MITSUI, K.; MOTIZUKI, M.; TSU, K. (1987). The Mechanism of Action of Ricin and Related Toxic Lectins on Eukaryotic Ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. The Journal of Biological Chemistry, 262(12): 5908-5912

FAO, Estatística de produção agrícola. (2016). Disponível em: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx>. Acesso em 27/02/2017. In: ARAUJO, J.L.P.; RAMOS, G.A.; COSTA, A.G.F.; CORREIA, R.C. (2016). Caracterização do custo e determinação do desempenho econômico de sistemas de produção de mamona na região de Irecê. Revista SODEBRAS, 11(132).

FARAH, M.O.; HASSAN, A.B.; HASHIM, M.M.; ATTA, A.H. (1988). Phytochemical and pharmacological studies on the leaves of *Ricinus communis L. Egypt*. Journal of Veterinary Science, 24: 169-180.

FERNANDES, K.V. (2014). Destoxificação da torta de mamona por tratamento biológico e químico e estudo da inativação da ricina utilizando ensaios de citotoxicidade. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

FERNANDES, K.V.; DEUS-DE-OLIVEIRA, N.; GODOY, M.G.; GUIMARÃES, Z.A.S.; NASCIMENTO, V.V.; MELO, E.J.T.; FREIRE, D.M.G.; DANSA-PETRETSKI, M.; MACHADO, O.L.T. (2012). Simultaneous allergen inactivation and detoxification of castor bean cake by treatment with calcium compounds. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 45: 1002-1010.

FERNANDES, K.V.; MACHADO, O.L.T. (2012). Approaches for the detection of toxic compounds in castor and physic nut seeds and cakes. In: Biodiesel – Feedstocks, Production and Applications. Intech Open. p. 283-308.

FERNANDES, K.V. (2010). Desenvolvimento de um bioensaio para detecção de ricina e utilização da fermentação em estado sólido para destoxificação da torta de mamona e produção de lipase. Dissertação de MESTRADO. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, RJ.

FERRAZ, A.C.; ANGELUCCI, M.E.M.; DA COSTA, M.L.; BATISTA, I.R.; DE OLIVEIRA, B.H.; DA CUNHA, C. (1999). Pharmacological Evaluation of Ricinine, a Central Nervous System Stimulant Isolated from *Ricinus communis*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 63(3): 367-375.

FERREIRA, M.D.P.; DANIEL, L.P.; LIMA, J.E. (2015). O programa brasileiro de biodiesel e o risco associado ao preço da mamona em Irecê, Bahia. Revista de Economia e Sociologia Rural, 53(4): 667-682.

FIANDALO, M.V.; KYPRIANOU, N. (2012). Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. Experimental Oncology, 34: 165-175.

FONSECA, N.B.S.; SOTO-BLANCO, B. (2014). Toxicidade da ricina presente nas sementes de mamona. Semina: Ciências Agrárias, 35(3): 1415-1424.

FORNAZIERI JÚNIOR, A. (1986). Mamona, Uma rica fonte de óleo e divisas. Coleção Brasil Agrícola. Editora Ícone, São Paulo-SP.

FREITAS, J. (1974). Efeito da radiação ionizante sobre as proteínas da torta de mamona. In: SEVERINO, L.S. (2005). O que sabemos sobre a torta de mamona. 1ª Edição, Embrapa Algodão. Documentos, 134. Campina Grande, PB, 31p.

FUNATSU, G.; KIMURA, M.; FUNATSU, M. (1979). Primary structure of ala chain of ricin D. Agricultural biology chemistry, 43(10): 2221-2224.

GARDNER, JR. H.K.; D'AQUIN, E.L.; KOULTUN, S.P.; McCOURTNEY, E.J.; VIX, H.L.E.; GASTROCK, E.A. (1960). Detoxification and deallergenization of Castor Beans. The Journal of the American Oil Chemists Society, 37: 142-148.

GODOY, M.G.; FERNANDES, K.V.; GUTARRA, M.L.E.; MELO, E.J.T.; CASTRO, A.M.; MACHADO, O.L.T.; FREIRE, D.M.G. (2012). Use of Vero cell line to verify the biodetoxification efficiency of castor bean waste. Process Biochemistry, 47: 578-584.

GODOY, M.G.; GUTARRA, M.L.E.; MACIEL, F.M.; FELIX, S.P.; BEVILAQUA, J.V.; MACHADO, O.L.T.; FREIRE, D.M.G. (2009). Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production. Enzyme and Microbial Technology, 44: 317-322.

GÓES, P.S.A. (2006). O PAPEL DA PETROBRAS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL: Perspectivas de produção e distribuição do biodiesel de mamona. Tese de doutorado. Universidade Federal da Bahia (UFBA). Salvador, Bahia.

GONÇALVES, N.P.; FARIA, M.A.V.R.; SATURNINO, H.M.; PACHECO, D.D. (2005). Cultura da mamoneira. Informe Agropecuário, 26(229): 7-13.

HARTLEY, M.R.; LORD, J.M. (2004). Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. Biochimica et Biophysica Acta, 1701: 1-14.

HASEGAWA, N.; KIMURA, Y.; ODA, T.; KOMATSU, N.; MURAMATSU, T. (2000). Isolated Ricin B-Chain-mediated Apoptosis in U937 Cells. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 64(7): 1422-1429.

HORTON, J.; WILLIAMS, M.A. (1989). A Cooker extruder for deallergination of castor meal. Journal of the American Oil Chemistis' Society, 66: 227-231.

HUSSEIN, A.O.; HAMEED, I.H.; JASIM, H.; KAREEM, M.A. (2015). Determination of alkaloid compounds of *Ricinus communis* by using gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS). Journal of Medicinal Plants Research, 9(10): 349-359.

INSTITUTO AGRONÔMICO (IAC). Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/graos/mamona.php>. Acessado em 15/05/2017.

ION SOURCE. Mass spectrometry educational resource. Disponível em: <http://www.ionsource.com/Card/Deamidation/mono0001.htm>. Acessado em 26/11/2016.

JOHNSON. R.C.; LEMIRE, S.W.; WOOLFITT, A.R.; OSPINA, M.; PRESTON, K.P.; OLSON, C.T.; BARR, J.R. (2005). Quantification of Ricinine in Rat and Human Urine: A Biomarker for Ricin Exposure. Journal of Analytical Toxicology, 29(3): 149-155.

JUNIOR, F.S.S.; SOUZA, L.; DIAS, A.G.; EVANGELISTA, J.C.; DIAS, N.S. (2010). Qualidade do óleo da mamona cultivada em diferentes altitudes no Rio Grande do Norte. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, 5(5): 12-17.

JUNIOR, G.B.; GUERRA, H.O.C.; CAVALCANTI, M.L.F.; LACERDA, R.D. (2008). Consumo de água e eficiência do uso para duas cultivares de mamona submetidas a estresse hídrico. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 12(4): 350-355.

KUMAR, O.; SUGENDRAN, K.; VIJAYARAGHAVAN, R. (2003). Oxidative stress associated hepatic and renal toxicity induced by ricin in mice. Toxicon, 41: 333-38.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

LIMA, R.L.S; SEVERINO, L.S.; ALBUQUERQUE, R.C.;BELTRÃO, N.E.M.; SAMPAIO, L.R. (2008). Casca e torta de mamona avaliados em vasos como fertilizantes orgânicos. Revista Caatinga, 21(5): 102-106.

LIMA, P.C.R. (2007). O BIODIESEL NO BRASIL E NO MUNDO COMO POTENCIAL DO ESTADO DA PARAÍBA. Consultoria Legislativa. Recursos Minerais, Hídricos e Energéticos. Brasília - DF. 31p.

LORD, J.M.; SPOONER, R.A. (2011). Ricin Trafficking in plant and mammalian cells. Toxins, 3: 787-801.

LORD, J.M.; ROBERTS, L.M.; ROBERTUS, J.D. (1994). Ricin: structure, mode of action and some current applications. The FASEB Journal, 8: 201-208.

MANN, D.F.; BYERRUM, R.U. (1974). Activation of the de novo pathway for pyridine nucleotide biosynthesis prior to ricinine biosynthesis in castor beans. Plant Physiology, 53: 603-609.

MAY, M.J.; HARTLEY, M.R.; ROBERTS, L.M.; KRIEG, P.A.; OSBORN, R.W.; LORD, J.M. (1989). Ribosome inactivation by ricin A chain: a sensitive method to assess the activity of wild-type and mutant polypeptides. The EMBO Journal, 8(1): 301-308.

MAZZANI, B. (1983). Almacienamento y conservación de semillas oleaginosas. In: MAZZANI, B. (1983). Cultivo y mejoramiento de plantas oleaginosas. Caracas, Venezuela, Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuárias, p. 73-93.

MELO, F.B.; BELTRAO, N.E.M.; SILVA, P.H.S. (2003). Cultivo da mamona (*Ricinus communis L*.) consorciada com feijao-caupi (*Vigna unguiculata (L.) Walp*) no Semi-Arido. 1ª edição. Embrapa meio-norte algodão, 89p. (Documentos, 74).

MIRAGAYA, J.C.G. (2005). Cultura da mamoneira. Informe Agropecuário, 26(229): 7-13.

MONTFORT, W.; VILLAFRANCA, J.E.; MONZINGO, A.F.; ERNST, S.; KATZIN, B.; RUTENBER, E.; XUONG, N.H.; HAMLIN, R.; ROBERTUS, J.D. (1987). The three-dimensional structure of ricin at 2.8 A. The Journal of Biological Chemistry, 262(11): 5398-5403.

MORAIS, G.L. (2010). Caracterização filogenética das Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs) de mamona (*Ricinus communis L.*) e análise da expressão dos genes *Rcom* RIPs durante o desenvolvimento da semente. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

MOREIRA, J. de A.N.; LIMA, E.F.; FARIAS, F.J.C.; AZEVEDO, D.M.P. (1996). Melhoramento da mamoneira (*Ricinus communis* L.). Campina Grande – PB. Embrapa-CNPA, 30p. (Documentos, 44).

MOSHKIN, V. A. (1986). *Castor*. Livro, New Delhi: Amerind, 315 p.

MOTA, C.J.A.; PESTANA, C.F.M. (2011). Co-produtos da Produção de Biodiesel. Revista Virtual de Química, 3(5): 416-425.

NARAYANAN, S.; SURENDRANATH, K.; BORA, N.; SUROLIA, A.; KARANDE, A.A. (2005). Ribosome inactivating proteins and apoptosis. FEBS Letters, 579: 1324-1331.

NASCIMENTO, J.J.V.R.; TAVARES, M.J.V.; SEVERINO, L.S.; SOFIATTI, V. (2008). Efeito da torta de mamona sobre o crescimento da mamoneira BRS 149. In: Congresso Brasileiro de Mamona, 3., 2008, Campina Grande. *Anais...* Campina Grande – PB. Embrapa Algodão, p. 1-5.

OGUNNIYI, D.S. (2006). Castor oil: A vital industrial raw material. Bioresource Technology, 97: 1086-1091.

OLIVEIRA, A.S.; OLIVEIRA, M.R.C.; CAMPOS, J.M.S.; LANA, R.P.; MACHADO, O.L.T.; RETAMAL, C.A.; DETMANN, E.; VALDARES FILHO, S.C. (2010a). In vitro ruminal degradation of ricin and its effect on microbial growth. Animal Feed Science and Technology, 157: 41-54.

OLIVEIRA, A.S.; CAMPOS, J.M.S.; OLIVEIRA, M.R.C.; BRITO, A.F.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E.; VALADARES, R.F.D.; DE SOUZA, S.M.; MACHADO, O.L.T. (2010b). Nutrient digestibility, nitrogen metabolism and hepatic function of sheep fed diets containing solvent or expeller castorseed meal treated with calcium hydroxide. Animal Feed Science and Technology, 158: 15-28.

OLIVEIRA, A.S.; OLIVEIRA, M.R.C.; CAMPOS, J.M.S.; MACHADO, O.L.T.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E.; MACIEL, F.M. (2007). Eficácia de diferentes métodos de destoxificação da ricina no farelo de mamona. In: II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, Brasilia. Anais. p.1-6.

OLSNES, S. (2004). The history of ricin, abrin and related toxins. Toxicon. 44: 361-370.

OLSNES, S.; KOZLOV, J.V. (2001). Ricin. Toxicon, 39: 1723-1728.

OLSNES, S.; FERNANDEZ-PUEMTES, C.; CARRASCO, L.; VAZQUEZ, D. (1975). Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzimic activity of the toxin A-chain. European Journal of Biochemistry, 60: 281-288.

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. Apoptosis, 12: 913-922.

PAES, J.B.; SOUZA, A.D.; LIMA, C.R.; SANTANA, G.M. (2015). Rendimento e características físicas dos óleos de nim (*Azadirachta indica*) e mamona (*Ricinus communis*). Floresta e Ambiente, 22(1): 134-139.

PING LI, X.; BARICEVIC, M.; SAIDASAN, H.; TUMER, N.E. (2007). Ribosome depurination is not sufficient for ricin-mediated cell death in *Saccharomyces cerevisiae.* Infection and Immunity, 75(1): 417-428.

PITA, R.; ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. (2004). Ricina: una fitotoxina de uso potencial como arma. Rev. Toxicol., 21: 51-63.

RAMALHO, H.F.; SUAREZ, P.A.Z. (2013). A Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino. Revista Virtual de Química, 5(1): 2-15.

RAO, P.V.L.; JAYARAJ, R.; BHASKAR, A.S.B.; KUMAR, O.; BHATTACHARYA, R.; SAXENA, P.; DASH, P.K.; VIJAYARAGHAVAN, R. (2005). Mechanism of ricin-induced apoptosis in human cervical cancer cells. Biochemical Pharmacology, 65: 855-865.

REINBOTHE, S.; REINBOTHE, C.; LEHMANN, J.; BECKER, W.; APEL, K.; PARTHIER, B. (1994). JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. Proceedings of the National Academy of Science of USA, 91: 7012-7016.

ROBERTS, L.M.; LAMB, F.I.; PAPPING, D.J.C.; LORD J.M. (1985). The Primary Sequence of *Ricinus communis Agglutinin*. Comparison with ricin. The journal of biological chemistry, 260(29): 15682-15686.

ROBERTS, L.M.; LORD, J.M. (1981). The Synthesis of *Ricinus communis Agglutinin.* Cotranslational and Posttranslational Modification of Agglutinin Polypeptides. European Journal of Biochemistry, 119(1): 31-41.

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, A. (2013). How dangerous could be the receiving of a ricin-contaminated letter?. Iranian Journal of Biotechnology, 11: 141-143.

SAMPAIO, R.L.S.; SEVERINO, L.S.; ALBUQUERQUE, R.C.; BELTRÃO, N.E.M.; SAMPAIO, L.R. (2008). Casca e torta de mamona avaliadas em vasos como fertilizantes orgânicos. Revista Caatinga, 21(5): 102-106.

SAVI FILHO, A.; BANZATTO, N. V.; BARBOSA, M. Z. (1999). Mamona. In: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral - CATI – Oleaginosas no Estado de São Paulo: análise e diagnóstico. (1999). 39p, p.29-39. (CATI - Documento técnico, 107).

SCHEP, L.J.; TEMPLE, W.A.; BUTT, G.A.; BEASLEY, M.D. (2009). Ricin as a weapon of mass terror - Separating fact from fiction. Environment International, 35: 1267-1271.

SCHOFIELD, C. L.; MUKHOPADHYAY, B.; HARDY, S.; MCDONNELL, M. B.; FIELD, R. A.; RUSSELL, D. A. (2008). Colorimetric detection of *Ricinus communis Agglutinin 120* using optimally presented carbohydrate-stabilised gold nanoparticles. Analyst, 133: 626-634.

SCHOLZ, V.; DA SILVA, J.N. (2008). Prospects and risks of the use of castor oil as a fuel. Biomass and Bioenergy, 32: 95-100.

SEVERINO, L.S.; AULD, D.L.; BALDANZI, M.; CÂNDIDO, M.J.D.; CHEN, G.; CROSBY, W.; TAN D.; HE, X.; LAKSHMAMMA, P.; LAVANYA, C.; MACHADO, O.L.T.; MIELKE, T.; MILANI, M.; MILLER, T.D.; MORRIS, J.B.; MORSE, S.A.; NAVAS, A.A.; SOARES, D.J.; SOFI ATTI, V.; WANG, M.L.; ZANOTTO, M.D.; ZIELER, H. (2012). A Review on the Challenges for Increased Production of Castor. Agronomy Journal, 104: 853-880.

SEVERINO, L.S. (2005). O que sabemos sobre a torta de mamona. 1ª Edição, Embrapa Algodão. Documentos, 134. Campina Grande, PB, 31p.

SEVERINO, L.S.; COSTA, F.X.; BELTRÃO, N.E.M.; LUCENA, M.A.; GUIMARÃES, M.M.B. (2004). Mineralização da torta de mamona, esterco bovino e bagaço de cana estimada pela respiração microbiana. Revista de Biologia e Ciências da Terra, 5(1).

SHIH, S.F.;WU, Y.H.; HUNG, C.H.; YANG, H.Y.; LIN, J.Y. (2001). Abrin triggers cell death by inactivating a thiol-specific antioxidant protein. The Journal of Biological Chemistry, 276(24): 21870-21877.

SILVA, L.M.; OLIVEIRA, C.H.A.; SILVA, C.M.G.; SILVA, A.M.; FERNANDES, C.L.; FURTADO, R.F.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; GUEDES, M.I.F.; RONDINA, D. (2015). Use of castor meal (*Ricinus communis L.)* as a source of dietary protein in goats during the mating period: impact on reproductive and metabolic responses. Ciências Agrárias, 36(1): 203-216.

SINGH, R.; GEETANJALI, A. (2015). Phytochemical and Pharmacological Investigations of *Ricinus communis Linn*. Journal of Natural Products, 3(1): 120-129.

STIRPE, F. (2013). Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins. Toxicon, 67: 12-16.

STIRPE, F. (2004). Ribosome-inactivating proteins. Toxicon 44: 371-383.

STIRPE, F.; BAILEY, S.; MILLER, S.P.; BODLEY, J. W. (1988). Modification of ribosomal RNA by ribosome-inactivating proteins from plants. Nucleic Acids Research, 16(4): 1359-1369.

STIRPE, F.; BATELLI, M.G. (2006). Ribossome-inactivating proteins: progress and problems. Cellular and Molecular Life Sciences, 63: 1850-1866.

TÁVORA, F.J.A.F. (1982). A cultura da mamona. Fortaleza: Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará (EPACE), 111 p.

TYAGI, N.; TYAGI, M.; PACHAURI, M.; GHOSH, P.C. (2015). Potential therapeutic applications of plant toxin-ricin in cancer: challenges and advances. Tumor Biology, 36: 8239-8246.

WALLER, G.R.; HENDERSON, L.M. (1961). Biosynthesis of the Journal of the pyridine ring of ricinine. Biological Chemistry, 236(4): 1186-1191.

WALLER, G.R.; SKURSKY, L. (1972). Translocation and metabolism of ricinine in the castor bean plant, *Ricinus communis* L. Plant Physiology, 50: 622-626.

WALSH, T.A.; MORGAN, A.E.; HEY, T.D. (1991). Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize: novel mechanism of proenzyme activation by proteolytic removal of a 2.8-kilodalton internal peptide segment. The Journal of Biological Chemistry, 266: 23422-23427.

WANG, Y.; YU, G.; HAN, Z.; YANG, B.; HU, Y.; ZHAO, X.; WU, J.; LV, Y.; CHAI, W. (2011). Specificities of *Ricinus communis agglutinin 120* interaction with sulfated galactose. FEBS Letters, 585: 3927-3934.

WEISS, E.A. (1983). Oilseed crops. 1ª edição. London: Longman, 660p.

WU, A.M.; WU, J.H.; SINGH, T.; LAI, L.J.; YANG, Z.; HERP, A. (2006). Colorimetric detection of *Ricinus communis Agglutinin 120* using optimally presented carbohydrate-stabilised gold nanoparticles. Molecular Immunology, 43: 1700-1715.

ZUCHI, J.; BEVILAQUA, G.A.P.; GALHO, A.; MARQUES, R.L.L.; SILVA, S.D.A. (2007). Efeito da torta de mamona sobre os componentes de rendimento triticale. Resumos do V CBA – Manejo de Agroecossistemas Sustentáveis. Revista brasileira de agroecologia, vol. 2, nº 2.