

**DESTOXIFICAÇÃO DA TORTA DE MAMONA POR
TRATAMENTO BIOLÓGICO E QUÍMICO E ESTUDO DA
INATIVAÇÃO DA RICINA UTILIZANDO ENSAIOS DE
CITOTOXICIDADE**

KEYSSON VIEIRA FERNANDES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
FEVEREIRO de 2014

**DESTOXIFICAÇÃO DA TORTA DE MAMONA POR
TRATAMENTO BIOLÓGICO E QUÍMICO E ESTUDO DA
INATIVAÇÃO DA RICINA UTILIZANDO ENSAIOS DE
CITOTOXICIDADE**

KEYSSON VIEIRA FERNANDES

Orientadora: Dr^a. Olga Lima Tavares Machado

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, no Centro de Biociências e Biotecnologia, sendo apoiado financeiramente pelo CNPq, CAPES e FAPERJ.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

FEVEREIRO de 2014

DESTOXIFICAÇÃO DA TORTA DE MAMONA POR TRATAMENTO BIOLÓGICO E QUÍMICO E ESTUDO DA INATIVAÇÃO DA RICINA UTILIZANDO ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

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

Banca Examinadora:

.....
Dr. Carlos Wanderlei Piler de Carvalho – CTAA / EMBRAPA

.....
Dr. Manuel Vazquez Vidal Junior – LZNA / CCTA / UENF

.....
Dr. Elias Walter Alves – LQFPP / CBB / UENF

.....
Dr^a. Olga Lima Tavares Machado, LQFPP / CBB / UENF (Orientadora)

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
FEVEREIRO DE 2014.

“Viva. Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin

*Dedico à minha mãe, familiares
e todos os amigos, que de
alguma forma me ajudaram a
chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora e amiga, Prof^a. Olga Lima Tavares Machado, pela oportunidade de ter feito parte do seu grupo de pesquisa durante não só o doutorado, mas desde a minha iniciação científica e o mestrado. Meu grande grande obrigado à essa excelente profissional.

Ao demais pesquisadores envolvidos no projeto. A Prof^a. Denise Maria Guimarães Freire, por todo o suporte dado a esse trabalho, e por me receber tão bem no seu laboratório, onde realizamos toda a parte de fermentação em estado sólido. O Prof. Edésio José Tenório de Melo, pela colaboração no trabalho, cedendo o seu laboratório para o desenvolvimento de experimentos de biologia celular, e pela revisão desta dissertação. À Prof^a. Nilgun Ereken Tumer, da Rutgers University, por ter me recebido no seu laboratório durante o período de doutorado sanduíche, e por todo o suporte dado nos experimentos realizados por lá.

Aos companheiros e eternos amigos do laboratório 221 do LQFPP, que por aqui já passaram ou se encontram atualmente: Viviane, Natália, Hélio, Jucélia, Thiago, Lívia, Thais, Renata, Thatiane, Nadiyah, Rafael, Débora, Franciane, Cristina e Paula. Aos demais amigos e companheiros de LQFPP pela ajuda com questões experimentais, momentos de descontração e os papos da hora do almoço.

A todos os demais professores, alunos e técnicos do LQFPP, em especial a Isabela e o Cristóvão.

Ao Dr. Mateus Godoy pela por toda a ajuda fornecida durante os trabalhos de fermentação realizados na UFRJ. Também à toda a equipe do LaBiM. Às alunas Cristiane Vergilio e Laís Pessanha, do laboratório do Prof. Edésio, por toda a ajuda prestada ao meu trabalho.

Aos companheiros e amigos que fiz durante minha estadia no laboratório da Dr^a. Tumer: Qing, Xiao-Ping, Anwar, Debaleena, John, Mike, Kerrie, Yijun. Um agradecimento especial para a Dr^a. Jennifer Khan (Jenny), que me auxiliou com a manutenção da cultura de células.

Agradeço a todos os membros da banca pela atenção dedicada à avaliação deste trabalho, e à Dr^a. Suzanna Ribeiro pela revisão do documento.

Aos órgãos de fomento CNPq pela bolsa de doutorado concedida durante a primeira metade do doutorado, e à CAPES pela bolsa que cobriu a segunda metade. Ainda ao CNPq, agradeço a oportunidade dada ao meu projeto para ter parte desenvolvida fora do país no formato sanduíche, o que não só gerou bons resultados e colaborações, mas proporcionou crescimento profissional e experiência de vida.

À minha família, especialmente minha mãe, minha avó Hercília e minha tia Rosângela, por toda a força e carinho que foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Aos meus amigos de Aperibé, em especial os meus quatro “irmãos” André (Manél), Beneto, Ralph e Michell, pela força que sempre me deram.

Aos velhos companheiros de UENF, que mesmo não tendo o contato que tínhamos antes, ainda assim me apoiaram e estiveram do meu lado durante esses quatro anos. Aos companheiro de república, nos meus primeiros meses de doutorado, Elba Bravo e Pedro de León, e os que vieram em seguida, Saulo, Ronan e David, por toda a paciência e incentivo que sempre tiveram pra mim.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Obrigado!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABELAS	3
LISTA DE ABREVIACÕES	4
RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 – INTRODUÇÃO	9
1.1 – Características botânicas da mamoneira	10
1.2 – Aspectos econmicos da mamona	12
1.2.1 – Produtos da mamona	14
1.2.2 – Torta de mamona	16
1.3 – Componentes alergênicos e tóxicos	17
1.3.1 – Albuminas 2S de <i>Ricinus communis</i>	17
1.3.2 – Ricinina	19
1.3.3 – Ricina	20
1.3.3.1 – Proteínas inativadoras de ribossomos	20
1.3.3.2 – Estrutura e função	21
1.3.3.3 – Internalização e rota intracelular	23
1.3.3.4 – Outros problemas e aplicações da ricina	24
1.3.3.5 – Métodos de detecção da ricina	26
1.3.3.6 – Eliminação da ricina da torta de mamona	30
1.4 – Fermentação em estado sólido	32
1.5 – <i>Aspergillus niger</i>	38
2 – OBJETIVOS	41
2.1 – Gerais	41
2.2 – Específicos	41
3 – MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 – Ensaio de citotoxicidade	43
3.2 – Tratamentos da ricina purificada com compostos de cálcio	44
3.3 – Avaliação morfológica comparativa das células Vero por microscopia óptica	46

3.4 – <i>Dot blotting</i>	46
3.5 – Avaliação da importância de cálcio livre para a inativação da ricina	47
3.6 – Avaliação da interferência do pH na inativação da ricina	47
3.7 – Tratamento da torta de mamona com compostos de cálcio e avaliação da toxicidade em cultura de células Vero	48
3.8 – Biodestoxificação da torta de mamona por fermentação em estado sólido	49
3.9 – Medida do crescimento do fungo	50
3.10 – Medida da atividade de protease	51
4 – RESULTADOS	54
4.1 – Padronização dos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular	54
4.2 – Biodestoxificação da torta de mamona por fermentação em estado sólido	56
4.3 – Destoxificação da torta de mamona por tratamento com compostos de cálcio	58
4.4 – Inativação da ricina purificada por soluções de CaO e Ca (OH) ₂	60
5 – DISCUSSÃO	79
6 – CONCLUSÕES	87
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXOS	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mamoneira. Observa-se o formato palmatiforme das folhas com muita facilidade, bem como os frutos, que podem variar de cor (verde ou vermelho) entre cultivares.....	11
Figura 2. Rendimento em sementes de mamona nos três principais países produtores durante 20 anos.....	13
Figura 3. Agroindústria da mamona. Possibilidades de utilização.....	14
Figura 4. Estrutura do ácido ricinoléico.....	15
Figura 5. Estrutura das RIPs 1 e 2: cadeia ativa (barra aberta), cadeia lectina (barra cinza) e cadeia com função desconhecida (barra preta), e as pontes dissulfeto (-S-S-).....	21
Figura 6. Estrutura da ricina. A cadeia B está a direita (laranja), e a cadeia A está a esquerda (azul). O círculo vermelho indica a ponte dissulfeto (RUTENBER & ROBERTUS, 1991). Figura preparada através do programa MOI:MOI.....	22
Figura 7. <i>Loop</i> de RNAr e o sítio de despurinação pela ação da ricina (RTA). A imagem esquematiza a remoção da adenina (A ₄₃₂₄) pela atividade N-glicosidase da toxina.....	23
Figura 8. Esquema de alguns dos processos, em microescala, que ocorrem durante a fermentação em estado sólido.....	33
Figura 9. Ensaio para determinação do limite de detecção da atividade tóxica de ricina em cultura de células Vero.....	55
Figura 10. Microscopia óptica de cultura de células Vero após 48 horas de incubação com ricina, na ausência e na presença de anticorpos anti-cadeia A.....	55
Figura 11. SDS-PAGE 12% para torta de mamona submetida à biodestoxificação por fermentação em estado sólido.....	56
Figura 12. Toxicidade da torta de mamona utilizada como substrato para o crescimento de <i>Aspergillus niger</i> por 24, 48, 72 e 96 horas.....	57
Figura 13. Curvas de crescimento de <i>A. niger</i> e de atividade proteásica encontrada na torta de mamona durante 96 horas de fermentação.....	58
Figura 14. Toxicidade da torta de mamona quimicamente tratada.....	59
Figura 15. SDS-PAGE 12% para detecção de ricina em torta de mamona tratada com CaO.....	60

Figura 16. Ensaio de citotoxicidade para determinar a menor concentração de cálcio eficiente contra a toxicidade da ricina, usando uma concentração final de ricina de 50 ng/mL e 1 µg/mL.....	61
Figura 17. SDS-PAGE das amostras de ricina após o tratamento com alta e baixa concentração de cálcio.....	62
Figura 18. SDS-PAGE da ricina tratada com diferentes concentrações de CaO, onde todas as amostras tiveram seu pH ajustado para 7 para serem aplicadas no gel.....	63
Figura 19. Ensaio de citotoxicidade para avaliar a capacidade dos compostos de cálcio induzirem proteção nas células tratadas com ricina.....	64
Figura 20. Ensaio de citotoxicidade para determinar o tempo mínimo requerido para a inativação da ricina usando diferentes concentrações de CaO.....	65
Figure 21. SDS-PAGE para a ricina tratada com CaO 5% por 60, 30, 10, 1 e 0 minutos.....	65
Figura 22. Microscopia óptica para células Vero sem tratamento, crescidas em meio DEMEM + 5% de soro fetal bovino.....	67
Figura 23. Microscopia óptica para células Vero incubadas com 5% (v/v) de PBS pH 7,0.....	68
Figura 24. Microscopia óptica para células Vero incubadas com solução de CaO 5%.....	69
Figura 25. Microscopia óptica para células Vero incubadas com ricina na concentração final de 1 µg/mL.....	70
Figura 26. Microscopia óptica para células Vero incubadas com ricina pré tratada com CaO 5% por 1 hora.....	71
Figura 27. <i>Dot Blotting</i> da ricina tratada com diferentes concentrações de CaO.....	72
Figura 28. Ensaio de citotoxicidade para: A) CaO e; B) EGTA separadamente em diferentes concentrações, com e sem ricina; C) CaO + EGTA (diferentes concentrações) com e sem ricina.....	73/74
Figura 29. SDS-PAGE da ricina tratada com PBS em diferentes faixas de pH.....	75
Figura 30. Citotoxicidade da ricina após o tratamento com PBS em diferentes faixas de pH.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição bromatológica da torta de mamona.....	17
Tabela 2. Principais diferenças entre a FES e a FS.....	35
Tabela 3. Preparo de gel de poliacrilamida separador de 12% (5 mL) e do gel concentrador (<i>stacking</i>) (2 mL), para placas de espaçador de 1 mm, em sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad).....	45

LISTA DE ABREVIATÖES

- APS** – persulfato de amônio (*ammonium persulfide*)
- A_w** – atividade de água
- Ca(OH)₂** – hidróxido de cálcio
- CaCO₃** – carbonato de cálcio
- CaO** – óxido de cálcio
- CB-1A** – alérgeno de mamona (*castor bean allergen*)
- DMEDA** – N,N'-dimetiletilenodiamina
- DMEM** – Meio Dulbecco modificado por Eagle (*Dulbecco's modified eagle's medium*)
- ECL** – eletroquimioluminescência (*electrochemoluminescence*)
- EDTA** – ácido etilenodiamina tetracíclico (*ethylenediamine tetracyclic acid*)
- EGTA** – ácido etileno tetracético glicol (*ethylene glycol tetraaetic acid*)
- ELISA** – Ensaio imunosorvente ligado à enzima (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
- FES** – fermentação em estado sólido
- FS** – fermentação submersa
- GRAS** – geralmente reconhecido como seguro (*generally recognized as safety*)
- IM-ECL** – eletroquimioluminescência imunomagnética (*immunomagnetic electrochemoluminescence*)
- IPCR** – Imuno-PCR (*polymerase chain reaction*)
- LC-ES MS/MS** – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas eletronspray (*liquid chromatography electronspray mass spectrometry*)
- LDH** – lactato desidrogenase (*lactate dehydrogenase*)
- OTA** – ocratoxina A
- PAP** – pokeweed antiviral protein
- PBS** – tampão fosfato salino (*phosphate buffer saline*)
- PBS-T** - PBS pH 7,0 + Tween 0,05%

p-DAB - *p*-dimetilaminobenzaldeído - reagente de Erlich

RIP – proteína inativadora de ribossomos (*ribosome-inactivating protein*)

RIP 1 e RIP 2 – RIP do tipo 1 e RIP do tipo 2, respectivamente

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

SDS – dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfide*)

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

Stx – Shiga toxina

TCA – ácido tricloroacético (*trichloroacetic acid*)

UV – ultra violeta

RESUMO

A mamoneira (*Ricinus communis*) é uma planta de grande valor econômico, que tem como principal produto o seu óleo, extraído das sementes. A extração de óleo de mamona leva à geração de um outro produto, a torta de mamona, que além de ser considerada um adubo orgânico, ainda é rica em proteínas e fibras, passível de uso como ingrediente aditivo em rações animais. O problema do uso da torta de mamona na alimentação animal é a presença de uma proteína tóxica, a ricina, que é classificada como uma proteína inativadora de ribossomos do tipo 2, e é uma das fitotoxinas mais potentes já descritas. Diversos métodos já foram descritos para a destoxificação da torta de mamona, mas muitos destes precisam ser otimizados. Além disso, a forma como a destoxificação é validada em geral não envolve testes de atividade biológica. Assim, o presente trabalho além de mostrar dois métodos eficientes na eliminação da ricina na torta de mamona, ainda mostra um ensaio de atividade biológica baseado em cultura de células Vero. O ensaio biológico, além de alta sensibilidade para ricina (10 ng/mL), mostra se a ricina continua biologicamente ativa, e o uso de anticorpos anticadeia A fornecem dados qualitativos. Foi visto que a fermentação em estado sólido, utilizando torta de mamona como substrato para o crescimento de *Aspergillus niger*, eliminou a ricina da torta após 24 horas, como visto nos ensaios de citotoxicidade. Tratamentos da torta com CaO, Ca(OH)₂ e CaCO₃ à 4% e 8% também foram realizados, e foi visto que óxido e hidróxido de cálcio funcionaram na eliminação da toxicidade, enquanto o carbonato de cálcio mostrou-se ineficaz. Ao utilizar a ricina pura para determinar o método pelo qual o óxido e o hidróxido de cálcio faziam a sua desativação, verificamos que concentrações muito baixas dos compostos (até 0,6%) tinham efeito sobre a atividade da holotoxina. Também foi visto que, mesmo em soluções alcalinas sem cálcio, a ricina perdia a sua atividade, mostrando que o cálcio não é o fator chave na desativação da toxina com CaO e Ca(OH)₂, mas sim o alto pH destas soluções.

Palavras chave: ricina, torta de mamona, destoxificação, *Ricinus communis*, cálcio, fermentação em estado sólido.

ABSTRACT

Castor bean (*Ricinus communis*) is a plant with high economic value, and the oil extracted from the seeds is its main product. In addition to that the oil extraction leads to a new product called castor bean cake which has a potential use as a fertilizer and also is rich in proteins and fiber that makes it an interesting raw material for animal feedstock. The problem about using castor cake to feed animal is that it contains ricin, a type 2 ribosome-inactivating protein which is also one of the most toxic phytotoxins which has been reported. Several methods for castor cake detoxification have been described, but most of them need being optimized. Further the way the detoxification has been validated in those works has not involved any biological activity assay. Thus, the present thesis shows two efficient methods for ricin inactivation in castor cake, and also brings a Vero cells culture based biological activity. The biological assay is highly sensible (10 ng/mL) and it can determine if ricin is biologically active or not. The anti-ricin A chain antibodies used to the assay can give qualitative information about the sample. It was shown that solid-state fermentation using castor cake as substrate to grow *Aspergillus niger* eliminated ricin from the cake at 24 hours of fermentation, as seen by cytotoxicity assays. Castor cake treatments with CaO, Ca(OH)₂ and CaCO₃ at 4% and 8% were performed too, and it was seen that calcium oxide and hydroxide worked for ricin inactivation. On the other hand calcium carbonate was ineffective to detoxification. Purified ricin was also used to elucidate the mechanism by which calcium oxide and calcium hydroxide inactivate the protein. It was shown that the calcium concentration needed for inactivating the holotoxin is very low (0,6%). And even in alkaline buffers without calcium ricin lost the activity, showing that calcium is not the key factor for the ricin inactivation, but the high pH which could lead to protein alkaline hydrolysis.

Key words: ricin, castor bean cake, detoxification, *Ricinus communis*, calcium, solid-state fermentation.

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de oleaginosas, o que lhe confere um enorme potencial na produção de óleos vegetais e derivados. Entre os diversos produtos deste setor, o biodiesel é aquele que vem recebendo o maior destaque, decorrente do crescente aumento nos preços do petróleo e a preocupação com o meio ambiente. O biodiesel é tido como uma evolução na substituição do óleo mineral, porque possui o mesmo conteúdo energético do diesel mineral e adicionalmente é renovável e menos poluente (OLIVEIRA, 2001).

O Brasil se inseriu formalmente na produção de biodiesel a partir da Lei nº 11.097/2005, que estabelece a sua mistura em escala comercial, na proporção de 2% de biodiesel e 98% de óleo diesel, mistura denominada B2, que passou a ser obrigatória em 2008 (BRASIL, 2005). A proporção da mistura vem subindo gradativamente, estando atualmente nos 5% e com previsão de subir para os 7% ainda em 2014 (AGÊNCIA BRASIL, 2013). Dentre as plantas oleaginosas cogitadas para a produção de biodiesel no Brasil está a mamona (*Ricinus communis* L.), uma euforbiácea amplamente cultivada no Nordeste do país e que vem ganhando atenção e espaço nas demais regiões. As sementes de mamona são a fonte do óleo de rícino, que possui inúmeras aplicações, muitas destas relacionadas com a presença de 90% de ácido ricinoléico, o que lhe confere uma alta viscosidade (OLIVEIRA, 2001).

A extração do óleo de mamona pode ser feita de três maneiras: prensagem das sementes a frio, prensagem das sementes a quente e extração por solvente (BELTRÃO & LIMA, 2007). É bom salientar que nestes processos, o subproduto, conhecido como torta de mamona, é alvo de grande interesse comercial graças ao seu alto valor nutricional. A torta bruta é muito utilizada como adubo e, quando tratada para a eliminação de resíduos tóxicos, como a ricina, a ricinina e o componente alergênico CB-1A, pode ser utilizada na composição de rações para animais (GHANDI *et al.*, 1994). Muitos trabalhos vêm sendo realizados no intuito de eliminar os componentes tóxicos e alergênicos da torta de mamona, e dentre estes alguns métodos químicos e biológicos mostram-se promissores. Como exemplo de processos de destoxificação, a fermentação em estado sólido (FES) já se mostrou eficiente

na remoção total da ricina e parcial das albuminas 2S (proteínas de baixo peso molecular que compõem o complexo alergênico) de um resíduo extremamente tóxico, alergênico e alcalino, denominado rejeito de mamona, obtido pela trituração das sementes, simultaneamente ao processo de transesterificação alcalina (GODOY *et al.*, 2009). O tratamento feito com compostos de cálcio tal como o CaO, que foi eficiente na remoção da ricina em torta de mamona (ANANDAN *et al.*, 2005). Os métodos apresentados carecem de aperfeiçoamento e também de uma forma mais eficiente de determinação quantitativa da destoxificação. Atualmente não existe um método padrão para detecção de ricina, seja em torta de mamona ou mesmo a título de perícia criminal, uma vez que a ricina é uma toxina com histórico em uso para bioterrorismo (ATLAS, 2002). Acreditamos que, para detectar a toxina ativa, testes envolvendo avaliação da atividade biológica sejam mais eficazes, no entanto, este tipo de avaliação não vem sendo feita para validar os processos de destoxificação da torta de mamona por diferentes métodos, inclusive os já citados.

1.1 – Características botânicas da mamoneira

A mamoneira (*Ricinus communis* L. – Figura 1) é uma oleaginosa de relevante importância econômica e social, e sua origem não é muito bem conhecida, sendo ora dita como asiática, ora dita como africana (possivelmente da antiga Absínia, hoje Etiópia), e até mesmo, como planta nativa da América. No Brasil, conhece-se a mamona sob as denominações de mamoneira, rícino, carrapateira, enxerida, bafureira, baga e palma-cristi; em países de língua inglesa ela é conhecida pelos nomes de "castor bean" e "castor seed"; em espanhol, "higuerilla", "higuerete", "palma christi", "higuera" e "tártaro"; em francês, "ricinu"; e em alemão como "wunder-baun" (RODRIGUES *et al.*, 2002). Em nosso país a mamona foi introduzida durante a colonização portuguesa. O óleo extraído de suas sementes era utilizado para lubrificar as engrenagens dos engenhos de cana da época (BELTRÃO & LIMA, 2007).



Figura 1. Mamoneira. Observa-se o formato palmatiforme das folhas com muita facilidade, bem como os frutos, que podem variar de cor (verde ou vermelho) entre cultivares (Foto: Keysson Fernandes)

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

Subdivisão:	Fanerogamae ou Spermatophyta
Filo:	Angiospermae
Classe:	Dicotyledonae
Subclasse:	Archychlamideae
Ordem:	Geraniales
Família:	Euphorbiaceae
Gênero:	<i>Ricinus</i>
Espécie:	<i>Ricinus communis</i>
Subespécie:	<i>Ricinus communis communis</i>

A mamoneira é uma espécie tolerante à seca e exigente em calor e luminosidade, que é encontrada em diversas partes do mundo, em especial nas regiões que apresentam clima temperado ou tropical (RODRIGUES *et al.*, 2002). É uma planta bastante complexa no que diz respeito à morfologia,

biologia floral e fisiologia, apresentando metabolismo fotossintético C3 (AZEVEDO & LIMA, 2001).

A mamoneira é na maioria das vezes um arbusto, ou com menor frequência uma árvore, que geralmente mede cerca de 2 metros de altura, mas que, algumas vezes, pode atingir entre 10 e 15 metros. É uma planta encontrada em diversos lugares no Brasil, podendo, ainda, ser cultivada em jardins e no campo. (RODRIGUES *et al.*, 2002).

A semente de mamona, de onde extrai-se o principal produto que é o óleo de rícino, é muito variável quanto a cor, forma, tamanho, peso, proporção do tegumento, presença ou ausência de carúncula e maior ou menor aderência do tegumento ao endosperma (MAZZANI, 1983). O peso de 100 sementes varia muito, de 10 a 100 g, ou seja, de 0,1 a 1 g por semente, com média de 30 g nas cultivares anãs, e de 45 a 75 g nas cultivares de porte médio (AZEVEDO & LIMA, 2001).

1.2 – Aspectos econômicos da mamona

Economicamente, a mamona é cultivada em várias partes do mundo. A partir da industrialização de sua semente obtém-se o óleo e a torta, sendo o primeiro o principal produto e o segundo um produto com potencial para adubação de terras (SANTOS *et al.*, 2007). O óleo é muito utilizado para fins medicinais e industriais (ANANDAN *et al.*, 2005).

Os principais países produtores são a Índia e China, sendo que este primeiro em 2011 produziu mais de 2 milhões de toneladas de sementes, como mostra a Figura 2. Na América do Sul, o Brasil se destaca na produção de mamona, com produção variável sempre abaixo das 100 mil toneladas de sementes nos últimos 20 anos (MILANI & NÓBREGA, 2013).

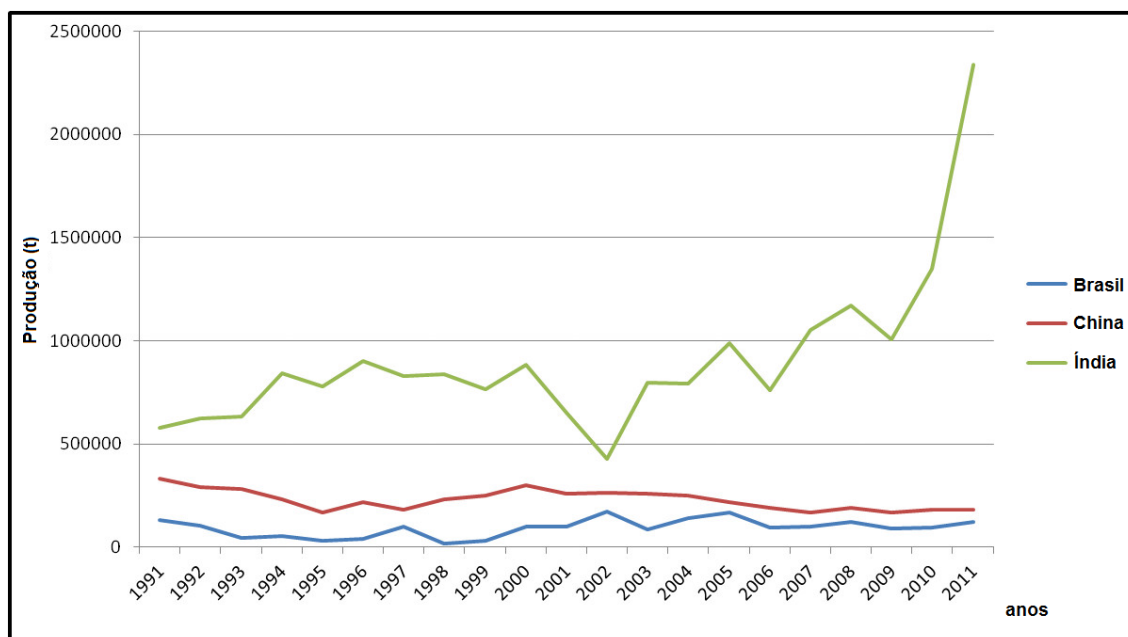


Figura 2. Rendimento em sementes de mamona nos três principais países produtores durante 20 anos (Adaptado de: Milani & Nóbrega, 2013).

O Brasil, que já foi o maior produtor mundial de sementes de mamona, perdeu sua hegemonia a partir de 1983, com o aumento gradativo da área de cultivo e da produção dos principais concorrentes, além das dificuldades de relacionamento comercial entre a indústria e o agricultor (SAVY FILHO, 2005).

A produção em escala comercial e tradicional da mamona no semi-árido brasileiro é concentrada no Estado da Bahia, onde na safra de 2003/2004 foram plantados mais de 140.000 hectares. A partir da safra de 2001/2002, graças ao grande interesse mundial pelas fontes renováveis de energia, para substituição gradual das fontes minerais originárias do petróleo, tornou evidente um programa nacional de estruturação da produção de mamona nos outros Estados do semi-árido brasileiro (BANDEIRA *et al.*, 2004). A mamoneira, por ser uma planta com capacidade de produzir satisfatoriamente bem sob condições de baixa precipitação pluviométrica, se apresenta como uma alternativa de grande importância para o semi-árido brasileiro. Nesta região, a cultura, mesmo tendo sua produtividade afetada, tem-se mostrado resistente ao clima adverso quando se verificam perdas totais em outras culturas, e serve desta forma, como uma das poucas alternativas de trabalho e de renda para o agricultor da região (SANTOS *et al.*, 2007).

1.2.1 – Produtos da mamona

A mamona possui destaque na economia devido à ampla variedade de produtos que pode fornecer. Estes produtos vão desde o óleo de rícino e seus derivados, até produtos gerados da extração deste óleo (SAVY FILHO, 2005).

Segundo o Banco de Desenvolvimento de Minas Gerais S/A, da mamona se aproveita tudo (Figura 3). As folhas servem de alimento para uma espécie de bicho da seda e a haste, além de celulose própria para a fabricação de papel, fornece matéria-prima para a produção de tecidos grosseiros. Além disso, as hastes e as folhas podem ser utilizadas na melhoria das características físicas e biológicas do solo, e a folha ainda serve para aumentar a secreção láctea das vacas (SANTOS *et al*, 2007). Porém os principais produtos derivados da semente de mamona são o óleo e a torta residual (da extração do óleo).

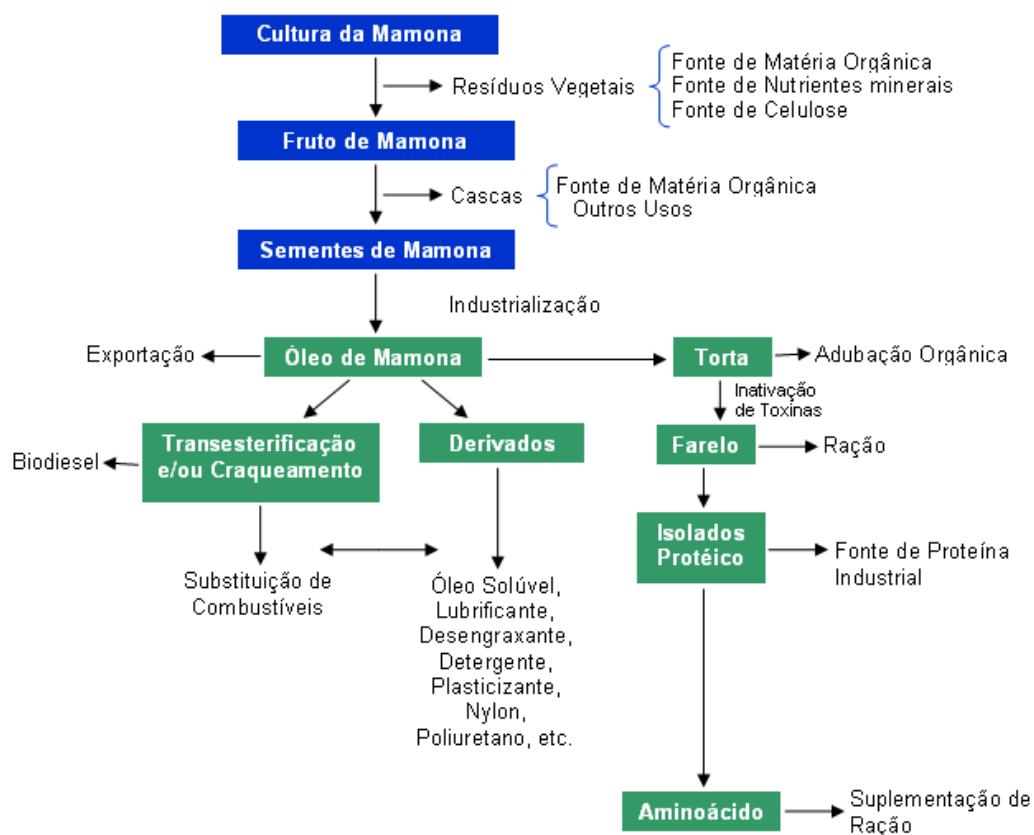


Figura 3. Agroindústria da mamona. Possibilidades de utilização (adaptado de Savy Filho, 2005).

O óleo da mamona tem uma estrutura química peculiar, predominando o ácido ricinoléico (Figura 4) em 90% de sua composição. As características do ácido ricinoléico são conferidas pela sua estrutura química, com grupo hidroxila no carbono 12 e dupla ligação entre os carbonos 9 e 10, sendo a única fonte comercial com essa singularidade. A hidroxila confere ao composto a estabilidade e a alta viscosidade, que são mantidas em larga faixa de condições de temperatura, ao contrário de outros óleos vegetais, que perdem viscosidade em altas temperaturas e se solidificam em baixas temperaturas, possuindo também estabilidade à oxidação (BORÉM & SAVY FILHO, 1999).

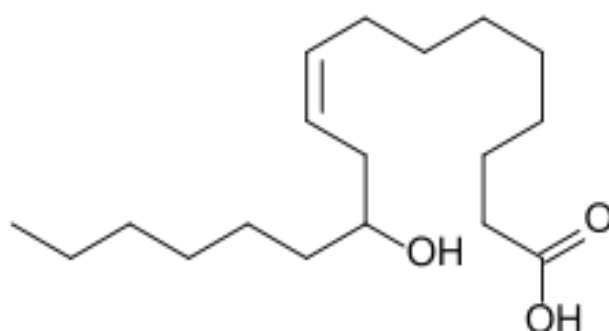


Figura 4. Estrutura do ácido ricinoléico.

O óleo extraído das sementes possui um mercado internacional crescente, garantido por cerca de 700 aplicações, que incluem desde o uso medicinal e produção de cosméticos até a substituição ao petróleo na fabricação de plásticos e lubrificantes (SAVY FILHO, 2005). O produto também é utilizado na fabricação de tintas e isolantes, na produção de fibra ótica, vidro à prova de balas e próteses ósseas. Pelas características exclusivas de queimar sem deixar resíduos e de suportar altas temperaturas sem perder a viscosidade (no que supera os óleos derivados do petróleo), é o óleo ideal para motores de alta rotação. Além disso, é indispensável para impedir o congelamento de combustíveis e lubrificantes de aviões e foguetes espaciais quando atingem baixíssimas temperaturas. Além destas aplicações, o óleo de mamona é empregado para a produção de corantes, anilinas, desinfetantes, colas e aderentes, tintas de impressão e vernizes. O óleo de mamona transformado em plástico, sob a ação de reatores nucleares, adquire a resistência de aço, mantendo a leveza da matéria plástica. Uma das aplicações

de grande valor econômico do óleo de mamona é na fabricação do nylon e da matéria prima plástica onde o seu emprego é importantíssimo na fabricação de espumas plásticas. O óleo confere ao material textura variável, desde a macia e esponjosa até a dura e rígida (FORNAZIERI, 1986).

As fábricas de óleo existentes industrializam toda a produção, obtendo-se como co-produto a torta de mamona.

1.2.2 – Torta de mamona

Após a extração do óleo por prensagem, uma massa orgânica conhecida como torta de mamona fica retida nos filtros (GHANDI *et al.*, 1994). A torta de mamona, antes considerada um subproduto da extração de óleo, é hoje um produto da mamona que desperta considerável interesse econômico (MORAIS & SILVA, 2008).

A torta de mamona pode ser utilizada como adubo orgânico, já que esta se constitui em um excelente fertilizante. Nestas condições a torta de mamona apresenta elevadíssima porcentagem de matéria orgânica e riqueza dos macronutrientes. A adição de torta de mamona no solo, com dosagens variando de acordo com a cultura, o tipo do solo e a disponibilidade de nutrientes, além de suprir as necessidades nutricionais das plantas aumenta o pH do solo, reduzindo a acidez total, eleva o conteúdo de carbono e promove melhoria geral na parte física do solo. A utilização da torta no solo, além de reduzir os nematóides e elevar o poder tamponante e a capacidade de troca de cátions do solo, tem propriedade de reduzir a densidade aparente do ambiente em todos os tipos de solos, o que interfere positivamente no crescimento e no desenvolvimento radicular, devido a melhor porosidade do solo, com mais rápida renovação adequada de oxigênio (SAVY FILHO, 2005).

Apesar de apresentar alto teor de proteínas totais (Tabela 1), não se recomenda o uso da torta *in natura* para ração, pois esta é tóxica devido à presença da proteína ricina, da ricinina e do complexo alergênico denominado nas décadas passadas de CB-1A (*Castor bean allergen*) que é uma mistura de proteínas de baixo peso molecular (YOULE & HUANG, 1978).

Tabela 1. Composição centesimal da torta de mamona (Souza, 1979).

Fração	Teor
Matéria seca	91,5%
Proteína bruta	42,5%
Fibra	20,04%
Cálcio	0,68%
Fósforo	0,78%
Extrato etéreo	4,23%

A ricinina é um alcalóide tóxico denominado 1,2-dihidro-4-metoxi-1-metil-2-oxo-3-piridinocarbonitrila ($C_8H_8N_2O_2$), sendo sublimável na temperatura de 152°C. Esse composto encontra-se na torta em menor quantidade, apresentando também uma menor toxidez em relação a ricina (BELTRÃO & LIMA, 2007).

Dos três componentes listados anteriormente, a ricina é a toxina mais potente e a maioria das tentativas de destoxificação da torta apontam para a eliminação desta proteína. As demais frações tóxicas e alergênicas são de baixa preocupação no que diz respeito à nutrição animal, seja pela sua baixa concentração ou pela baixa toxidez. Os alérgenos não afetam os animais alimentados com a torta. O maior problema relacionado à fração alergênica, formada por proteínas da família das albuminas 2S, é a manipulação da torta de mamona pelos trabalhadores, sendo assim métodos de detoxificação que também inativassem os alérgenos seriam de grande interesse industrial (FERNANDES & MACHADO, 2012).

1.3 – Componentes alergênicos e tóxicos

1.3.1 – Albuminas 2S de *Ricinus communis*

As albuminas 2S constituem o principal grupo de proteínas de reserva presente nas dicotiledôneas. Além de estar presente nas sementes de mamona, constituem também os principais alérgenos de nozes e sementes como castanha do maranhão, avelã, algodão e mostarda (BREITENEDER & RADAUER, 2004).

Em 1943, Spies e Coulson isolaram da semente de mamona uma fração protéica de baixo peso molecular, estável ao calor, que foi denominada CB-1A.

Em 1977, Li *et al* isolaram e caracterizaram uma proteína das sementes de *Ricinus communis* de baixo peso molecular com um alto teor de glutamina e um espectro não comum de UV que mostrou propriedades similares aqueles do alérgeno de *Ricinus communis*.

Em 1978 Youle e Huang concluíram que CB-1A era a albumina 2S de reserva caracterizada por Li *et al*. Em 1982, Sharief e Li sequenciaram uma proteína das sementes de *Ricinus communis* (Ric c 1), coeficiente de sedimentação 2S, constituída de duas subunidades unidas por pontes de enxofre. A menor contendo 34 aminoácidos (Ric c 1 leve) com massa molecular aparente de 4 kDa e a subunidade maior composta de 61 aminoácidos (Ric c 1 pesada) com massa molecular de 7 kDa.

Machado e Silva (1992) isolaram e sequenciaram uma segunda albumina 2S, denominada de Ric c 3, tendo massa molecular em torno de 11 kDa, presente no mesmo precursor (29 kDa) de Ric c 1. Dados bioquímicos e imunológicos foram encontrados para a presença de pelo menos nove frações diferentes de albumina 2S. Essas nove frações apresentam uma composição similar de aminoácidos, com alta quantidade de glutamina, além da similaridade na sequencia N-terminal. Sendo que sete destas proteínas apresentaram potencial alergênico (MACHADO *et al.*, 2003).

Vieira (2002) observou que ambas as isoformas isoladas do *pool* de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, mesmo após serem submetidas à desnaturação, são capazes de desencadear a desgranulação de mastócitos, indicando a presença de epítomos lineares nas duas isoformas. Félix *et al.* (2008) identificaram os peptídeos constituintes dos epítomos de albumina 2S ligantes de IgE, sendo quatro destes epítomos identificados na proteína Ric c1 e dois na proteína Ric c 3. Foram identificados resíduos de ácidos glutâmicos nos epítomos alergênicos de Ric c 1 e Ric c 3, e um tratamento utilizando aminoácidos livres foi usado para bloquear a ligação com IgE e a concomitante desgranulação de mastócitos, com sucesso (DEUS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A presença de proteínas alergênicas em sementes de mamona já é conhecida há muitos anos, no entanto, os tratamentos que são aplicados hoje para a torta de mamona se referem à destoxicação, mas são ineficientes para a desalergenização da torta (ANANDAN *etal.*, 2005). A fração alergênica é termicamente estável, não sendo eliminada com processos de cozimento

simples. Existem processos de destoxicação e eliminação da fração alergênica da torta de mamona por meio de cozimento seguido por extrusão, no qual, após ser aditivada com solução de hidróxido de sódio, a torta é processada em extrusoras, em pressão e temperaturas elevadas, durante poucos segundos (AZEVEDO & LIMA, 2001). Além disso, Carrielo-Gama (2006) mostrou que a utilização do reagente de *Woodward* é eficiente para a desativação de alérgenos, no entanto estes são métodos de alto custo para aplicação em escala industrial. Alérgenos da família das albuminas 2S estão presentes também em outros tipos de sementes e pólen de plantas como girassol, gergelim, amendoim e castanha, além de estarem também presentes em algumas fontes animais como peixe e camarão. Em algumas destas fontes, como camarão, soja, amendoim, peixes, poeira domiciliar, tabaco e macela, pode ocorrer reação cruzada entre estes alérgenos (FÉLIX *et al.*, 2008).

As albuminas 2S não são um perigo em potencial para a saúde de animais alimentados com torta de mamona, mas representam risco para o trabalhador rural que manipula este material, e também às famílias que residem próximo à área de plantio (DEUS-DE-OLIVEIRA & MACHADO, 2011).

1.3.2 – Ricinina

A ricinina é um alcalóide que atua na defesa vegetal, sendo sintetizado em maior quantidade em situações como danos mecânicos ou alta temperatura (MOSHKIN, 1986). Segundo Beltrão e Lima (2007), este alcalóide foi isolado pela primeira vez por Tuson, em 1864, e teve sua estrutura determinada por Henry, em 1949. A contribuição da ricinina à toxicidade da torta de mamona é muito pequena, por apresentar baixa atividade tóxica e estar presente em baixa concentração (CARVALHO, 1978). Moshkin (1986) afirma que a concentração de ricinina na semente aumenta de dentro para fora, ou seja, o endosperma contém uma pequena quantidade dela (30,8 mg/kg a 77,1 mg/kg), aumentando seu teor no tegumento da semente (257,6 mg/kg a 431,2 mg/kg) e apresentando uma concentração ainda mais elevada na cápsula (1664,4 mg/kg) (BELTRÃO & LIMA, 2007). Isto sugere uma possível importância da ricinina como defesa química contra predadores de sementes, já que está presente em maior quantidade no tegumento.

1.3.3 – Ricina

As sementes de *Ricinus communis* L. são conhecidas pela sua toxicidade há algum tempo. Este veneno vem sendo utilizado desde a antiguidade tanto na medicina popular, quanto em práticas criminosas de envenenamento. Segundo Olsnes (2004), Dixon, em 1887, já imaginava que a toxina da mamona fosse uma proteína, mas isso só foi realmente comprovado em 1913, por Kobert. O nome ricina foi dado por Stillmark em 1888. A ricina é uma das mais potentes fitotoxinas conhecidas e é classificada como uma proteína inativadora de ribossomos (RIP) do tipo 2 (OLSNES, 2004).

1.3.3.1 – Proteínas inativadoras de ribossomos

As RIPs apresentam papéis interessantes na história das ciências biomédicas, e a estrutura e o mecanismo de ação destas toxinas tem sido estudados intensamente desde 1970, quando foi visto que a ricina e a abrina (presente na semente de *Abrus precatorius*, vulgar olho-de-cabra) se mostravam mais tóxicas contra células cancerígenas do que contra células normais, sugerindo uma aplicabilidade na terapia anti-câncer (LIN *et al.*, 1970).

Desde então, diversas proteínas capazes de inativar ribossomos enzimaticamente foram caracterizadas. As RIPs apresentam atividade RNA N-glicosidase, assim, estas proteínas removem uma adenina em uma região de *loop* bem conservada no RNAr (STIRPE, 2013). Existem dois tipos de RIPs: as do tipo 1 (RIP 1) são monômeros, tais como a PAP (*pokeweed antiviral protein*), a tricosantina (de *Trichosantes kirilowii*), e a curcina, presente no pinhão manso (*Jatropha curcas*), que também é uma oleaginosa cogitada para a produção de biodiesel no Brasil. Atualmente existem mais de 50 RIPs 1 já conhecidas (GIRBÈS *et al.*, 2004); as RIPs do tipo 2 (RIP 2) são heterodímeros compostos de duas cadeias: um homólogo enzimático da RIP 1 (cadeia A) e uma subunidade lectina (cadeia B), que são unidas por ponte dissulfeto. Este grupo compreende proteínas altamente tóxicas como a abrina, a modicina, a nigrina, a ebulina e a ricina presente na mamona (STIRPE, 2013).

Uma RIP isolada de milho (WALSH *et al.*, 1991) apresenta uma estrutura incomum que não se enquadra perfeitamente em nenhuma das duas classificações. Ela é formada por uma cadeia homóloga às RIPs 1 e é ativada após a remoção de um curto segmento peptídico interno. Outro exemplo incomum é a JIP60 (Figura 5), da cevada, na qual a cadeia ativa está ligada a outro segmento sem função definida (REINBOTHE *et al.*, 1994). Inicialmente foi sugerida uma nova classificação para estas toxinas, como RIP 3, no entanto estas são consideradas exceções entre as RIP do tipo 1. Aquelas que possuem estrutura semelhante às RIP 2, mas sem função definida para a cadeia B, são classificadas como RIP 2. (STIRPE & BATELLI, 2006), que é o caso da nigrina (Figura 5), de *Sambucus nigra* (vulgar sabugueiro).

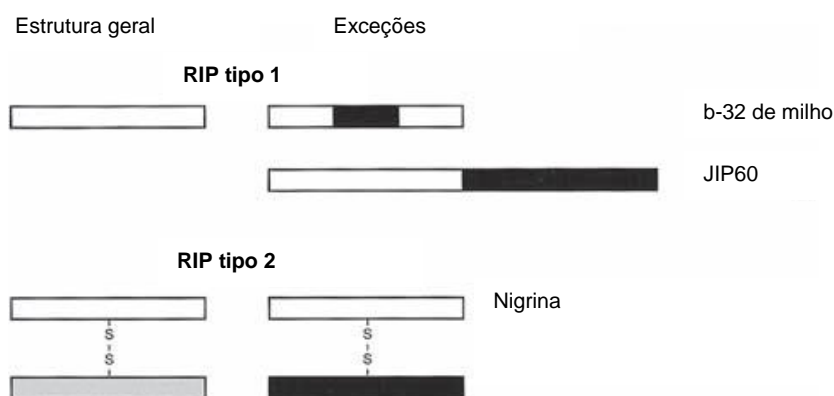


Figura 5. Estrutura das RIPs 1 e 2: cadeia ativa (barra aberta), cadeia lectina (barra cinza) e cadeia com função desconhecida (barra preta), e as pontes dissulfeto (-S-S-) (adaptado de STIRPE & BATELLI, 2006).

1.3.3.2 – Estrutura e função

A ricina é uma proteína encontrada exclusivamente no endosperma das sementes de mamona, não sendo detectada em nenhuma outra parte da planta. É uma proteína que consiste de duas partes funcionalmente diferentes, uma cadeia A (32 kDa), enzimaticamente ativa, e uma cadeia B (34 kDa) ligante de receptores, ligadas por uma ponte dissulfeto (Figura 6). Outras proteínas tóxicas também pertencem a essa família A-B de lectinas, como toxinas microbianas de difteria, *pseudomonas*, cólera, shiga e antrax (OLSNES *et al.*, 1999). No caso da toxina vegetal abrina (RIP 2 de *Abrus precatorius*),

existe uma grande similaridade entre a cadeia A desta com a da ricina (STIRPE, 2013).

Day *et al.* (1996) mostrou que na ricina, os resíduos Glu177 e Arg180, localizados no sítio ativo da cadeia A são particularmente importantes, e que mutações nestes resíduos provocam diminuição considerável da atividade enzimática. A sequência de aminoácidos da ricina foi determinada por Funatsu (1979).



Figura 6. Estrutura da ricina. A cadeia B está a direita (laranja), e a cadeia A está a esquerda (azul). O círculo vermelho indica a ponte dissulfeto (RUTENBER & ROBERTUS, 1991). Figura preparada através do programa MOI:MOI, por Korardi *et al.* (1996).

A cadeia A da ricina possui atividade catalítica (MOTANARO *et al.* 1973). Endo & Tsurugi (1987) apontaram a cadeia A como uma glicosidase, que remove um resíduo de adenina numa região de *loop* no RNA ribossomal (Figura 7), conhecida com α -sarcin/ricin *loop* (SRL). Esta região do RNAr modificada é essencial para ligação do fator de alongamento, sendo assim, os ribossomos modificados não podem dar suporte à síntese protéica (OLSNES *et al.*, 1975). A ricina é tão eficiente que uma molécula de cadeia A pode inativar cerca de 2000 ribossomos por minuto (OLSNES *et al.*, 1975). Assim, uma molécula de ricina inativa ribossomos numa velocidade em que a célula não pode acompanhar sintetizando novos (OLSNES, 2004).

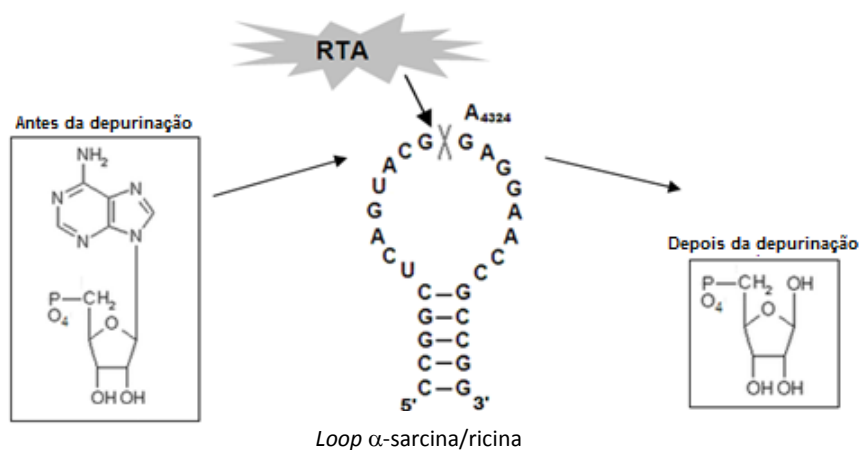


Figura 7. Loop de RNAr e o sítio de despurinação pela ação da ricina (RTA). A imagem esquematiza a remoção da adenina (A₄₃₂₄) pela atividade N-glicosidase da toxina. (Adaptado de: FERNANDES & MACHADO, 2012).

A ricina é mais tóxica para células animais do que para células vegetais, e em bactérias há uma resistência ainda maior, necessitando de uma concentração mais elevada de ricina para matá-las (ENDO *et al.*, 1991).

A cadeia B liga frações de β-D-galactopiranosídeo, e é a porção correspondente à lectina (OLSNES, 2004). A habilidade da ricina de ligação à galactose não é apenas necessária para a ligação aos receptores na superfície celular, mas também para ligação às moléculas intracelulares (YOULE *et al.*, 1981). Essa ligação é feita através de dois sítios globulares chamados 1α e 2γ. Ambos os sítios devem ser mutados para eliminar a atividade ligante de galactose (SPHYRIS *et al.*, 1995).

A ricina é sintetizada nas células do endosperma, e então quando a semente madura germina, as toxinas são destruídas por hidrólise dentro de poucos dias. A síntese é feita como uma única cadeia polipeptídica na célula, que posteriormente é clivada nas cadeias A e B. O seu precursor, apesar de ser capaz de se ligar à galactose, não faz despurinação SRL (RICHARDSON *et al.*, 1989).

1.3.3.3 – Internalização e rota intracelular

Após se ligar à superfície celular, a toxina penetra na célula por endocitose, o que ocorre numa taxa bem lenta, de cerca de 10% por hora (SANDVIG & VAN DEURS, 2000). A toxina endocitada é transportada para os endossomos, e daí uma parte da ricina retorna à superfície celular, outras são

degradadas por lisossomos, e só uma pequena quantidade da toxina chega ao destino final (OSLINES, 2004). Cerca de 5% da ricina endocitada é translocada até a rede *trans*-Golgi (VAN DEURS *et al.*, 1989), mas ainda não se sabe quais moléculas de superfície guiam a toxina para o complexo (LORD & SPOONER, 2011).

Uma vez no complexo de Golgi, a toxina precisa ser transportada para o retículo endoplasmático (RE). Algumas toxinas, como a da cólera, possuem uma sequencia C-terminal KDEL que direciona a toxina do Golgi para o retículo endoplasmático. Isto não acontece com a ricina. No entanto, acredita-se que a ricina se ligue, através da cadeia B, a um resíduo de galactose presente na glicoproteína calreticulina, que por sua vez apresenta uma sequencia KDEL na região C-terminal (OLSNES, 2004).

Após chegar ao retículo endoplasmático a separação das cadeias A e B (RTA e RTB) da holotoxina é catalizada por dissulfeto isomerase (MAJOUL *et al.*, 1997). Parte das moléculas de RTA é transportada para o citosol, aparentemente por um processo envolvendo o complexo Sec61 (LORD & ROBERTS, 1998). Este complexo está envolvido no transporte de proteínas mal enoveladas do RE para o citosol (PILON *et al.*, 1997). Também foi mostrado por Qing *et al.* (2012) que este transporte da RTA para o citosol é dependente de uma glicosilação do seu N-terminal ainda no RE. No citosol parte da toxina é degradada pelos proteassomas, e outra parte desempenha seu papel tóxico inativando ribossomos citosólicos (STIRPE & BATELLI, 2006).

1.3.3.4 – Outros problemas e aplicações da ricina

Uma utilização da ricina bem conhecida e muito temida é o bioterrorismo. Desde a antiguidade há relatos do uso da ricina e de outras RIPs em casos de homicídio. A ricina também já teve seu uso como arma estudado durante as duas guerras mundiais, visto que se trata de uma proteína solúvel em água e que poderia ser utilizada, por exemplo, para o envenenamento de tropas através da contaminação de fontes de água (ATLAS, 2002). Um caso mais recente ocorreu com uma carta enviada ao senador do Mississippi, Roger Wicker, em abril de 2013, contendo ricina, que foi interceptada pelos correios americanos em tempo (YAHOO NEWS, 2013). A intoxicação por ricina pode

ocorrer por diversos meios, como feridas expostas, contato com os olhos, inalação, ingestão e aplicação direta na corrente sanguínea, sendo que para causar a morte de um humano as formas injetadas e por inalação exigem uma quantidade menor ($LD_{50} = 22 \mu\text{g/kg}$) se comparado com a ingestão (20-30 mg/kg) (SAEIDNIA & ABDOLLAHI, 2013). Os sintomas da intoxicação por ricina geralmente consistem em diarreia, a qual pode progredir para hipotensão e disfunções renal e hepática, problemas neurológicos e cardiovasculares. A morte ocorre alguns dias depois por falência múltipla dos órgãos (AUDI *et al.*, 2005).

Já a utilização de toxinas no tratamento de tumores acontece desde a década de 70. Um exemplo mais comum é a utilização de RIPs do tipo 1 como imunotoxinas. Imunotoxinas correspondem a um composto no qual a toxina é conjugada a um anticorpo, hormônio ou fator de crescimento que vai direcioná-la até uma célula alvo, como por exemplo, uma célula cancerígena, que será alvo da sua ação tóxica (OLSNES, 2004). Esta tecnologia tem sido mais estudada com RIP 1 pela maior facilidade na construção dos conjugados se comparado com as RIP 2, que já possuem um cadeia B (STIRPE, 2013). Outros estudos envolvendo a ricina no tratamento de doenças, como acidentes vasculares e fadiga já foram realizados com sucesso (SMALLSHAW *et al.*, 2002). O grande impecilho que a utilização de imunotoxinas ainda apresenta é que estas moléculas são reconhecidas como estranhas pelo sistema imunológico, o que dificulta sua administração repetida, embora muitos estudos já estejam sendo realizados para tentar contornar este problema (STIRPE, 2013).

O uso das RIPs também vem sendo estudado como potencial uso na agricultura. A primeira RIP a mostrar atividade antiviral em plantas foi a PAP (*pokeweed antiviral protein*, de *Phytolacca americana*), que teve também sua eficiência demonstrada quando expressa em tabaco e *Agrostis spp* (LODGE *et al.*, 1993; DAI *et al.*, 2003). No caso da ricina, junto com a saporina foram as duas primeiras RIPs a mostrarem atividade tóxica contra larvas de insetos predadores (GATEHOUSE *et al.*, 1990), e daí por diante muitos trabalhos de transfecção de plantas com genes de RIPs foram realizados para aumentar a resistência contra predação (STIRPE, 2013). As propriedades de defesa das RIPs e da ricina vêm sendo cada vez mais estudadas, e atualmente sabe-se

que sua expressão é iniciada ou aumentada por fatores como eliciadores químicos (ácido jasmônico, ácido abscísico), infecção por vírus e fungos, e até mesmo fatores abióticos como estresse osmótico, temperatura e injúria mecânica (STIRPE, 2013).

1.3.3.5 – Métodos de detecção da ricina

Pelo fato da ricina ser considerada um potencial agente para o bioterrorismo a busca por métodos rápidos e sensíveis para detectar essa toxina começaram logo após os primeiros estudos que elucidaram o seu mecanismo de ação, sendo o ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) o primeiro ensaio aplicado na detecção de ricina (KOJA *et al.*, 1980). O ELISA para detecção de ricina foi melhorado desde então, (POLI *et al.*, 1994; SHYU *et al.*, 2002), com limites de detecção na faixa dos 5 ng/mL, e atualmente kits de ELISA específicos para detecção de ricina podem ser adquiridos comercialmente (GARBER *et al.*, 2005). Apesar disso, o ELISA possui uma série de desvantagens que o impedem de ser o melhor método de detecção de ricina, como o tempo alto que se consome entre as lavagens e o baixo rendimento. O ELISA também pode cair no “efeito gancho” (*hook effect*) em casos em que a concentração do antígeno é tão alta que acaba sendo superestimada (FERNANDES & MACHADO, 2012). Uma alternativa ao ELISA que aumentava consideravelmente a sensibilidade para detecção de ricina foram os ensaios imunomagnéticos (ver Figura 2 do Anexo 3). Gatto-Menking *et al.* (1995) usaram eletroquimioluminescência imunomagnética (IM-ECL) para detectar ricina e outros agentes tóxicos. Para isso, micro esferas conjugadas à anticorpos foram utilizadas para capturar o antígeno alvo e anticorpos marcados com rutênio foram utilizados como repórter. Todo o ensaio de IM-ECL pode ser realizado em 40 minutos e a sensibilidade para ricina é de 5 pg/mL, tendo chegado à 0,5 pg/mL após aperfeiçoamento da técnica (YU *et al.*, 2000).

A busca por métodos de detecção de agentes tóxicos levou pesquisadores a trabalharem tecnologias que pudessem não só detectar com precisão e rapidez uma única ameaça, mas também pudesse de uma só vez varrer a presença de diferentes agentes. Dessa forma o uso dos sistemas de

arranjo se difundiram e pesquisas para detecção de ricina também foram feitas nessa linha (WADKINS *et al.*, 1998). Usando o sistema de microarranjos foi possível detectar a presença de ricina, em misturas complexas contendo outros agentes tóxicos, numa concentração de 10 ng/mL em um ensaio feito em 15 minutos (DELEHANTY & LIGLER, 2002).

Aptâmeros são ligantes de ácidos nucleicos artificiais que podem ser gerados contra diferentes macromoléculas, inclusive proteínas. Assim, alternativamente ao uso de anticorpos em técnicas de reconhecimento de ricina, vários grupos vêm trabalhando na utilização destas moléculas para o reconhecimento da ricina (FERNANDES & MACHADO, 2012). Devido à sua alta termoestabilidade quando comparado aos anticorpos, os aptâmeros têm sido utilizados em sistemas analíticos como biosensores, e como agentes terapêuticos (JAMES, 2000).

Recentemente, com os avanços no uso de espectrometria de massas (MS), o uso desta técnica tem sido bastante explorada para detecção de agentes tóxicos como a ricina (FERNANDES & MACHADO, 2012). É possível identificar a presença da ricina baseada em fragmentos trípticos tanto da cadeia A quanto da cadeia B (em LC-ES MS/MS), assim como utilizando a holotoxina intacta (MALDI-MS) (FREDRIKSSON *et al.*, 2005). Também foi possível combinar uma triagem imunológica utilizando anticorpos específicos para detectar ricina em misturas complexas contendo inclusive outras proteínas (KULL *et al.*, 2010). O limite de detecção por MS gira em torno dos 50 ng/mL, o que não é tão ruim. O problema está no tempo de duração das análises que podem durar 5 horas, e a necessidade de um profissional especialista em espectrometria de massas (FERNANDES & MACHADO, 2012).

O imuno-PCR (IPCR) é até o momento o método mais sensível para detecção da presença de ricina, com um limite de detecção de 10 fg/mL (LUBELLI *et al.*, 2006). A técnica consiste primeiramente num ELISA (direto ou sanduíche), no qual o anticorpo secundário está complexado à biotina, que faz a ligação através da streptavidina com o DNA também complexado à biotina. O DNA ligado ao anticorpo (qualitativo para ricina) é então submetido à amplificação por PCR (ver Figura 3 do Anexo 3) (SANO *et al.*, 1992).

Um outro método que vem sendo usado em muitos trabalhos de destoxificação de torta de mamona para validar o processo é a eletroforese (ANANDAN *et al.*, 2005; GODOY *et al.*, 2009). Esta metodologia, no entanto, assim como os métodos já apresentados, detecta somente a presença da toxina, sem considerar a sua atividade biológica. Outros aspectos desfavoráveis à eletroforese são a baixa sensibilidade e o longo tempo de ensaio, que pode durar em torno de 4 horas.

Uma vez que os métodos baseados em reconhecimento por anticorpo ou detecção da presença da proteína por diferentes ensaios não elucidam a competência biológica da proteína, diversos outros métodos têm sido descritos para detectar a ricina baseando-se na sua atividade tóxica e depuradora de ribossomos (FERNANDES & MACHADO, 2012). O uso de lisado de reticulócitos de coelho para testar atividade aglutinante causada pela ricina é o método mais clássico e mais antigo encontrado na literatura (LUGNIER *et al.*, 1974). O lisado de reticulócitos também pode ser utilizado para medir a inibição da síntese proteica, em um ensaio onde RNAm é adicionado ao sistema, que fornece ribossomos e outros componentes necessários para a síntese proteica (ver Figura 4 do Anexo 3). Na presença da ricina, a tradução não ocorre devido à sua atividade N-glicosídica. Na ausência da toxina, a concentração de proteína sintetizada pode ser medida, por isso nesse tipo de ensaio geralmente é utilizada luciferase como sinal (LANGER *et al.*, 1996). Ensaio de inibição da tradução já foram inclusive utilizados para avaliar toxicidade da ricina submetida a tratamentos físicos e químicos para inativação (MEI *et al.*, 2006), mostrando que estes podem ser métodos interessantes para avaliar destoxificação de torta de mamona.

A atividade N-glicosídica da ricina remove uma adenina do SRL no ribossomo. Sendo assim, esta adenina liberada se tornou alvo de diversos métodos para detecção da atividade biológica da ricina, funcionando como um marcador positivo (FERNANDES & MACHADO, 2012). A detecção da adenina liberada pode ser feita de várias formas, no entanto as mais comuns são por HPLC e por MS (ZAMBONI *et al.*, 1989; BECHER *et al.*, 2007; KALB & BARR, 2009). A detecção da atividade “desadeniladora” pode também ser reconhecida por medidas indiretas a partir de produtos formados da adenina liberada, como no caso dos três fosfatos gerados durante a conversão à AMP (HEISLER *et al.*,

2002). Outros métodos de detecção da atividade biológica da ricina também dependem da depurinação do SRL. No entanto utilizam formas alternativas de detecção, não direcionadas para a adenina ou seus produtos. Keener *et al.* (2006) utilizaram um ensaio no qual um fragmento de RNA biotilado (correspondente em sequência ao SRL) foi clivado pela ação combinada da ricina com DMEDA (N,N'-dimetiletilenodiamina), e o fragmento foi anelado com um aptâmero conjugado à rutênio capturado por esferas magnéticas e permitindo a detecção por ECL, onde a quimioluminescência produzida é proporcional à fragmentos de RNA depurinados. A sensibilidade desse método é de 100 pg/mL.

Apesar dos métodos envolvendo liberação de adenina se mostrem eficazes na detecção da atividade biológica da ricina, este pode não ser suficiente ou apresentar falhas, visto que a depurinação não é o único mecanismo envolvido na citotoxicidade causada pela ricina. Já foi descrito que mutantes de RTA não tóxicos foram capazes de depurar ribossomos em células de levedura, sem que ocasionasse morte celular ou qualquer sinal de apoptose (LI *et al.*, 2007).

Para determinar a toxicidade da ricina em torta de mamona, uma forma utilizada são os modelos animais, uma vez que a alimentação animal é o foco dos processos de destoxificação. No entanto, devido à questões éticas que rodeiam o uso de modelos *in vivo* e também a estrutura necessária para manter os animais, esta prática se torna inviável para aplicação em série. Um ensaio *in vitro* baseado na citotoxicidade da ricina contra células Jurkat foi mostrado há alguns anos atrás, para detectar a toxina em matrizes alimentícias como leite, suco e café (BRZEZINSKI & CRAFT, 2007). As células foram cultivadas em placas de 96 poços e a toxina foi então inoculada. Após um período de incubação alíquotas das culturas tratadas foram utilizadas para a validação da citotoxicidade utilizando um ensaio para atividade de lactato desidrogenase (LDH), disponível comercialmente em kit. O ensaio se mostrou eficiente para detectar ricina de 10-100 pg/mL, dependendo da matriz utilizada para diluir a toxina. A inclusão de anticorpos anti-ricina no ensaio também mostram que é possível inibir a atividade tóxica da proteína de forma a utilizar este método como um indicador qualitativo específico para a ricina. Assim, a possibilidade de utilizar cultura de células para avaliar a toxicidade da ricina

parece um meio eficiente para testar material oriundo de processos de destoxificação, uma vez que apresenta bom limite de detecção e ainda mostra a atividade da toxina na célula. A possibilidade de métodos baseados em cultura de células é bem grande, e novos ensaios utilizando outras linhagens celulares devem ser desenvolvidos para melhor atender às necessidades (FERNANDES & MACHADO, 2012).

1.3.3.6 – Eliminação da ricina na torta de mamona

O óleo de mamona não possui ricina, pois toda a proteína da semente permanece na torta após o processo de extração. Os níveis de ricina na semente podem variar entre os genótipos de mamona produzidos pelos programas de melhoramento (PINKERTON *et al.*, 1999). Entre os genótipos mais cultivados no Brasil os níveis desta toxina variam entre 1,4% a 4,5% das proteínas totais na semente (FERNANDES, 2008).

A transformação da torta de mamona em um produto atóxico, que possa ser usado para alimentação animal já vem há muito tempo despertando a atenção de diversos pesquisadores no mundo, tendo-se obtido alguns resultados satisfatórios embora alguns passos tecnológicos ainda necessitem ser melhorados para que o produto possa tornar-se economicamente viável (OLSNES, 2004). Em virtude de sua baixa estabilidade térmica e da solubilidade em água, os processos físicos tais como cozimento e autoclavagem foram os mais explorados para destoxificação da torta de mamona durante o século XX (BELTRÃO & LIMA, 2007). Os primeiros trabalhos de destoxificação da torta de mamona, realizados por Ambekar e Dole (1957), utilizaram aquecimento da torta por 3 horas à 150 °C, e não foi eficiente em eliminar a toxicidade, uma vez que ratos alimentados com este material acabaram morrendo. A autoclavagem também foi utilizada em algumas situações para destoxificação de torta de mamona (PURUSHOTHAM *et al.*, 1986; ANANDAN *et al.*, 2005). No entanto algumas condições testadas não foram eficientes, pois animais alimentados com a torta autoclavada tiveram ganho de peso bem abaixo da média. Embora alguns processos físicos se mostrem promissores (ANANDAN *et al.*, 2005), ainda é necessário reavaliar a destoxificação utilizando métodos biológicos. Além disso, estes processos

(autoclavagem e aquecimento), não apresenta viabilidade para aplicação em escala industrial devido o seu alto custo. Vilhjálmsdóttir e Fisher (1972) conseguiram resultado satisfatório quando submeteram a torta de mamona à lavagem com água (4 vezes por 10 minutos numa proporção 1:5). No entanto, para conseguir bons resultados de nutrição, foi necessário suplementar a torta lavada com lisina e triptofano, e o processo de extração com água acaba gerando mais um resíduo tóxico, que seria a própria água da lavagem.

Tratamentos químicos para remoção da ricina na torta de mamona também já foram realizados utilizando óxido de cálcio (ANANDAN *et al.*, 2005; GOWDA *et al.*, 2009; DINIZ *et al.*, 2011). No entanto estes trabalhos não mostram o que de fato ocorre com a ricina após o tratamento, e utilizam a torta tratada para alimentação animal sem um ensaio prévio de atividade tóxica da proteína, como os já citados anteriormente. Além disso, só a presença da ricina foi avaliada nestes trabalhos, enquanto a presença dos alérgenos foi ignorada.

A ação de metalo-proteases (induzidas pelo esmagamento da semente) na degradação da ricina durante o período de armazenagem da torta também se mostrou uma forma eficiente de destoxificação deste resíduo. É possível que estas proteases tenham origem na própria semente ou até mesmo que sejam produzidas por microrganismos presentes no material (CRESPO-NETO, 2009).

Sabe-se ainda que alguns processos biológicos vêm sendo utilizados para destoxificação de rejeitos agroindustriais, inclusive de mamona. Os resíduos da produção de biodiesel a partir de sementes de mamona (Petrobras, patente PI0105888-6) proporcionou um substrato potencial para a produção de lipases por *Penicillium simplicissium*, ao mesmo passo que mostrou os primeiros sinais de redução nos níveis de ricina utilizando a fermentação em estado sólido (GODOY *et al.*, 2009). Neste trabalho foi observada uma redução nos picos cromatográficos referentes à massa da ricina (em coluna de exclusão molecular Sephadex G-50), e um acúmulo de peptídeos de baixa massa molecular, possivelmente gerados da degradação de proteínas maiores. A presença da ricina no rejeito fermentado também foi avaliado por eletroforese, que indicou ausência total da toxina. No entanto, nenhum teste de atividade biológica foi realizado a fim de mostrar se níveis não detectáveis da toxina ativa estavam presentes. Somente em 2012, Godoy *et al.*

realizaram uma melhoria do processo e fez a avaliação da atividade tóxica através de ensaio de citotoxicidade. Sendo assim, observa-se que os tratamentos químicos e a fermentação em estado sólido como métodos promissores na eliminação da ricina na torta de mamona.

No presente trabalho visou-se padronizar um ensaio de citotoxicidade para ricina a fim de usá-lo na determinação de atividade tóxica em torta de mamona submetida à processos de destoxificação. O uso de compostos de cálcio para destoxificação da torta de mamona e desativação da ricina purificada para estudos de mecanismo de ação também serão abordados, uma vez que a maioria dos estudos envolvendo destoxificação não procuram elucidar o mecanismo à nível estrutural. Por fim, serão aprofundados os estudos prévios feitos com fermentação em estado sólido para destoxificação da torta de mamona, utilizando um fungo de status GRAS (*generally recognized as safe*).

1.4 – Fermentação em estado sólido

O termo fermentação em estado sólido (FES) denota o cultivo de microrganismos em substratos sólidos umedecidos na ausência de uma fase aquosa livre (PANDEY, 2003). No entanto, o substrato deve apresentar umidade adequada para manter o crescimento e o metabolismo do microrganismo, sem exceder a capacidade de retenção máxima de água pela matriz. A FES se assemelha ao habitat natural dos microrganismos e, portanto, é uma escolha interessante para estes crescerem e gerarem produtos de interesse tecnológico (Figura 8). A matriz sólida utilizada no processo pode ser tanto a fonte de nutriente, quanto simplesmente um suporte impregnado com os nutrientes adequados ao desenvolvimento do microrganismo (DURAND *et al.*, 1997).

Apesar de ainda ser menos difundida no ocidente, a FES é amplamente utilizada nos países asiáticos, principalmente na indústria de alimentos fermentados. Enzimas e metabólitos microbianos também são produzidos através desta tecnologia, que já vem sendo utilizada há milhares de anos (HÖLKER & LENZ, 2005). Nos países ocidentais, a FES enfrenta os avanços técnicos da fermentação submersa (FS), que foi amplamente aprimorada e

difundida em função do seu intenso uso para a produção de antibióticos durante a Segunda Guerra Mundial (HÖLKER & LENZ, 2005).

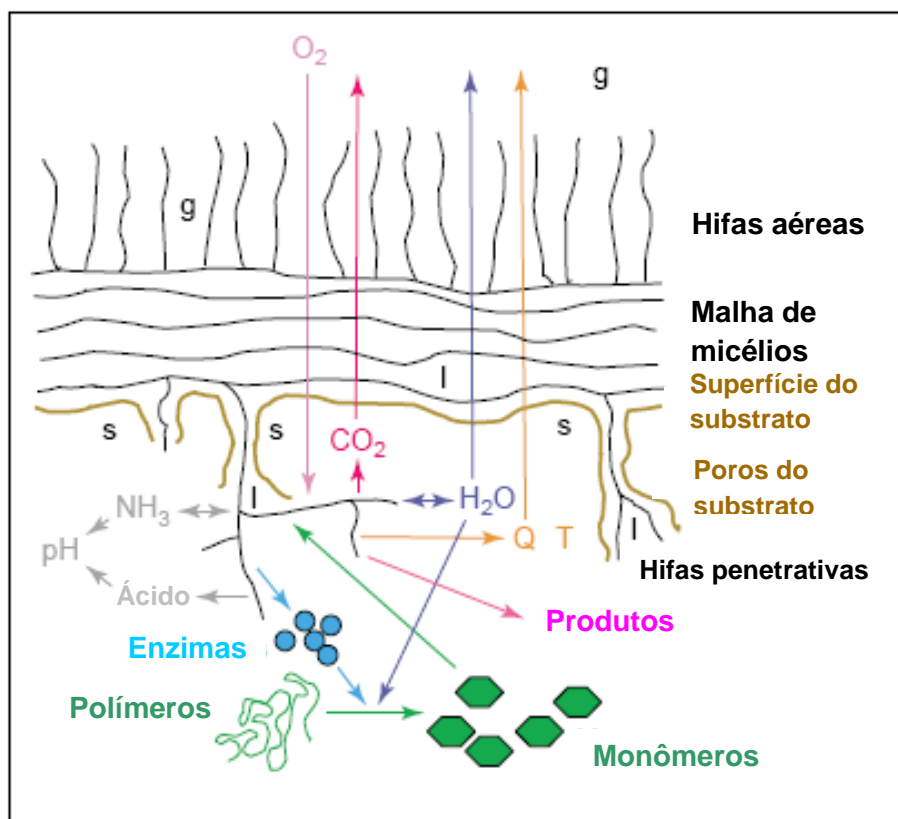


Figura 8. Esquema de alguns dos processos, em microescala, que ocorrem durante a fermentação em estado sólido. Após a esporulação, as hifas do fungo se desenvolvem em um emaranhado micelial (preto), o qual se espalha sobre a superfície da partícula utilizada como substrato sólido (marrom). Da malha de micélios crescem hifas tanto para o espaço gasoso quanto em direção do substrato penetrando os poros. Em níveis normais de umidade, os espaços vazios entre as hifas aéreas são preenchidos por gás (g), enquanto os espaços vazios na malha de micélios e dentro do substrato são preenchidos com líquido (l). As atividades metabólicas mostradas ocorrem principalmente próximo à superfície do substrato e dentro dos poros. No entanto, regiões expostas do micélio (como as hifas aéreas) também apresentam metabolismo e pode haver o transporte de substâncias das hifas penetrativas para as aéreas. Enzimas hidrolíticas (azul claro), as quais são produzidas pelo micélio, se difundem para a matriz sólida e catalisam a degradação de macromoléculas em unidades menores (verde). Estas serão mais tarde utilizadas como nutrientes para os fungos. O O_2 é consumido e o CO_2 , H_2O , calor e produtos de interesse bioquímico são produzidos durante a fermentação. Por isso o desenvolvimento de gradientes dentro do biofilme que, por instância, força o O_2 a difundir-se da fase gasosa para dentro de regiões mais profundas (rosa) e o CO_2 a difundir-se destas regiões para para a fase gasosa (vermelho). A geração de calor (Q; laranja) leva a um aumento na temperatura (T), a qual representa um sério problema durante a FES. O calor é portanto removido do substrato não somente por condução, mas também por evaporação, que é parte do balanço complexo da água no sistema (azul escuro). Além da evaporação, o balanço hídrico induz a captura de água pelo micélio no seu crescimento, consumo desta durante as reações de hidrólise e produção através da respiração. Como outro fator importante, o pH local poderia ser alterado pela liberação de ácidos carbônicos e pela troca de amônia (cinza). Os produtos de interesse (magenta) que são liberados na matriz sólida e espaços aquosos durante a fermentação poderiam ser absorvidos pelo substrato sólido e então extraídos para uso futuro no fim do processo. Todos estes e muitos outros fenômenos podem influenciar fortemente o processo durante a FES. (adaptado de HÖLKER & LENZ, 2005)

Durante 1950-1960 foi visto o uso de cultura de fungos para a transformação de esteróides e relatos da produção de micotoxinas utilizando FES, e durante 1960-1970 os avanços na área permitiram que a técnica voltasse a conquistar espaço (SINGHANIA *et al.*, 2009). Outro ponto importante no aumento da utilização desta tecnologia foi o seu uso no enriquecimento proteico de ração para gado, utilizando resíduos agroindustriais, oferecendo então um processo único para agregar valor à estes resíduos de baixo custo e até então considerados como poluentes (SINGHANIA *et al.*, 2009).

Existem diferenças significativas entre os processos de FES e FS (Tabela 2). A principal diferença entre FES e FS é a quantidade de água livre no meio de cultivo. Na FS, a quantidade de sólidos não ultrapassa 50g/L, enquanto na FES o conteúdo de sólidos varia de 20 a 70% do peso total. Assim, a FES é um processo que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre (MITCHELL *et al.*, 2002).

As características da FES conferem a este processo diversas vantagens sobre a fermentação submersa. Uma das principais vantagens da FES é a utilização de meios de cultura simples, compostos de materiais de origem vegetal, como farelos e cascas de arroz, trigo, milho e outros cereais, necessitando de poucos nutrientes adicionais ao meio. Isso possibilita a utilização de resíduos agro-industriais como substrato, representando, em países como o Brasil, matéria prima abundante e de baixo custo (GRAMINHA *et al.*, 2008).

Devido ao baixo teor de umidade e à ausência de água livre no meio, a probabilidade de contaminação por bactérias é reduzida. A pequena quantidade de água empregada na FES também implica em vantagens, tais como menor volume de meio reacional; menor espaço requerido para os fermentadores em relação ao rendimento do produto; e maior concentração do produto (HÖLKER & LENZ, 2005).

Dentre as características da FES, a baixa atividade de água (A_w) do meio de cultivo sólido influencia nos aspectos fisiológicos dos microrganismos, tais como no seu crescimento vegetativo, esporulação, germinação de esporos, produção de enzimas e atividade enzimática (GRAMINHA *et al.*, 2008). Muitas vezes, essa diferença na fisiologia do microrganismo leva a obtenção de produtos com características mais interessantes. Esporos fúngicos produzidos

por FES são mais estáveis, resistentes à desidratação e possuem uma taxa de germinação maior do que quando produzidos por FS (HÖLKER & LENZ, 2005).

Tabela 2. Principais diferenças entre a FES e a FS (adaptado de Mitchell & Lonsane, 1992).

Fermentação no Estado Sólido	Fermentação Submersa
Meio de cultivo sem fase líquida	Meio de cultivo com fase líquida
Substratos insolúveis em água	Substratos solúveis em água
Água presente no meio apenas na quantidade necessária para o crescimento do microrganismo	Grande quantidade de água
A absorção de nutrientes ocorre a partir do substrato sólido umedecido	Ocorre a absorção de nutrientes dissolvidos no meio líquido
Presença de gradientes de calor, nutrientes, produto e O ₂	Calor, nutrientes, produto e O ₂ uniformemente distribuídos
Apresenta fases sólida, líquida e gasosa	Apresenta fases líquida e gasosa
Fase líquida descontínua	Fase líquida contínua
Maiores concentrações de inóculo	Menores concentrações de inóculo
Aeração disponibiliza O ₂ e remove o calor metabólico e os produtos gasosos	Aeração disponibiliza O ₂ e remove os produtos gasosos, mas o calor metabólico é removido por dispositivos específicos para troca de calor
Agitação facultativa	Agitação geralmente essencial
Produtos mais concentrados	Produtos menos concentrados
O crescimento fúngico envolve a penetração das hifas no substrato sólido	O crescimento fúngico ocorre na forma de micélios individuais ou em aglomerados uniformemente distribuídos no meio agitado
Bactérias e leveduras crescem aderidas ao substrato sólido	Bactérias e leveduras crescem distribuídas uniformemente no meio agitado

A FES também pode, em alguns casos, ser economicamente mais interessante na produção de enzimas (lipases). Castilho *et al.* (2000) realizaram uma análise econômica da produção de lipase por *Penicillium restrictum* tanto por FES quanto por FS. Os autores relatam que o investimento total necessário para a produção de lipase por FS foi 78% maior do que o

necessário para produção por FES devido, principalmente, ao custo do meio de cultivo.

Apesar das inúmeras vantagens da FES em relação à FS, observa-se que a FES é um sistema heterogêneo, onde a distribuição de nutrientes e oxigênio, a concentração de produto e o crescimento não são uniformes por todo meio e a utilização de agitação requer elevados gastos de energia. Adicionalmente, a heterogeneidade do meio implica em dificuldades de monitoramento e o controle de parâmetros muito importantes para o processo fermentativo, como a temperatura, pH, umidade e oxigênio. Quanto aos tipos de microrganismos utilizados, existe também uma certa restrição devido a baixa concentração de água livre no meio de cultura (PANDEY, 2003).

Muitas bactérias, leveduras e fungos filamentosos crescem em substratos sólidos, dando origem a diversos produtos de interesse. Porém entre os microrganismos estudados, os fungos filamentosos são os mais adaptados a este sistema (MITCHELL & LONSANE, 1992). Os fungos filamentosos possuem uma grande facilidade de se adaptar à FES devido principalmente ao seu crescimento em forma de hifas e às suas características fisiológicas. A penetração de hifas permite uma maior acessibilidade aos nutrientes do que no caso dos microrganismos unicelulares, reduzindo a distância em que os processos de difusão devem ocorrer. Isso é de grande importância, principalmente nos estágios finais da fermentação, quando os nutrientes da superfície encontram-se esgotados (MITCHELL & LONSANE, 1992; MITCHELL *et al.*, 2002). A ausência de água livre é outro fator que influencia positivamente o crescimento de fungos filamentosos em substrato sólido (PANDEY, 2003).

A grande maioria dos substratos usados para FES é de origem agro-industrial, e estes podem ser divididos em três grupos: substratos que possuem amido como principal fonte de carbono, como resíduo de batata doce, farelos de trigo e de arroz, e farinhas de milho, de mandioca e de banana; substratos que possuem celulose e lignocelulose como principal fonte de carbono, como palha de trigo, polpa de beterraba e restos de madeira; e substratos que possuem açúcares solúveis como principal fonte de carbono, como forragem, açúcar de beterraba e resíduo de abacaxi (MITCHELL *et al.*, 2002).

Mal interpretada como “sistema de baixa tecnologia”, a FES parece ser promissora para a síntese de produtos de “alto custo e pequeno volume” como biofármacos, por exemplo. Embora a FES tenha sido desenvolvida para a manufatura de produtos tradicionais, como alimentos e bebidas fermentadas, sua aplicação, atualmente, tem se estendido às indústrias farmacêuticas e bioquímicas, destacando-se alguns produtos e processos como enzimas, ácidos orgânicos, etanol, biogás, antibióticos, surfactantes, toxinas, agentes de bioremediação, cogumelos comestíveis, polissacarídeos microbianos, biopesticidas, enriquecimento proteico de alimentos fermentados, pré-digestão de rações animais, e variações dos tradicionais alimentos fermentados (MITCHELL *et al.*, 2000; PANDEY, 2003).

Os processos de FES oferecem vantagens potenciais na biorremediação e na destoxificação biológica de compostos tóxicos (PANDEY *et al.*, 2000). No que diz respeito a destoxificação de rejeitos, seja com a intenção de aproveitá-los na alimentação animal ou de simplesmente eliminá-los de forma segura, a FES vem se apresentando como uma arma em potencial. O gossipol, um pigmento polifenólico tóxico que se apresenta como um limitante para a utilização da torta de algodão para a alimentação animal, pode ser eliminado por FES utilizando-se o fungo *Candida tropicalis* ZD-3 (ZHANG *et al.*, 2007). Rejeitos de café submetidos a FES utilizando-se cepas do fungo *Rhizopus* sp. tiveram 57% e 87% de redução nos níveis de taninos e cafeína, respectivamente (LEIFA *et al.* 1999).

Recentemente foi mostrado que o processo de fermentação em estado sólido pode ser uma forma eficiente e barata de eliminação da ricina presente em rejeitos de mamona. Godoy *et al.* (2009) mostrou que durante a produção de lipase por FES os níveis desta toxina foram reduzidos a zero. O utilizado não foi a torta, e sim o resíduo de mamona originado da produção de biodiesel patenteada pela Petrobras (PI0105888-6). Diferente da torta de mamona, este não é um co-produto clássico da extração do óleo. Dessa forma, a utilização da torta de mamona tradicional como substrato para a FES seria interessante, visto que existe a possibilidade da eliminação das toxinas presentes através deste processo. Além disso, a escolha do microrganismo também é outro fator importante, visto que a destoxificação do material poderia torná-lo interessante para aplicação em alimentação animal. A escolha de um microrganismo de

status GRAS como por exemplo o fungo *Aspergillus niger*, talvez seja a mais adequada neste caso.

1.5 – *Aspergillus niger*

O fungo filamentoso *Aspergillus niger* é utilizado na pesquisa e na indústria há algumas décadas. Sua importância foi mostrada em 1919, quando sua habilidade de produção de ácido cítrico foi explorada. No entanto, desde 1960 *A. niger* vem sendo utilizado para a produção de várias enzimas utilizadas em especial na indústria de alimentos (SCHUSTER *et al.*, 2002).

Como descrito por Reiss (1986), *A. niger* é capaz de crescer em ampla faixa de temperatura (6-47 °C), com um ótimo entre 35-37 °C. A atividade de água limite para o crescimento é 0,88, a qual é relativamente alta se comparada com outras espécies de *Aspergillus*. A faixa de pH em que *A. niger* cresce também é bem ampla, variando entre 1,4-9,8. Estas habilidades e a abundante produção de conídiosporos, os quais são distribuídos pelo ar, garantem a ocorrência da espécie em vários lugares, principalmente nos mais quentes e úmidos (REISS, 1986).

O ácido cítrico é um dos principais produtos obtidos através de *A. niger*, sendo um importante acidulante utilizado na indústria de alimentos e bebidas. Este possui ainda aplicação na indústria farmacêutica, produção de detergentes, couro sintético, entre outras aplicações (SCHUSTER *et al.*, 2002).

A produção de enzimas por *A. niger* teve início com a pectinase, protease e amiloglucosidase (FROST & MOSS, 1987). Outras enzimas de importância econômica também são produzidas pelo fungo, como lipases (DANTAS & AQUINO, 2009), amilases (ROSÉS & GUERRA, 2009) e celulasas (VILLENNA & GUTIÉRRES-CORREA, 2006).

A. niger é considerado um microrganismo GRAS. Isto está documentado em listas de organizações responsáveis pela segurança e saúde, a exemplo da *Berufsgenossenschaft der Chemischen Industrie* (1998). Em casos raros, quando pessoas são expostas intensivamente à esporos, podem ocorrer reações de hipersensibilidade (SCHUSTER *et al.*, 2002). Quanto à toxicidade para animais, sabe-se que nem a inalação (BHATIA & MOHAPATRA, 1969)

nem a ingestão (NYIREDY *et al.*, 1975) de grandes doses de esporos induzem micoses em animais.

Apesar da longa história e intensivos estudos sobre a natureza de *A. niger*, somente poucos casos de formação de toxina por este fungo foram documentadas. No entanto, em nenhum destes casos foi provada a produção de aflatoxinas. Quanto à ocratoxina A, uma micotoxina nefrotóxica e carcinogênica, alguns estudos confirmam que pode ser produzida por algumas espécies de *Aspergillus*, entre estas, *A. niger*, quando cultivado sob as condições para produção desta toxina (ABARCA *et al.*, 1994). Uma série de nafto- γ -pironas, produzidas por algumas cepas de *A. niger*, atuam como agentes tóxicos ao sistema nervoso central dos vertebrados. No entanto, estes metabólitos secundários não são considerados micotoxinas, uma vez que não apresentam toxicidade quando administrados por rota natural, e sim quando administrados por injeção intraperitoneal (SCHUSTER *et al.*, 2002).

Uma outra aplicação para *A. niger* é a destoxificação de resíduos. Birk *et al.* (1996) utilizou o fungo, através de FES, para eliminar o cianeto presente em uma variedade de mandioca, conhecida vulgarmente como mandioca-brava (*Manihot esculenta*). O processo reduziu o conteúdo de cianeto em 95% e aumentou o conteúdo protéico em 50%. Um outro exemplo é a remoção de metais pesados, como o cromo, em efluentes dos moinhos de curtimento de couro, através da biosorção por *A. niger*. Os resultados mostraram uma remoção de mais de 75% do cromo, e foi visto que este metal se acumulava nos micélios do fungo (SRIVASTAVA & THAKUR, 2006. Ehren *et al.* (2009) mostrou que uma enzima proteolítica produzida por *A. niger*, a aspergillopepsina (ASP), pode ser utilizada como um destoxicante para intoxicações causadas por glúten, já que a protease em questão favorece a digestão desta proteína.

OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

2.1 – Gerais

Padronizar um ensaio de citotoxicidade para detecção de ricina que possa ser utilizado para avaliar a eficiência de processos de destoxificação com fermentação no estado sólido e tratamento químico com óxido, hidróxido e carbonato de cálcio, e também avaliar o efeito do óxido e do hidróxido de cálcio sobre a atividade biológica da holotoxina.

2.2 – Específicos

- Padronizar um ensaio de citotoxicidade para detecção de ricina em cultura de células Vero, determinando dose mínima e melhor tempo de resposta.
- Utilizar a torta de mamona como substrato para crescimento de *Aspergillus niger* e em seguida verificar a presença da ricina ou qualquer atividade tóxica no material fermentado.
- Utilizar compostos de cálcio (óxido, hidróxido e carbonato) como tratamento químico da torta de mamona visando sua destoxificação, e avaliar a atividade tóxica da ricina por ensaios de citotoxicidade.
- Reproduzir o tratamento químico com compostos de cálcio na ricina purificada (holotoxina) a fim de elucidar o mecanismo pelo qual a toxina é desativada.

MATERIAL & MÉTODOS

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios biológicos para ricina foram realizados em colaboração com a Dr^a. Nilgun Erekem Tumer, no Departamento de Biologia e Patologia Vegetal (*Department of Plant Biology and Pathology*) da Rutgers University, em New Brunswick, NJ, Estados Unidos. A parceria foi estabelecida devido à ampla experiência da Dr^a. Tumer com mecanismo de ação de RIPs, incluindo ricina, e pela disponibilidade da toxina purificada, obtida comercialmente pelo seu grupo. Também foi feita a colaboração com o Dr. Edésio José Tenório de Melo, do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF, para os experimentos de citotoxicidade realizados nesta universidade.

As células, da linhagem Vero (células aderentes epiteliais de rim de *Chlorocebus sabaues*, popular Macaco Verde ou *Green Monkey*), foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² (TPP/90025), em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle media*) suplementado com 5% de soro fetal bovino. Para os testes de citotoxicidade, as células da cultura em monocamada foram desprendidas da garrafa pelo uso de uma solução de tripsina (tripsina 0,5 mg/ml + EDTA 0,2 mg/ml). Primeiramente o meio de cultura antigo foi removido e a garrafa lavada por 3 vezes com 2 mL de PBS pH 7,0, e então foi feito o desprendimento das células com 1 mL da solução de tripsina incubada por 1 minuto à 37°C. Foram adicionados 6 mL de meio de cultura na garrafa com as células em suspensão e a contagem foi feita em microscópio óptico invertido. Uma concentração de aproximadamente 4×10^3 células foi incubada em cada poço numa placa de cultura de 96 poços. A placa foi mantida à 37°C por 24-48 horas até que as células estivessem em estágio de monocamada para a incubação com a toxina.

Para estabelecer a menor dose letal de ricina para as células Vero, foram utilizadas diferentes concentrações da holotoxina, diluída em tampão PBS pH 7,0. As concentrações testadas foram 100 µg, 10 µg, 1 µg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg e 10 pg por mL. Estes valores são referentes à concentração final de ricina por poço na placa de cultura, num volume final de 100 µL por poço. As células incubadas com ricina foram mantidas em câmara de cultivo à

37°C por 48 horas. A contagem de células, feita em microscópio óptico invertido (Axiolplan – Zeiss), foi realizada a cada 12 horas de incubação (em 12, 24, 36 e 48 horas), afim de determinar o número de células vivas (aderidas à placa) após a incubação da ricina. Outro método utilizado para determinar a citotoxicidade da holotoxina foi a dosagem da atividade de lactado desidrogenase (LDH), após 48 horas de incubação da toxina. Para isso, foi utilizado um kit comercial (*Cytotoxicity Detection Kit*, LDH – Roche Applied Bioscience), e foram utilizados os procedimentos descritos no protocolo de uso do produto. Assim, em uma placa de 96 poços, 100 µL da solução do kit de citotoxicidade (Catalisador = diaforase/NAD⁺; Solução reveladora = Cloreto de iodotetrazólio e lactato de sódio) foram adicionados à 100 µL de cada solução teste (meio de cultura das células incubadas com: ricina; Triton X-100 2% como controle positivo; PBS pH 7,2 como controle negativo). A placa foi mantida por 30 minutos na ausência de luz para que as reações ocorressem. Em seguida, a leitura colorimétrica das amostras foi feita em leitor de placas (Thermo Plate) à 492 nm. A citotoxicidade foi determinada utilizando os valores de absorvância na seguinte fórmula:

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = \frac{\text{valor do experimento} - \text{controle negativo}}{\text{controle positivo} - \text{controle negativo}} \times 100$$

Todos os experimentos para cada uma das amostras foram realizados em triplicata.

Como controle qualitativo do ensaio, nós verificamos a utilização de anticorpos, do tipo IgG, anti-cadeia A de ricina (Santa Cruz Biotecnologia), a fim de bloquear a atividade tóxica da proteína, identificando a ricina como agente indutor da citotoxicidade. Para isso utilizamos uma concentração final de 8 µg de anticorpo em cada poço da placa contendo células incubadas com ricina ou torta extrato proteico de torta de mamona.

3.2 – Tratamentos da ricina purificada com compostos de cálcio

Foram utilizados nestes ensaios o óxido de cálcio (CaO) e o hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂], primeiramente em diferentes concentrações, afim de determinar uma dose mínima em caso de resultados positivos para desativação da ricina. As seguintes concentrações foram utilizadas: 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,6%, 0,3%, 0,15% e 0,075%, dos compostos de cálcio diluídos em tampão PBS pH 7,0. A holotoxina foi incubada com as soluções de cálcio e PBS puro (controle) na proporção de 1:1 (v/v). A mistura foi mantida em agitação por 12 horas à 4 °C. Posteriormente, cada amostra foi centrifugada por 1 minuto à 1.500 g, e o sobrenadante foi coletado e incubado nas células em duas concentrações finais, de 50 ng/mL e 1 µg/mL. A determinação da citotoxicidade foi feita pelo ensaio enzimático, como descrito anteriormente, após 48 horas de incubação nas células Vero. Também foi verificada a presença da ricina após o tratamento com cálcio, por SDS-PAGE 12 % (Tabela 3) (LAEMMLI, 1970), em três situações. Num primeiro instante foram aplicados no gel os sobrenadantes obtidos após a centrifugação, o mesmo material inoculado nas células. Num segundo gel, foram aplicadas as misturas de cálcio e solução de ricina sem centrifugar, contendo cálcio insolúvel. O terceiro experimento foi feito utilizando o sobrenadante da centrifugação, que foi submetido à uma precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (TCA) 20%. O *pellet* (precipitado) recuperado no fim do processo foi ressuspendido em tampão de amostra, igualando assim o pH de todas as amostras para aplicar no gel.

Tabela 3. Preparo de gel de poliácridamida separador de 12% (5 mL) e do gel concentrador (*stacking*) (2 mL), para placas de espaçador de 1 mm, em sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad).

Solução	Gel Separador 12% (mL)	Stacking (mL)
Água destilada	1,7	1,4
*Solução acrilamida 30%	2,0	0,33
Tampão Tris 1,5 M (pH 8,8)	1,3	----
Tampão Tris 1,0 M (pH 6,8)	----	0,25
SDS 10%	0,05	0,02
APS 10%	0,05	0,02
TEMED	0,002	0,002

* 29,2% de acrilamida com 0,8% de N',N'-metileno-bis-acrilamida.

Além de pré-tratar a ricina com os compostos de cálcio antes de incubá-la na cultura de células, também foi realizado um experimento de tratamento das células com cálcio seguido da ricina a fim de verificar a capacidade do CaO e do Ca(OH)₂ em proteger as células da ação da toxina. Para isso utilizamos

concentrações de CaO e Ca(OH)₂ mais baixas (1,25%, 0,6%, 0,3% e 0,15%), contendo menos cálcio insolúvel, que é prejudicial à cultura. Após 48 horas de incubação a citotoxicidade foi avaliada pelo método enzimático já descrito.

O mesmo tratamento, utilizando somente CaO à 5% (eficiente na destoxificação), 0,6% (mínimo eficiente na destoxificação) e 0,15% (ineficiente), foi realizado com o intuito de reduzir o tempo de tratamento, inicialmente feito em 12 horas. Foram testados períodos mais curtos de exposição da ricina ao cálcio. Os seguintes tempos foram testados: 180, 120, 60, 30, 10, 5 e 1 minuto. A citotoxicidade foi avaliada pelo método enzimático descrito anteriormente. A presença de bandas de ricina em gel de poliacrilamida também foi avaliada para os tempos de 30, 10, 1 e 0 minutos de tratamento.

3.3 – Avaliação morfológica comparativa das células Vero por Microscopia óptica

Para este experimento utilizamos duas placas de 24 poços. As lamínulas foram colocadas no fundo de cada poço utilizado no experimento, para aderência das células, e em cada placa os seguintes compostos foram utilizados em duplicata: somente meio de cultura (DMEM + 5% de soro fetal bovino); PBS pH 7,0; CaO 5%; ricina; ricina pré tratada com CaO 5% por 1 hora de agitação. Após 24 horas de incubação, uma das placas teve o meio de cultura em cada poço substituído por meio novo. O tempo de incubação total foi de 48 horas. Então, as células foram lavadas por três vezes com solução de PBS pH 7,2, e então fixadas com solução de ácido pícrico e formaldeído (4:1) por 5 minutos. 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%). As lamínulas foram montadas em lâminas histológicas com entelan e deixadas secando por 48 horas. Foram então observadas em microscópio óptico e fotografadas em aumento de 20x.

3.4 – Dot blotting

Para verificar se a estrutura da proteína era alterada pelo tratamento com cálcio, de forma que não fosse reconhecida por anticorpo específico, foi realizado um ensaio de *dot blotting*. A ricina não tratada e amostras tratadas com CaO (10 μ L) foram aplicadas em membrana de nitrocelulose, e após secas, o bloqueio foi feito com solução 5% de leite em pó em PBS-T (PBS pH 7,0 + Tween 0,05%) por 1 hora. O anticorpo primário (IgG de camundongo anti cadeia A de ricina) foi incubado por 1 hora, a lavagem foi feita três vezes com PBS-T, e então o anticorpo secundário (anti IgG de camundongo conjugado à peroxidase) foi incubado também por 1 hora. Após lavagens (três vezes) com PBS-T, a detecção foi feita utilizando um kit de detecção por eletroquimioluminescência (*ECL Western Blotting Detection Kit*, GE Life Sciences).

3.5 – Avaliação da importância de cálcio livre para a inativação da ricina

Para verificar se o cálcio era necessário para a inativação da toxina, foi feito um ensaio de citotoxicidade, como descrito anteriormente, utilizando um quelante de cálcio juntamente com as soluções de CaO. O quelante utilizado foi o ácido tetracético etileno glicol (EGTA). Num primeiro momento utilizamos diferentes concentrações (em molaridade) de CaO puro para verificar a concentração mínima eficiente na inativação da toxina. Fizemos também uma curva de concentrações de EGTA para encontrar uma concentração não tóxica para as células e que pudesse ser utilizada no ensaio. Ambos os compostos foram testados na presença e ausência de ricina. As concentrações de CaO e de EGTA utilizadas separadamente foram as seguintes: 0,8 M, 0,5 M, 0,1 M, 50 mM, 10 mM e 1 mM. Para verificar a importância do cálcio através da ação quelante do EGTA, foram utilizadas três concentrações de CaO (50 mM, 10 mM e 1 mM) contra três concentrações de EGTA (50 mM, 10 mM e 1 mM), na presença e na ausência de ricina (1 ng/ μ L). A citotoxicidade foi avaliada pelo método enzimático previamente descrito.

3.6 – Avaliação da interferência do pH na inativação da ricina

A adição de CaO ou de Ca(OH)₂ torna o pH das soluções utilizadas para inativação da ricina elevado, acima de 11. Assim, foi feita uma varredura de diferentes faixas de pH utilizando PBS sem CaO ou Ca(OH)₂, para tratar a toxina e avaliar se a atividade tóxica era mantida em todas as faixas de pH. A holotoxina foi incubada com as soluções PBS em pH inicial 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 na proporção de 1:1 (v/v). As misturas foram mantidas em agitação por 3 horas à 4°C e incubadas nas células. A citotoxicidade foi medida pelo método enzimático já descrito, e a presença de bandas de ricina em gel foi avaliada por SDS-PAGE 12% para as amostras tratadas com PBS em diferentes pH.

3.7 – Tratamento da torta de mamona com compostos de cálcio e avaliação da toxicidade em cultura de células Vero

A torta de mamona utilizada nos processos de destoxificação foi obtida por doação através da Bioóleo Indústria e Comércio S/A (Feira de Santana, BA).

Para os tratamentos da torta com cálcio, foram empregados os dois compostos usados na inativação da toxina purificada, CaO e Ca(OH)₂, e ainda mais um terceiro composto, o CaCO₃ (carbonato de cálcio). Para cada composto de cálcio, foram utilizadas soluções em duas concentrações, 4% e 8%, em PBS pH 7,0. O tratamento foi feito na proporção 1:1 (m/v), e a torta com os compostos de cálcio foi mantida em agitação por 12 horas à 4°C. Posteriormente, o extrato proteico da torta tratada foi obtido por extração com PBS pH 7,0, na proporção 1:4 (m/v), em agitação por 3 horas à 4°C. O material foi então centrifugado à 10.000 g por 15 minutos, e o sobrenadante foi coletado e utilizado nos passos seguintes. Foi feita a dosagem de proteínas em cada uma das amostras (BRADFORD, 1976), e estas foram diluídas para a concentração final de 200 ng/μL, no qual, de acordo com Fernandes (2008), tem-se aproximadamente 10 ng de ricina por μL (5% do conteúdo proteico total). Os extratos proteicos da torta de mamona tratada (*in natura*, como controle positivo) foram esterilizados em filtros com poro de 0,22 μm, em capela de fluxo laminar, e as amostras filtradas foram utilizadas para os testes

de citotoxicidade. Assim como descrito anteriormente, 10 μL do filtrado foi incubado na cultura de células, contendo 90 μL de meio por poço (concentração final de ricina por poço de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A incubação foi realizada 48 horas, e o crescimento celular foi determinado por contagem de células vivas em microscópio óptico, em 12, 24 e 48 horas de incubação. E a citotoxicidade foi medida em dois pontos, 24 e 48 horas, utilizando o método enzimático para atividade de LDH.

3.8 – Biodestoxificação da torta de mamona por fermentação em estado sólido

Os experimentos de fermentação em estado sólido (FES) foram todos realizados no Laboratório de Biotecnologia Microbiana, no Instituto de Química da UFRJ, em colaboração com a Dr^a. Denise Maria Guimarães Freire.

Foram empregados biorreatores do tipo bandeja, cilíndricos com 10 cm de diâmetro e 15 cm de altura (becker de 500 mL) com 20 g de torta, perfazendo uma altura de leito de 1 cm. Como meio de cultivo foi empregado torta de mamona fornecida pela empresa Bioóleo Indústria e Comércio S/A (Feira de Santana, BA), autoclavada, com 48% de umidade, suplementada com melaço 6,25% (m/m). As fermentações foram conduzidas por 120 horas, em triplicata, em câmara climática com temperatura e umidade controlada em 30°C e 90%, respectivamente. A amostragem foi realizada a cada 24 horas para medida de parâmetros como pH, umidade, atividade de água e crescimento microbiano. O teor de umidade foi medido através da análise de aproximadamente 0,5 g de material fermentado diretamente em balança determinadora de umidade (AND – MX-50), a qual calcula a diferença de peso entre o material úmido e o material seco, após evaporar a água presente, por aquecimento à 160 °C. Amostras de aproximadamente 1,0 g de material fermentado foram analisadas em um higrômetro (Aqualab Decagon), para a determinação da atividade de água nos diversos tempos de fermentação. E para a medida de pH, adicionou-se 5 mL de água destilada a 0,5 g de material fermentado, e a mistura foi vigorosamente agitada, e após 10 minutos o pH do sobrenadante foi medido em potenciômetro.

Para verificar a inativação da ricina, foram extraídas as proteínas presentes nas tortas fermentadas por 24, 48, 72 e 96 horas, seguindo o protocolo de extração descrito para a torta tratada com cálcio. Todo o processo de dosagem de proteínas e esterilização das amostras também foi feito da mesma forma. O crescimento celular foi determinado por contagem de células em 12, 24, 36 e 48 horas de incubação das amostras na cultura. E a citotoxicidade foi medida após 48 horas de incubação. Para os ensaios de citotoxicidade, além de incubar as células com as amostras de torta de mamona fermentada e *in natura*, em um segundo experimento foram adicionados, junto com estas amostras, 8 µg (por poço) de anticorpos anti-cadeia A de ricina (Santa Cruz Biotecnologia), como controle qualitativo. O ensaio utilizado foi a dosagem de atividade de LDH, descrito anteriormente.

3.9 – Medida do crescimento do fungo

A quantificação do crescimento fúngico foi realizada de forma indireta através da dosagem de N-acetilglicosamina (AIDOO *et al.*, 1981). Na primeira etapa, de hidrólise da parede celular do fungo, adicionou-se 5 mL de HCl 6 N a 0,5 g de amostra, colocando-se a mistura em banho de água fervente por 2 horas. Em seguida, a amostra foi resfriada e filtrada, transferindo-se 1 mL do filtrado para um balão de 15 mL, onde 1 gota de solução alcoólica de fenolftaleína 0,5% (m/v) foi adicionada, sendo a neutralização efetuada com solução de NaOH 3 N, até que a coloração atingisse a tonalidade rosa. Em seguida, foi feita a titulação reversa com KHSO₄ 1%, até que esta coloração desaparecesse. O volume do balão foi então completado com água destilada. Após esta etapa, tomou-se 1 mL da solução anterior e adicionou-se à mesma 1 mL de solução de acetil acetona em Na₂CO₃ 0,5 N (1:50), colocando-se a mistura em banho de água fervente por 20 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 6 mL de etanol e, em seguida, 1 mL de solução de *p*-DAB (*p*-dimetilaminobenzaldeído - reagente de Erlich). Os tubos foram incubados a 65 °C por 10 minutos e a absorbância foi lida a 530 nm para a construção da curva de crescimento celular. Maior absorvância representou maior quantidade de glicosamina liberada. A glicosamina é um produto da degradação da quitina presente na parede celular

do fungo, e sua concentração foi diretamente associada ao crescimento do microrganismo.

3.10 – Medida da atividade de protease

Ao fim da fermentação foi realizada a extração das enzimas produzidas no processo. Para isso foi utilizado tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,0, na proporção de 5:1 (5 mL de tampão para 1 g de torta fermentada). A extração foi feita em agitação por 20 minutos a 200 rpm e 35 °C. Para separar o extrato enzimático, primeiramente foi utilizada uma prensa para espremer a torta embebida em tampão, e então o material foi centrifugado à 3000 rpm por 5 minutos a 20°C. O extrato enzimático foi utilizado para a avaliação da atividade proteásica (GOMBERT *et al*, 1999; GUTARRA *et al*, 2007).

A atividade proteásica foi determinada pelo método descrito por Charney e Tomarelli (1947), que se baseia na formação de peptídeos solúveis em TCA (ácido tricloroacético), a partir da digestão de uma solução de azocaseína com enzimas proteolíticas presentes no extrato. Foi diluído 0,5 mL da amostra em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0), e a esta foi adicionado 0,5 mL de azocaseína 0,5% (m/v) (também em tampão acetato). A mistura resultante foi incubada a 37 °C por 40 minutos. Em seguida, a reação foi paralisada pela adição de 0,5 mL de TCA 10% em banho de gelo por 5 minutos. A seguir, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 2 minutos para remover o substrato não digerido. Depois da centrifugação, 1 mL do sobrenadante foi colocado em 1 mL de uma solução de hidróxido de potássio 5 N. A absorbância dessa solução foi medida em espectrofotômetro (UV/VIS Spectrometer – PG Instruments) à 428 nm. O branco do aparelho foi preparado adicionando-se 0,5 mL de tampão em substituição da amostra. O branco da reação foi preparado adicionando-se 0,5 mL da amostra previamente diluída somente após a adição do TCA. Uma unidade de atividade proteásica (U) foi definida como a quantidade de enzima, que causa diferença unitária de absorbância entre a amostra e seu respectivo branco por minuto, nas condições de ensaio, de modo que o cálculo da atividade enzimática foi feito pela equação seguinte:

$$A_p = \frac{(Abs_a \cdot f_a - Abs_b \cdot f_b)}{t \cdot V_a}$$

Onde:

A_p = atividade (U/mL)

Abs_a = absorvância da amostra

f_a = fator de diluição da amostra

Abs_b = absorvância do branco da amostra

f_b = fator de diluição do branco

t = tempo de reação (min)

V_a = volume de amostra (mL)

RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1 – Padronização dos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular

Antes de realizar os tratamentos de inativação da ricina e destoxificação da torta de mamona, focou-se em melhorar o ensaio de citotoxicidade em células Vero proposto por Fernandes (2010). Para isso, o limite de detecção do ensaio foi avaliado em quatro instantes da incubação da ricina purificada com a cultura de células: 12, 24, 36 e 48 horas de incubação. As concentrações de ricina utilizadas no ensaio foram 10 μg , 10 μg , 1 μg , 100 ng, 1 ng, 100 pg e 10 pg por mL. Em um primeiro momento, a toxicidade foi medida por contagem de células vivas (aderidas à placa) utilizando microscopia óptica, onde verificou-se um aumento significativo no crescimento celular quando utilizadas concentrações de ricina inferiores à 10 ng/mL (Figura 9A). Esta diferença pôde ser melhor visualizada após 24 horas de incubação, mostrando que este seria o tempo ideal para medir a citotoxicidade. Uma outra forma de avaliar a citotoxicidade das diluições de ricina foi utilizando um kit comercial de dosagem para atividade enzimática, no caso lactato desidrogenase (LDH), uma enzima marcadora de morte celular. Nesse resultado foi reforçado o que foi visualizado na contagem de células, onde concentrações de ricina inferiores à 10 ng/mL não promoveram citotoxicidade (Figura 9B). A medida da citotoxicidade para cada amostra foi feita 48 horas após a incubação na cultura de células.

Ao encontrar o mínimo de ricina capaz de ser detectado pelo ensaio e quais os tempos ideais para avaliação da citotoxicidade, foi realizado um ensaio utilizando anticorpo anti-cadeia A de ricina como uma possível medida qualitativa. Como pode ser observado na Figura 10, células tratadas por 24 horas com ricina, na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sofreram morte celular, se despreendendo da placa de cultura, como indica a seta. Tratando a cultura de células Vero com a mesma concentração de ricina, porém adicionando o IgG anti-cadeia A, não observou-se toxicidade, e as células se proliferaram normalmente, seguindo o padrão observado no controle negativo feito com PBS pH 6,8. Dessa forma foi observado que este passo de imunoprecipitação pode ser utilizado junto com o teste de citotoxicidade como um método

qualitativo, mostrando não só se a amostra está tóxica ou não, mas também indicando que o agente responsável pela citotoxicidade é mesmo a ricina.

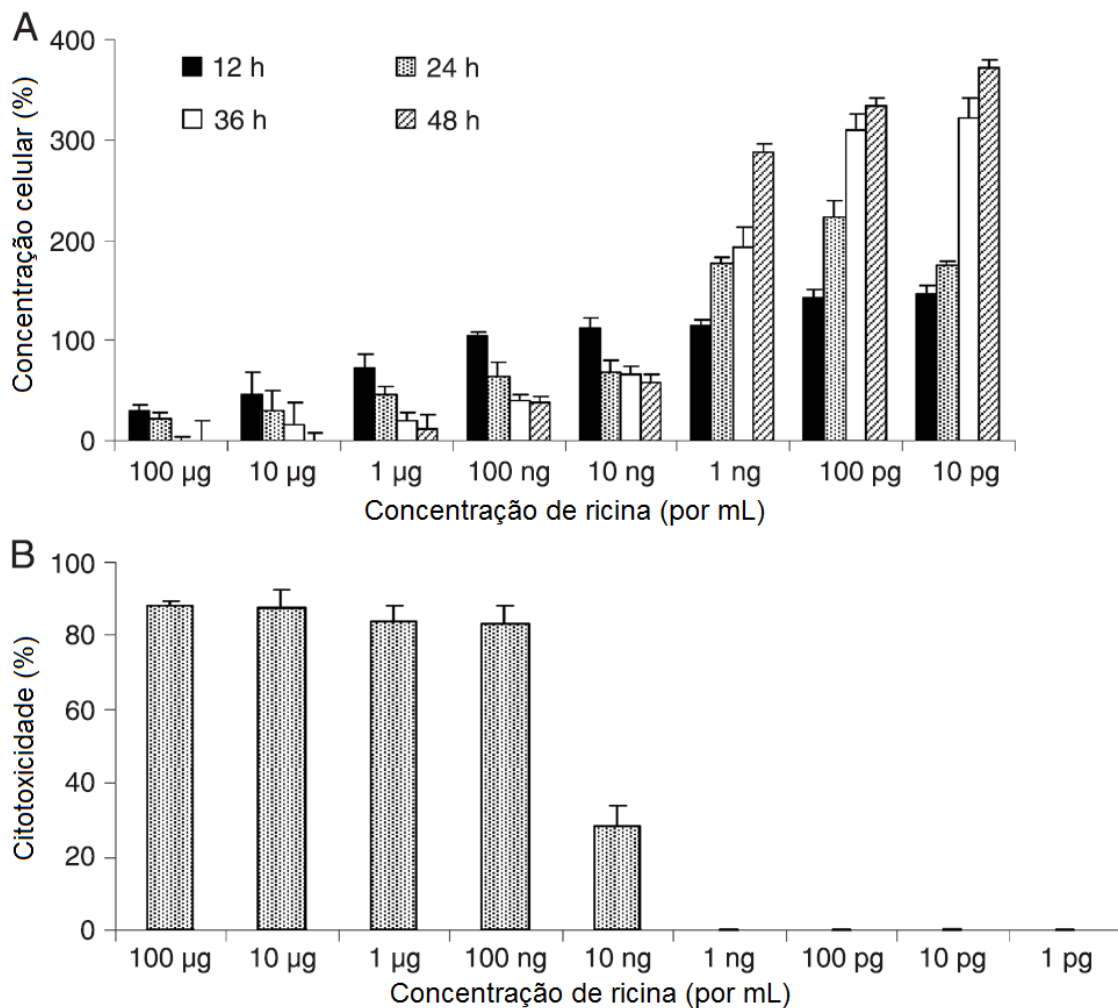


Figura 9. Ensaio para determinação do limite de detecção da atividade tóxica de ricina em cultura de células Vero. A) Avaliação de citotoxicidade feita por contagem de células em microscópio óptico após 12, 24, 36 e 48 horas de incubação. B) Avaliação de citotoxicidade feita por dosagem enzimática de LDH.

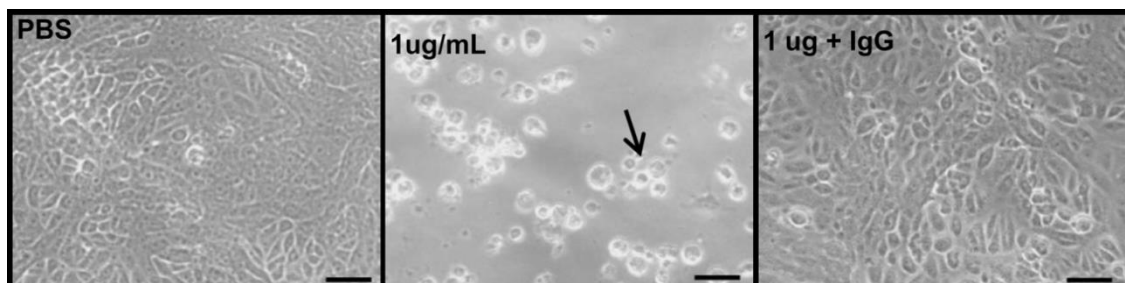


Figura 10. Microscopia óptica de cultura de células Vero após 48 horas de incubação com ricina, na ausência e na presença de anticorpos anti-cadeia A. Controle negativo feito com PBS pH 6,8. Barra = 50 µm.

4.2 – Biodestoxificação da torta de mamona por fermentação em estado sólido

Primeiramente, a presença da ricina na torta fermentada (por 24, 48, 72 e 96 horas) foi avaliada por SDS-PAGE 12%. Verificou-se então redução nas bandas referentes às cadeias A e B da toxina, bem como o aumento de bandas de baixo peso molecular (Figura 11), que podem ser produtos de degradação da ricina e de outras proteínas presentes na torta de mamona. Através do gel é possível observar que as cadeias da ricina desaparecem já após 24 horas de fermentação.

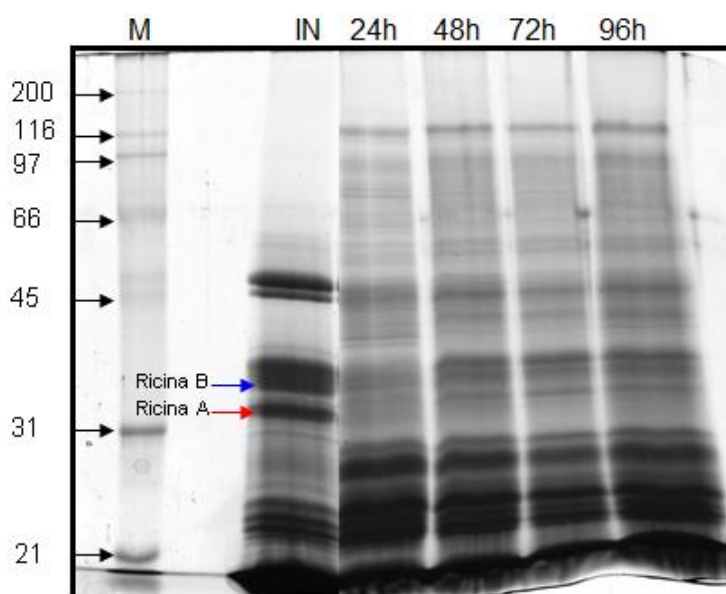


Figura 11. SDS-PAGE 12% para torta de mamona submetida à biodestoxificação por fermentação em estado sólido. M = Marcador; IN = Torta *in natura*; 24h, 48h, 72h e 96h = Torta de mamona fermentada em horas.

Para avaliar a citotoxicidade da torta fermentada, utilizamos a contagem de células vivas e a dosagem de LDH. Através da contagem, verificamos que todos os tempos de fermentação testados foram eficientes na eliminação da toxicidade, pois o crescimento celular seguiu o padrão do controle feito com PBS pH 7,0, com um crescimento um pouco mais baixo para as células tratadas com extrato proteico de 72 horas de fermentação (Figura 12A). Utilizando o ensaio para citotoxicidade (LDH), verificou-se o mesmo comportamento, mostrando a eficiência do processo de destoxificação da torta (Figura 12B). Para este experimento utilizamos ainda anticorpos anti-cadeia A

de ricina como um controle qualitativo, mostrando que a ricina é mesmo o agente tóxico presente na torta de mamona testada.

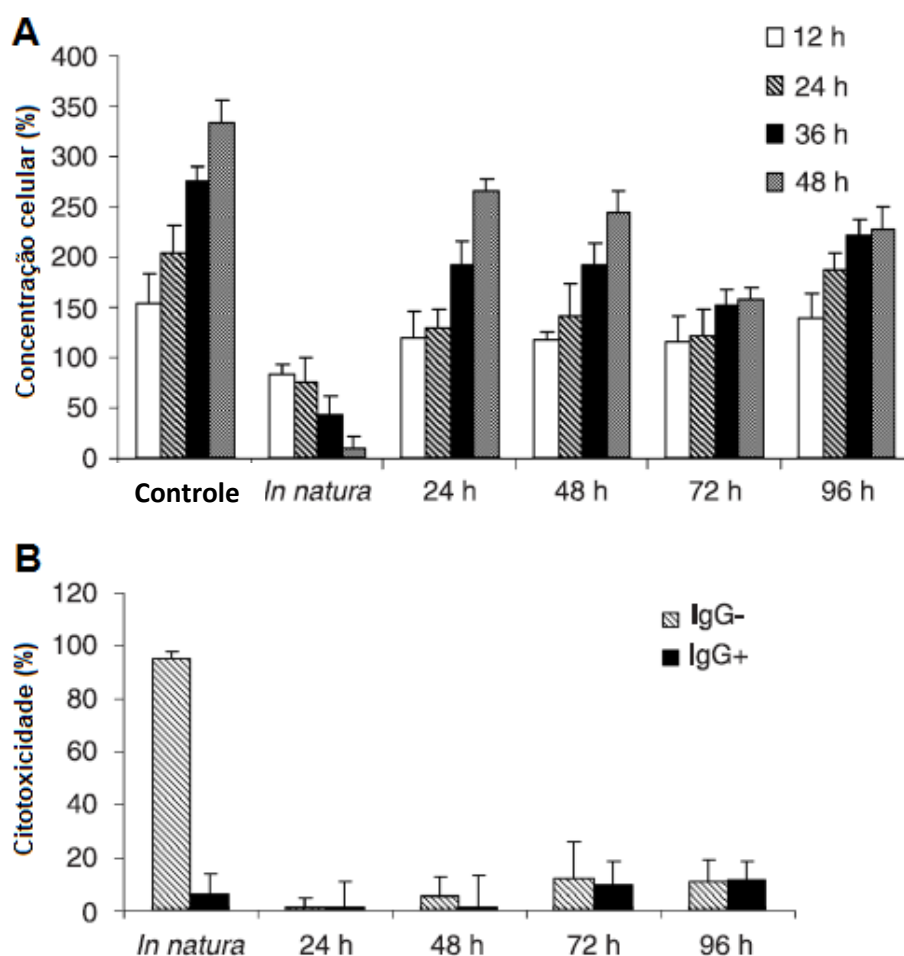


Figura 12. Toxicidade da torta de mamona utilizada como substrato para o crescimento de *Aspergillus niger* por 24, 48, 72 e 96 horas. A) Crescimento celular determinado por contagem de células vivas. O controle negativo foi feito com PBS pH 7,0, e a contagem foi feita após 12, 24, 36 e 48 horas de incubação (padrões das barras). B) Citotoxicidade determinada pelo ensaio de LDH, determinada 48 horas após a incubação das amostras fermentadas, na presença (IgG+) e na ausência (IgG-) de anticorpos anti-cadeia A de ricina.

Alguns parâmetros representativos do crescimento fúngico, como a determinação da concentração de N-glicosamina presente no substrato e a concentração de proteases foram determinados durante todo o tempo de fermentação. A concentração de proteases poderia estar associada à degradação da ricina na torta. Como mostra a Figura 13, o crescimento do fungo alcançou o seu máximo já em 24 horas de fermentação, e em 48 horas podemos observar a maior atividade proteásica (1,18 U/g).

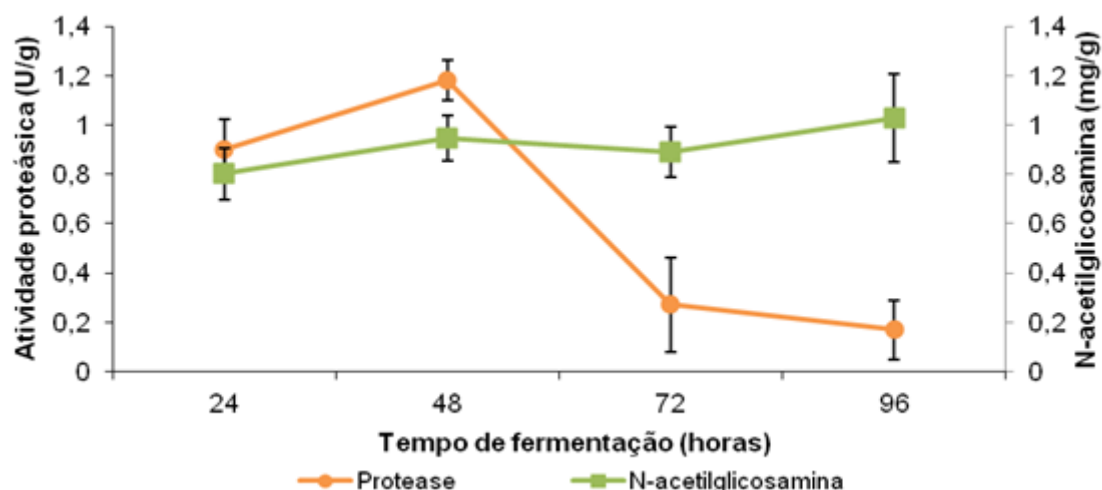


Figura 13. Curvas de crescimento de *A. niger* (representado em verde pela concentração de N-acetilglicosamina) e de atividade proteásica (em laranja) encontrada na torta de mamona durante 96 horas de fermentação.

4.3 – Destoxificação da torta de mamona por tratamento com compostos de cálcio

Após verificar a eficiência do óxido e do hidróxido de cálcio na eliminação da atividade tóxica da ricina pura, foram realizados experimentos de tratamento da torta de mamona com CaO , Ca(OH)_2 , e também com um sal de cálcio, o CaCO_3 . Assim como foi feito para os primeiros experimentos com a ricina pura, sem tratamento (Figura 9), a atividade da ricina foi medida por contagem de células Vero vivas após incubação (Figura 14A) e por ensaio enzimático (LDH) de citotoxicidade (Figura 14B). Diferente do que foi feito com a ricina pura, quando foi checada uma ampla variedade de concentrações de cálcio, para a torta foram utilizados 4% e 8% de cada composto. Verificamos, tanto por contagem de células quanto pelo ensaio de LDH, que o carbonato de cálcio foi ineficiente na inativação da toxina, tanto em 4%, quanto em 8% em cada tempo de incubação. O CaO e Ca(OH)_2 , a 4% não foram o suficiente para eliminar a toxicidade da torta de mamona. Como pode ser visto na Figura 14A, a concentração celular decresce para ambos, e para o ensaio de LDH (Figura 14B) foi possível verificar um baixo nível de citotoxicidade em 48 horas de incubação. Ao utilizar 8% de CaO e Ca(OH)_2 , foi possível observar destoxificação da torta.

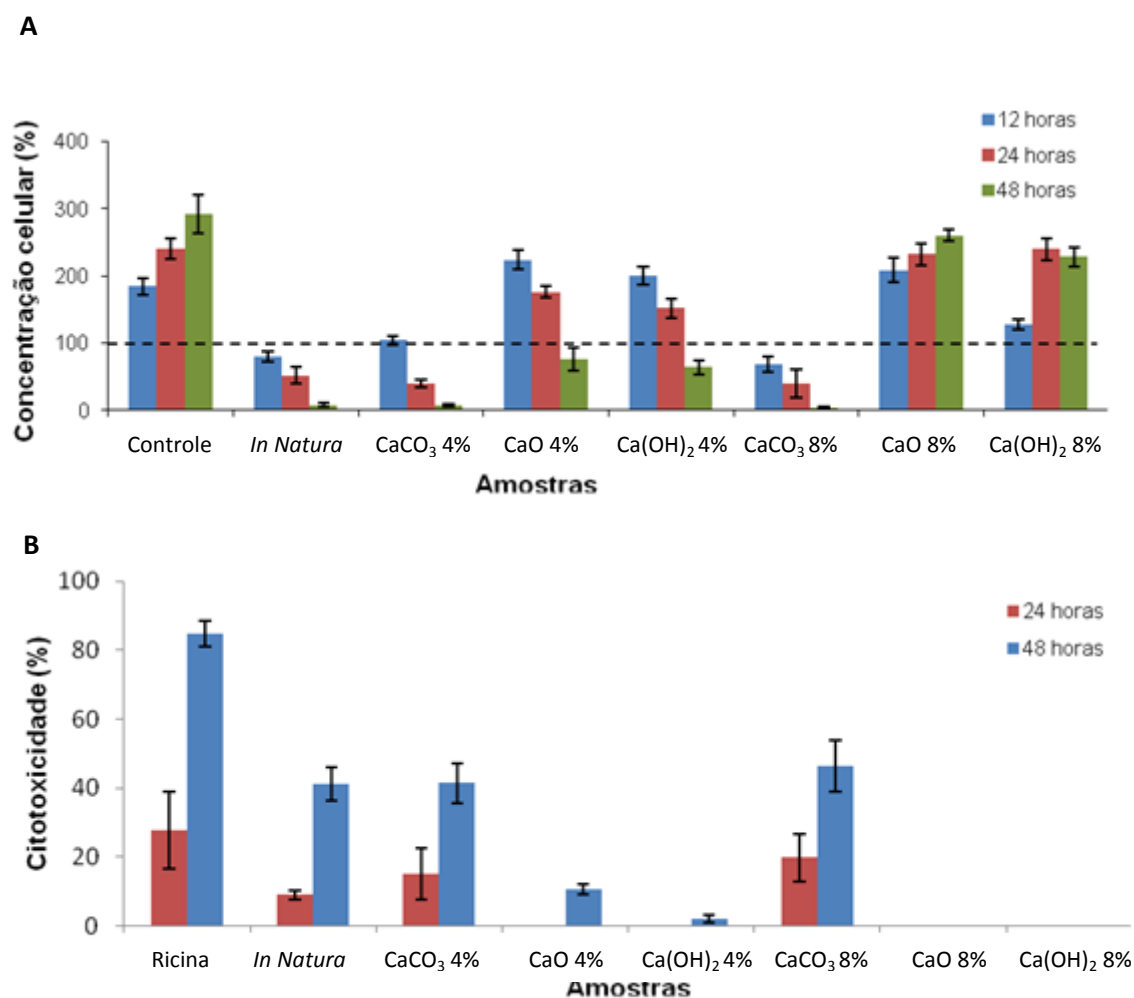


Figura 14. Toxicidade da torta de mamona quimicamente tratada. A) Crescimento celular determinado por contagem de células, em 12, 24 e 48 horas de incubação. B) Determinação da toxicidade pela dosagem de LDH em 24 e 48 horas de incubação.

A presença da ricina na torta de mamona tratada com soluções de cálcio também foi avaliada por SDS-PAGE 12%. Para isso foi utilizado o material tratado com CaO. Enquanto as bandas de ricina podem ser visualizadas para o extrato proteico da torta *in natura*, o mesmo não pode ser observado para as amostras oriundas da torta tratada (Figura 15), onde não aparecem as bandas de ricina e nem outras proteínas presentes na torta. Assim como foi visto para o tratamento da ricina purificada, bandas de baixa massa molecular que indicam produtos de degradação da toxina também não apareceram no extrato proteico da torta tratada.

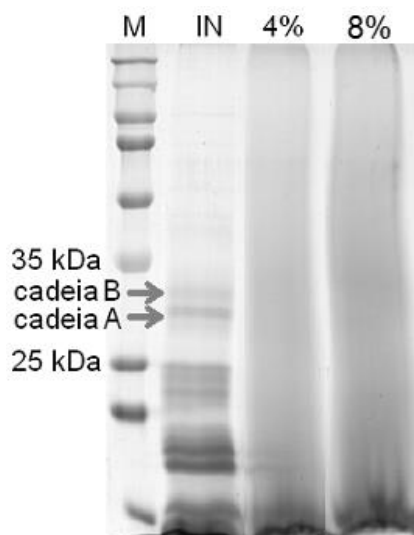


Figura 15. SDS-PAGE 12% para detecção de ricina em torta de mamona tratada com CaO. M = Marcador; IN = Torta de mamona *in natura*; 4% = Torta de mamona tratada com CaO 4%; 8% = Torta de mamona tratada com CaO 8%.

4.4 – Inativação da ricina purificada por soluções de CaO e Ca(OH)₂

Um dos tratamentos propostos no nosso trabalho para destoxificação da torta de mamona foi o tratamento químico com compostos de cálcio. Antes de aplicar o tratamento à torta bruta, realizamos experimentos para avaliar a capacidade de soluções de óxido de cálcio e hidróxido de cálcio em inativar a ricina purificada. Desta forma, foi realizada uma varredura de diferentes concentrações de CaO e Ca(OH)₂, bem como reduziu-se o tempo de tratamento para definir o mínimo necessário para atingir a inativação da holotoxina. Inicialmente avaliou-se a citotoxicidade para células incubadas com a ricina após o tratamento da holotoxina com diferentes concentrações de compostos de cálcio (óxido e hidróxido). Foi mostrado que concentrações entre 10 % e 0,3% foram eficazes para a inativação da toxina, tanto com CaO quanto com Ca(OH)₂ (Figura 16). Já concentrações mais baixas testadas (0,15% e 0,075%) não tiveram efeito na redução da citotoxicidade da ricina. Duas concentrações diferentes de ricina também foram utilizadas, sendo 50 ng/mL (concentração próxima do limite de detecção em testes de citotoxicidade, e uma concentração mais elevada de 1 µg/mL). Verificou-se que, para as concentrações testadas, a citotoxicidade média foi de 81% e 91%, respectivamente, para 50 ng/mL e 1 µg/mL, conforme pôde ser observado nas Figuras 16A e 16B, respectivamente.

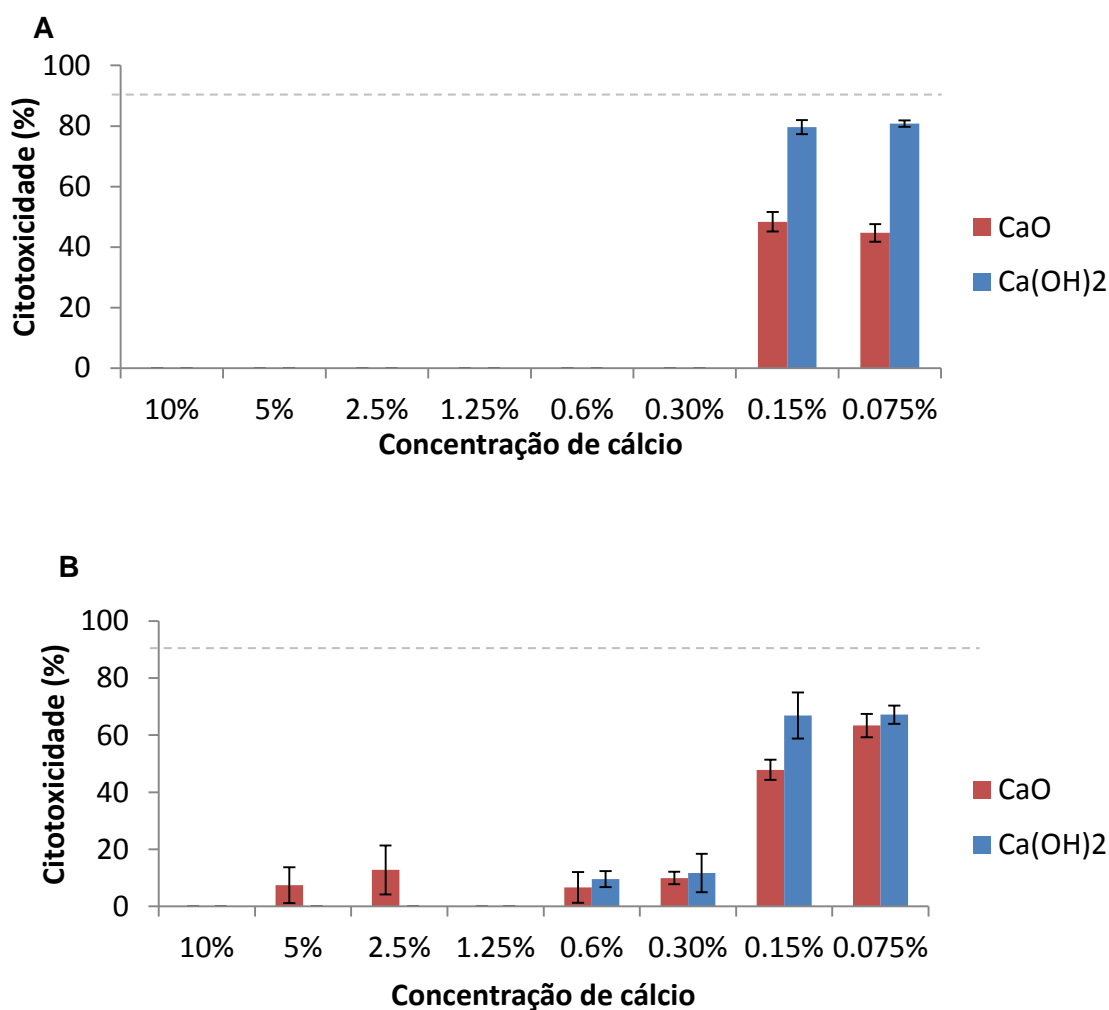


Figura 16. Ensaio de citotoxicidade para determinar a menor concentração de cálcio eficiente contra a toxicidade da ricina, usando uma concentração final de ricina de A) 50 ng/mL e B) 1 µg/mL. Ricina não tratada foi utilizada como controle positivo, registrando 91% de citotoxicidade (----) e PBS pH 7,2 como controle negativo.

Visto que a ricina perdeu sua atividade após o tratamento com óxido e hidróxido de cálcio, realizamos uma análise por SDS-PAGE 12% para verificar a presença da toxina ou mesmo de peptídeos de baixo peso gerados da sua degradação. Dois géis foram preparados, sendo o primeiro (Figura 17A) carregado com o sobrenadante das amostras centrifugadas após o tratamento (que foi utilizado para tratar as células), enquanto o segundo gel (Figura 17B) foi carregado com a amostra tratada não centrifugada (contendo cálcio insolúvel). Em ambos os géis observou-se o mesmo resultado, no qual a ricina desapareceu após o tratamento com 10% de CaO e Ca(OH)₂, mas algumas bandas com a mesma massa molecular das cadeias A e B da ricina ainda

puderam ser vistas após o tratamento utilizando uma concentração que não foi efetiva para eliminar a citotoxicidade (0,15%).

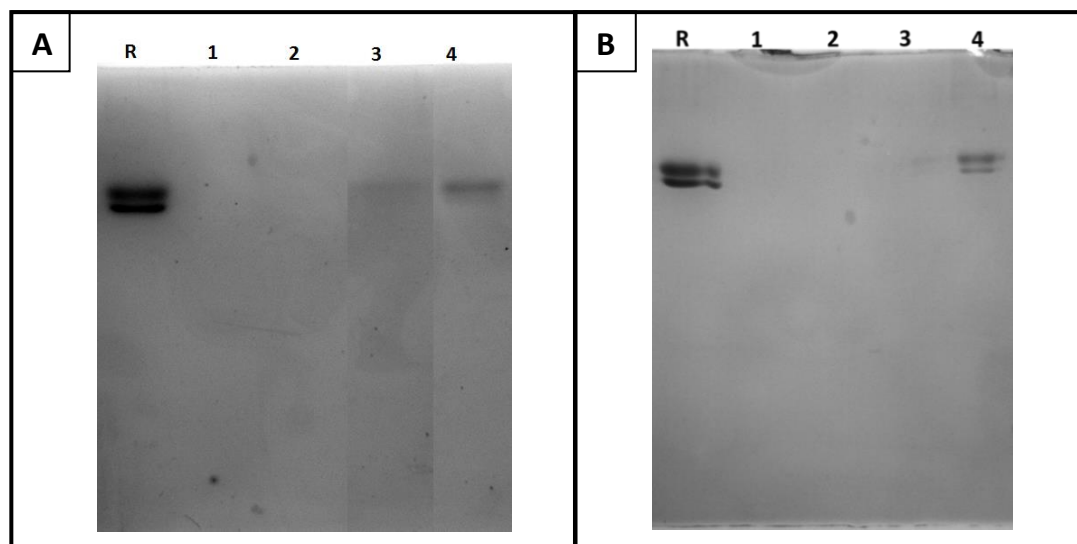


Figura 17. SDS-PAGE das amostras de ricina após o tratamento com alta e baixa concentração de cálcio. A) gel carregado com o sobrenadante das amostras tratadas após centrifugação. B) Gel carregado com a amostra inteira, incluindo cálcio insolúvel. R = ricina não tratada; Tratamentos: 1 = CaO 10%; 2 = Ca(OH)₂ 10%; 3 = CaO 0,15%; 4 = Ca(OH)₂ 0,15%.

Embora a ricina não seja detectada no gel após o tratamento, a degradação da ricina também não é mostrada, uma vez que não há produtos de degradação de baixo peso molecular. Então, para verificar se o pH alcalino (por volta de 12) das amostras tratadas estava impedindo as proteínas de entrar no gel, outra eletroforese foi realizada utilizando amostras com o pH ajustado para 7 após o tratamento com cálcio. Mas novamente não foram observados peptídeos de baixo peso no gel separador ou mesmo proteínas retidas no gel concentrador (*stacking*) (Figura 18).

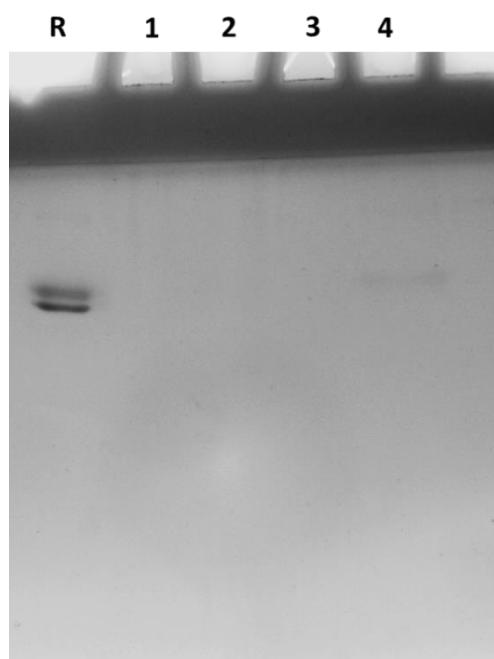


Figura 18. SDS-PAGE da ricina tratada com diferentes concentrações de CaO, onde todas as amostras tiveram seu pH ajustado para 7 para serem aplicadas no gel. R = ricina não tratada; tratamentos: 1 = CaO 10%; 2 = CaO 2,5%; 3 = CaO 0,6%; 4 = CaO 0,15%.

Depois de confirmar que o tratamento com cálcio realmente funcionou para inativação da ricina, um ensaio foi realizado para determinar se o CaO e o Ca(OH)_2 poderiam conferir resistência às células contra a toxina. Para isso foram utilizadas concentrações baixas, a fim de evitar turbidez no meio (interferência na leitura de absorvância), mas que fosse eficiente na inativação da holotoxina (concentrações até 0,6%, como visto anteriormente). A incubação das células foi feita com a ricina sem o tratamento prévio com cálcio, e as soluções de CaO e Ca(OH)_2 foram incubadas logo em seguida. Como é possível observar na Figura 19, o cálcio não induziu nenhuma proteção às células. Altas concentrações de cálcio insolúvel foram tóxicas para a cultura, como pode ser visto no controle negativo sem ricina. Mesmo as soluções de CaO e Ca(OH)_2 0,3% que foram eficientes para inativar a ricina nos experimentos anteriores (Figura 16), e por si só não foram tóxicas quando usadas como controle negativo, ou seja, não protegeram as células.

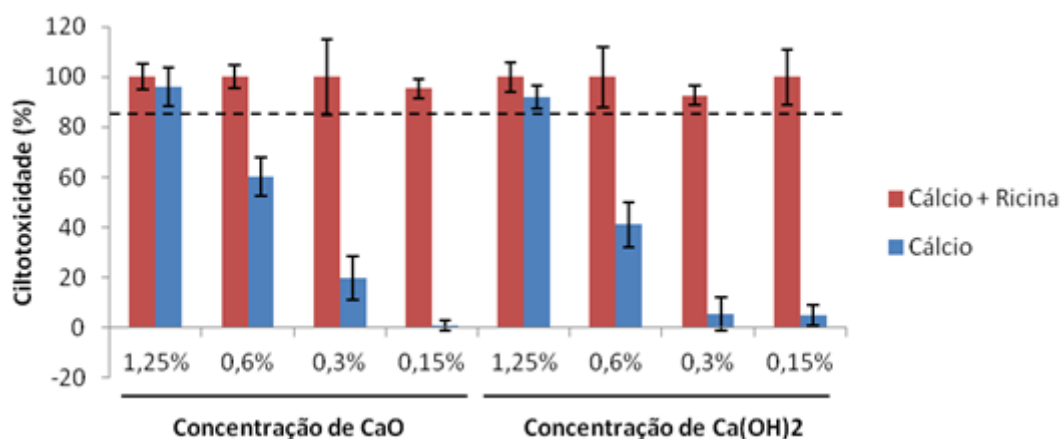


Figura 19. Ensaio de citotoxicidade para avaliar a capacidade dos compostos de cálcio induzirem proteção às células tratadas com ricina. Em vermelho a citotoxicidade para as células incubadas com ricina seguido de cálcio (CaO na esquerda e Ca(OH)₂ na direita), e em azul o controle negativo feito só com as soluções de cálcio. Ricina não tratada foi utilizada como controle positivo, registrando 83% de citotoxicidade (----).

Com o intuito de reduzir o tempo do tratamento e encontrar o mínimo necessário de exposição da ricina às soluções de cálcio para que houvesse inativação, os tempos de tratamento foram reduzidos. Usando 5% (efetivo), 0,6% (efetivo) e 0,15% (não efetivo) de CaO foi observado que 5 minutos foi o suficiente para reduzir consideravelmente a toxicidade da ricina na concentração mais alta de CaO (5%), e em 10 minutos na concentração mais baixa (0,6%) (Figura 20). O melhor resultado foi obtido em 1 hora de tratamento, onde ao utilizar 5% de CaO foi possível desativar a atividade citotóxica da proteína à quase zero. Ao longo das 3 horas de tratamento, a concentração mais baixa (0,15% de CaO) não foi efetiva na inativação da ricina, onde os níveis de citotoxicidade mais baixos obtidos giraram em torno dos 40%, da mesma forma que nos tratamentos anteriores feitos por 12 horas. Ricina à 200 ng/mL foi utilizada como controle positivo, com citotoxicidade de 83%. Assim, de acordo com esses resultados, vimos que é possível utilizar uma baixa quantidade de CaO por um curto período de tempo para inativar a toxina.

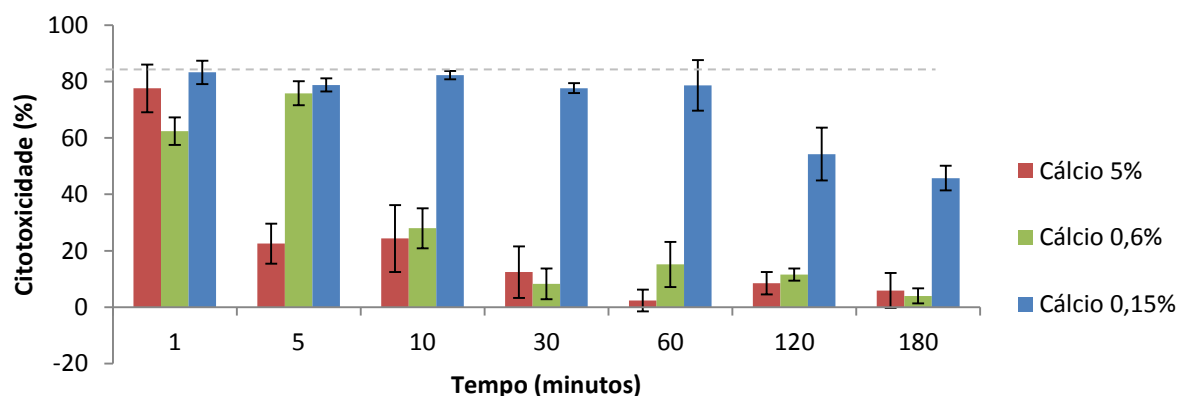


Figura 20. Ensaio de citotoxicidade para determinar o tempo mínimo requerido para a inativação da ricina usando diferentes concentrações de CaO. Ricina foi utilizada como controle positivo, registrando com 83% de citotoxicidade (----).

Também foi confirmado a redução na presença da ricina em gel para os diferentes tempos de tratamento. É possível ver que as bandas das cadeias A e B são mais fortes nos tempos 1 e 0 do tratamento (Figura 21). Cada tempo é referente aos minutos de incubação da ricina com o CaO em agitação. Sendo assim o tempo 0 é a amostra sem esse período de agitação, mas para todos os tempos houve a fervura das amostras por 5 minutos antes de aplicar no gel, o que explica a diminuição das bandas de ricina mesmo no tempo 0.

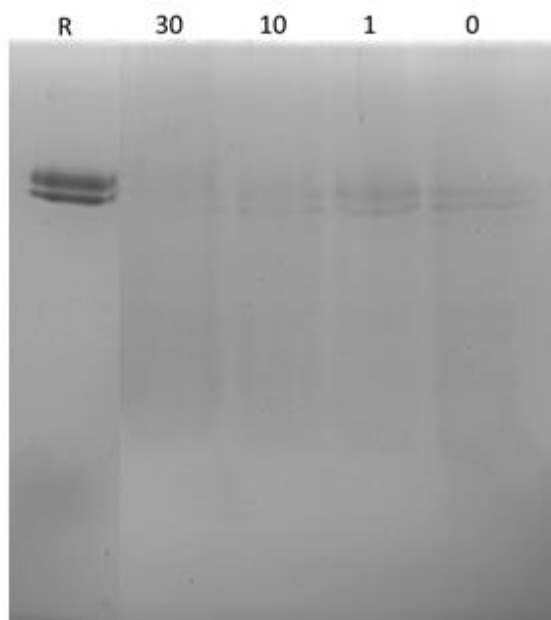


Figure 21. SDS-PAGE para a ricina tratada com CaO 5% por 60, 30, 10, 1 e 0 minutos. R = ricina não tratada.

Para mostrar o efeito da ricina sobre a cultura de células, após tratamento da toxina com CaO por 1 hora, a morfologia das células foi observada por microscopia óptica. Nas células não tratadas (apenas meio de cultura, Figura 22), no controle negativo feito com PBS (Figura 23) e quando incubadas somente com solução de CaO 5% (Figura 24), foi observado que o padrão de crescimento foi normal, sem alterações morfológicas das células. Já para células incubadas com ricina verificou-se uma drástica redução no número de células aderidas, mostrando que a toxina estava ativa (Figura 25). As células incubadas com a ricina pré-tratada com CaO 5% sobreviveram e cresceram seguindo o padrão normal de crescimento observado sem a toxina (Figura 26). Estes resultados indicam a eficiência do tratamento químico para desativação da ricina. O experimento foi conduzido em duas placas, por 48 horas totais, sendo que para um das placas o meio de cultura de cada poço foi renovado após 24 horas de incubação. No entanto, os mesmos resultados foram vistos para ambas.

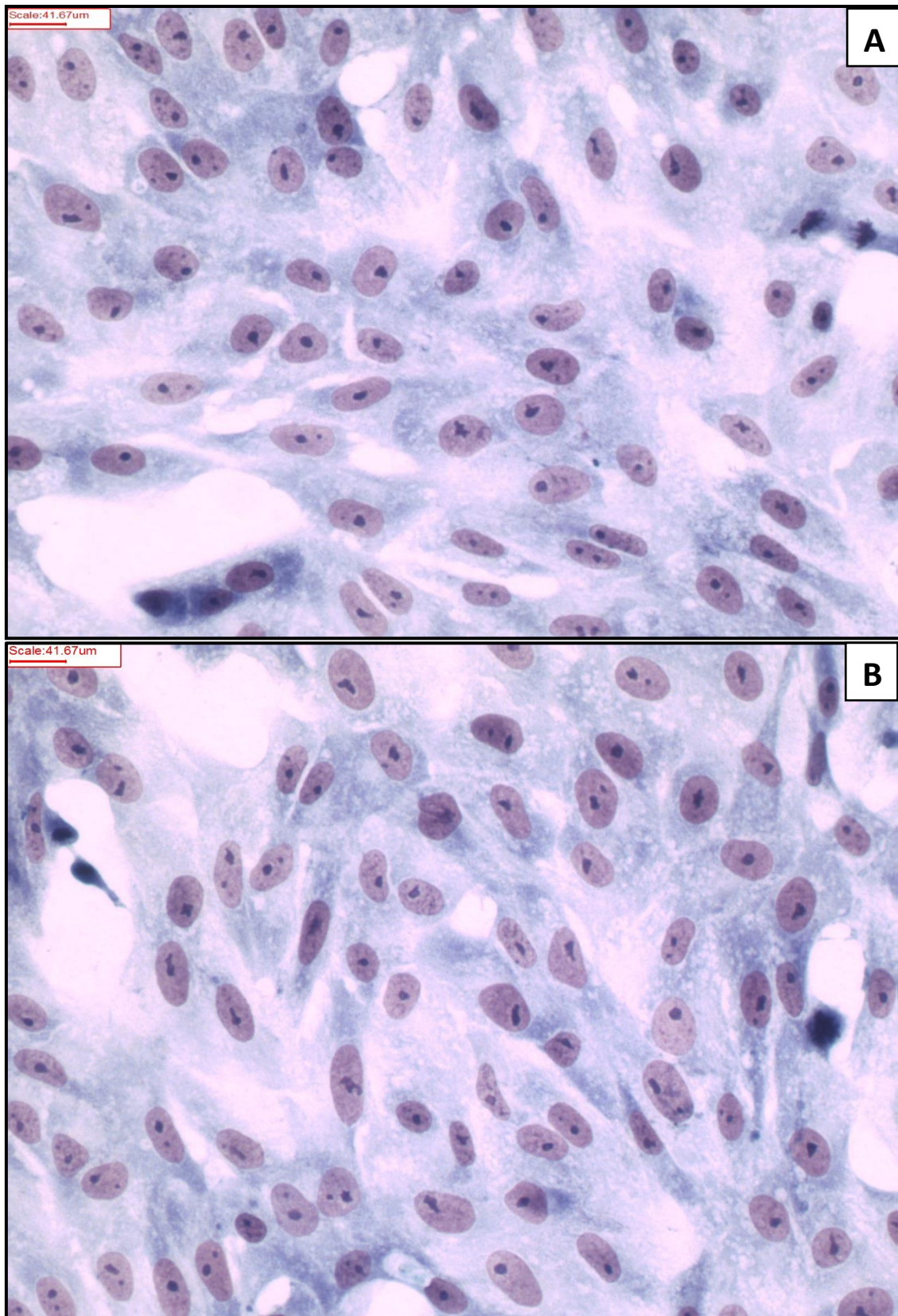


Figura 22. Microscopia óptica para células Vero sem tratamento, crescidas em meio DMEM + 5% de soro fetal bovino. A) Experimento com troca de meio em 24 horas de incubação; B) Experimento com 48 horas corridas de incubação. A barra em vermelho indica a escala no tamanho de 41,67 μm .

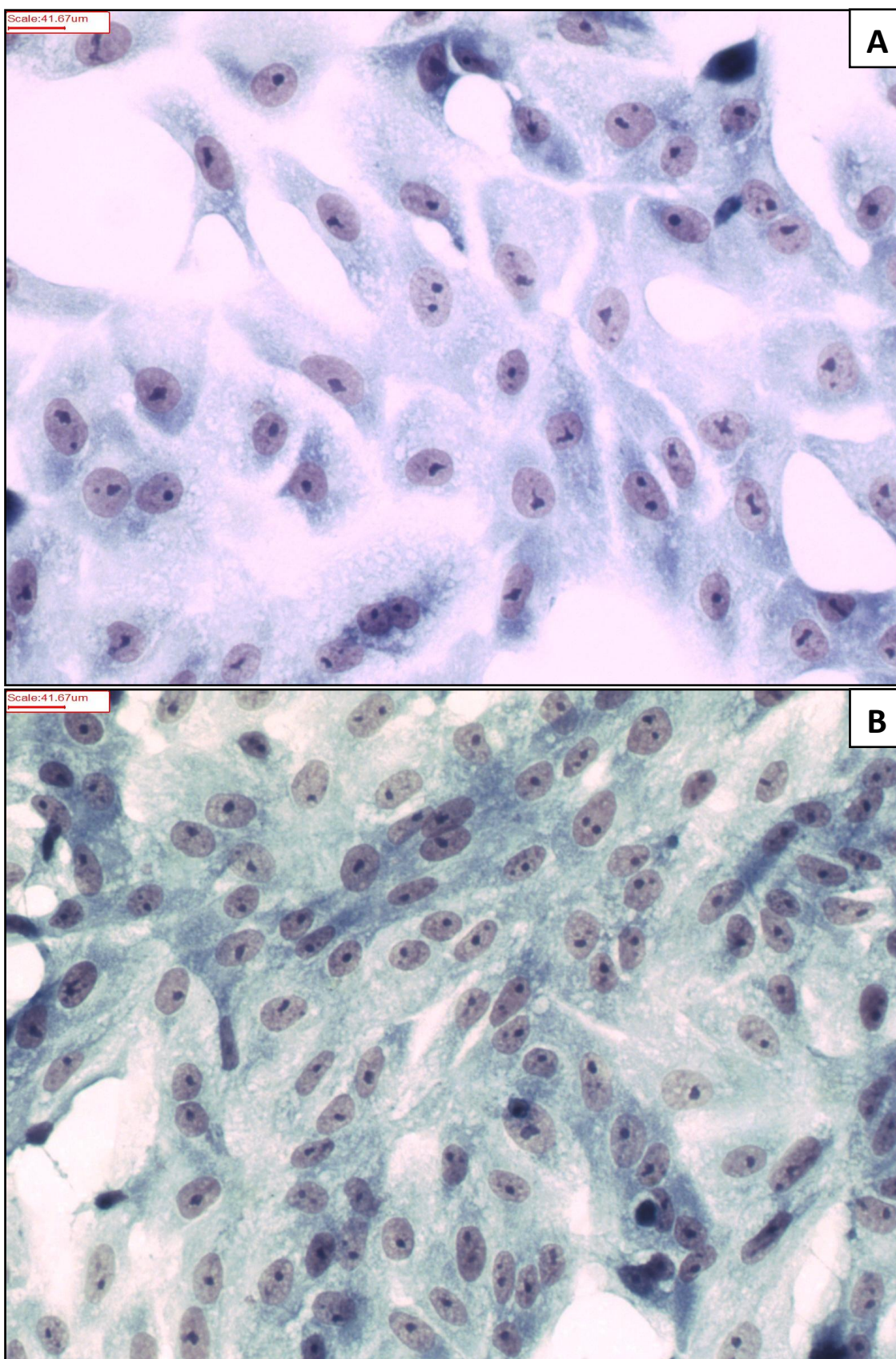


Figura 23. Microscopia óptica para células Vero incubadas com 5% (v/v) de PBS pH 7,0. A) Experimento com troca de meio em 24 horas de incubação; B) Experimento com 48 horas corridas de incubação. A barra em vermelho indica a escala no tamanho de 41,67 μm .

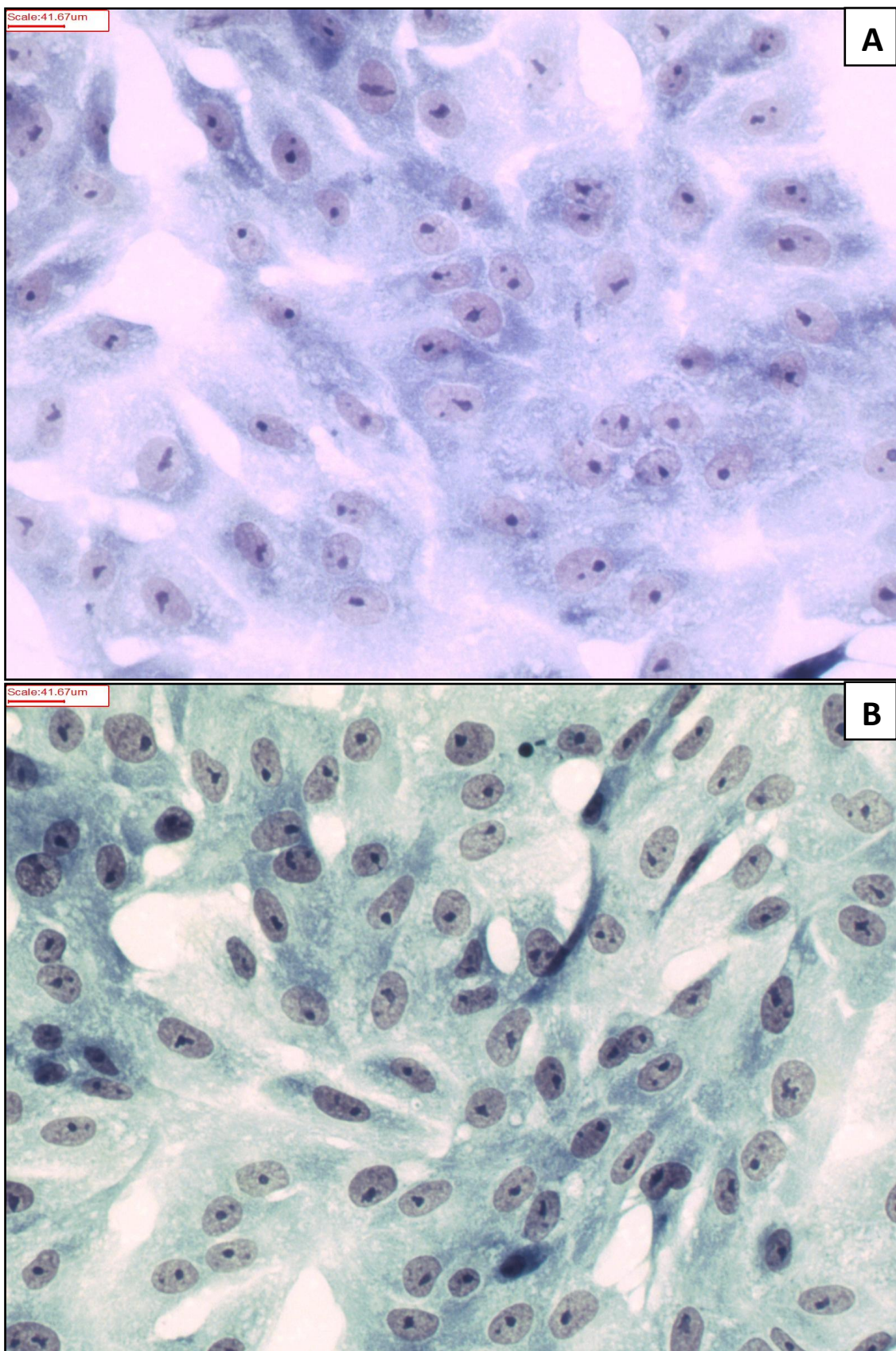


Figura 24. Microscopia óptica para células Vero incubadas com solução de CaO 5%. A) Experimento com troca de meio em 24 horas de incubação; B) Experimento com 48 horas corridas de incubação. A barra em vermelho indica a escala no tamanho de 41,67 μm .

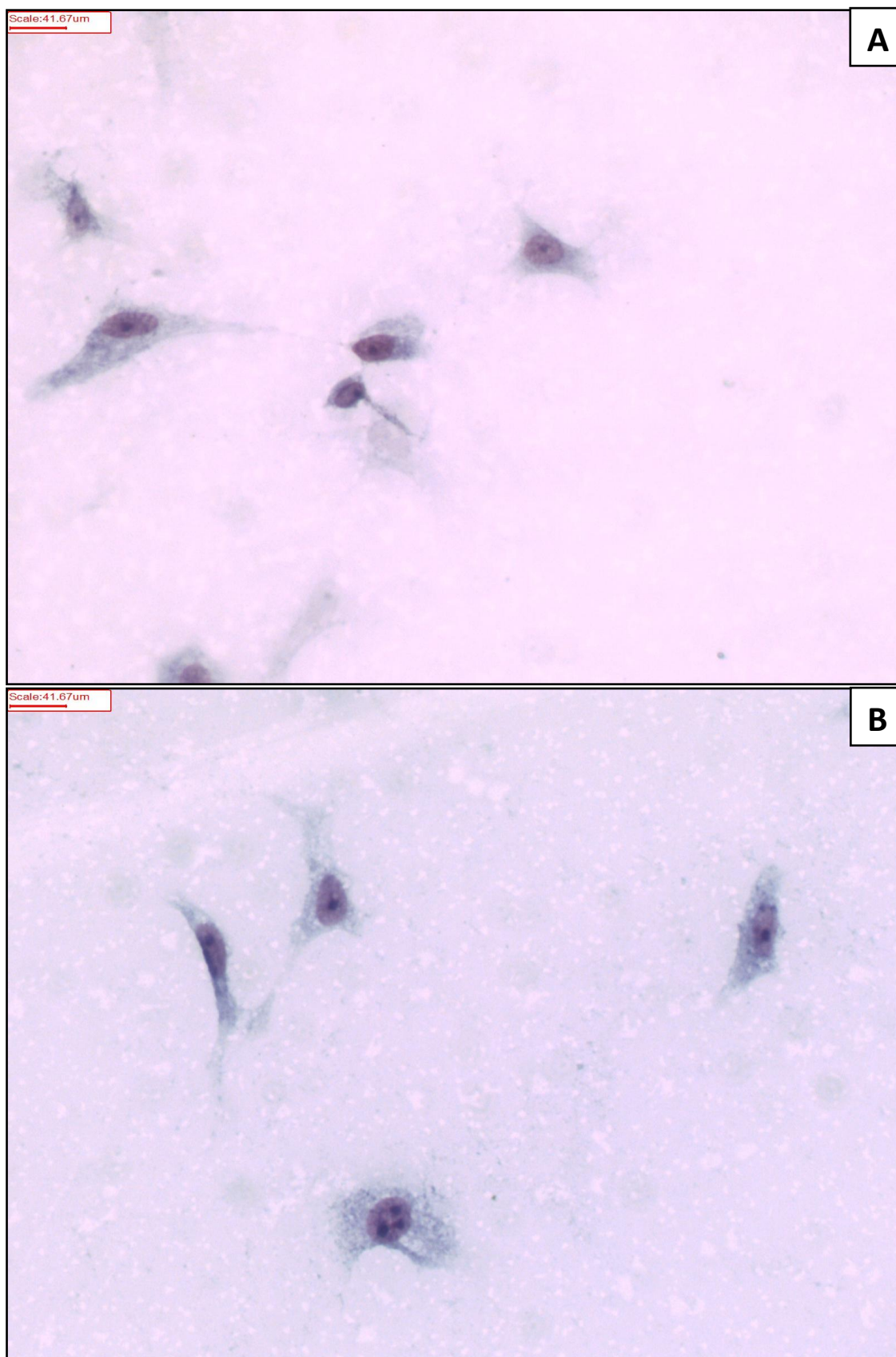


Figura 25. Microscopia óptica para células Vero incubadas com ricina na concentração final de 1 $\mu\text{g/mL}$. A) Experimento com troca de meio em 24 horas de incubação; B) Experimento com 48 horas corridas de incubação. A barra em vermelho indica a escala no tamanho de 41,67 μm .

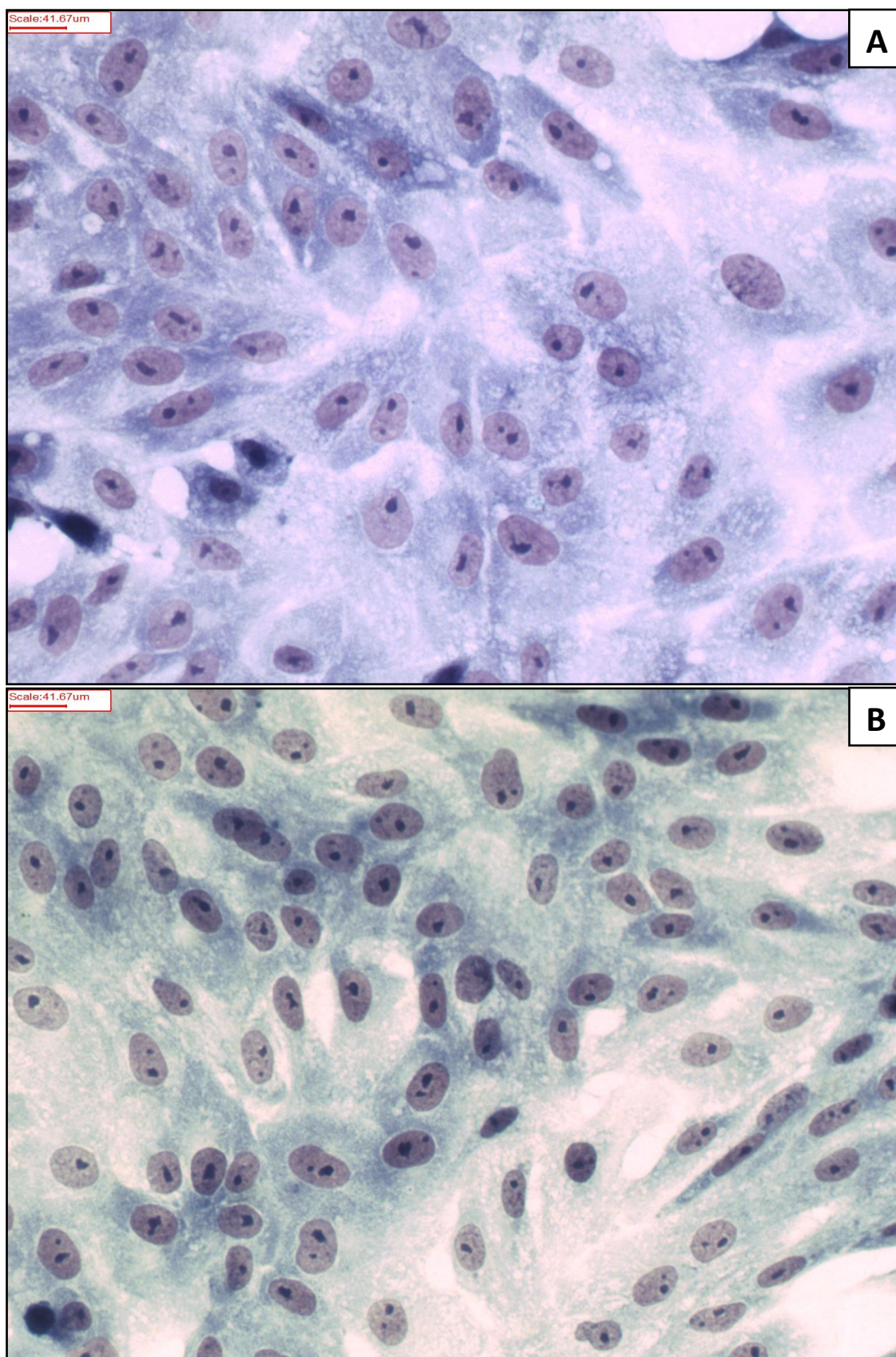


Figura 26. Microscopia óptica para células Vero incubadas com ricina pré tratada com CaO 5% por 1 hora. A) Experimento com troca de meio em 24 horas de incubação; B) Experimento com 48 horas corridas de incubação. A barra em vermelho indica a escala no tamanho de 41,67 μm.

Para avaliar as possíveis modificações estruturais que estariam ocorrendo na proteína para sua inativação após o tratamento com cálcio, foi feito um ensaio de *Dot blotting* para verificar se anticorpos anti-cadeia A de ricina poderiam reconhecer a toxina. O resultado mostrou que o anticorpo reconheceu a ricina não tratada e também a toxina tratada com 0,15% de CaO (Figura 27). Além disso o anticorpo não se ligou à proteína depois do tratamento com 10%, 2,5% e 0,6% de CaO, que foram as concentrações eficientes para destoxificação. Estes resultados sugerem que houve modificações na estrutura da proteína, ao menos na sua cadeia A, o que evitou o reconhecimento pelo anticorpo.

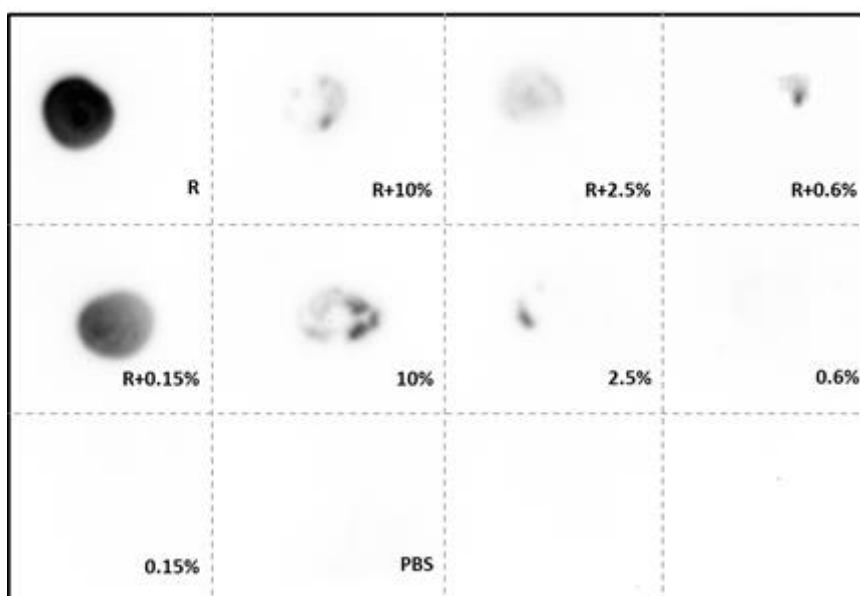
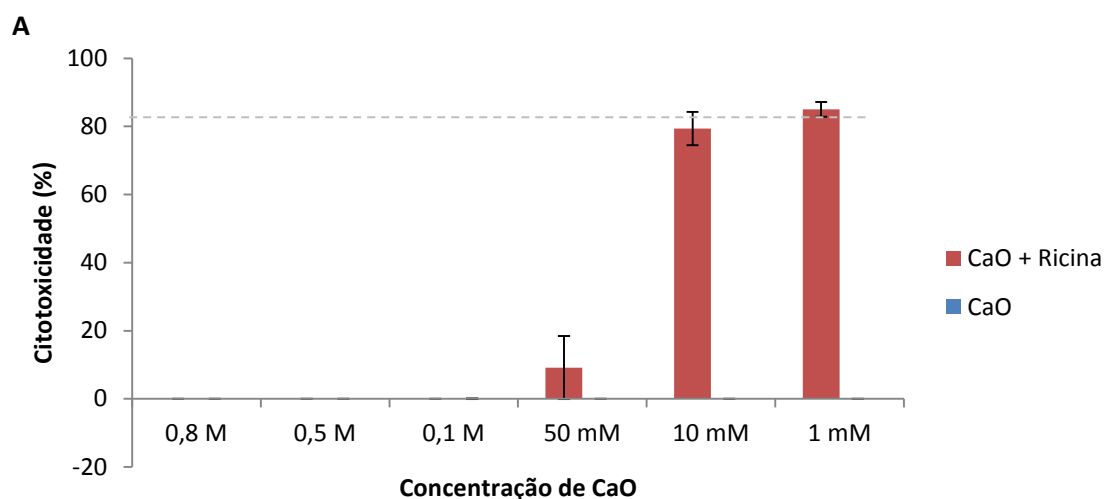


Figure 27. *Dot Blotting* da ricina tratada com diferentes concentrações de CaO. R = ricina não tratada; R+10%, 2.5%, 0.6% e 0.15% = ricina tratada com 10%, 2.5%, 0.6% e 0.15% de CaO respectivamente. 10%, 2.5%, 0.6% e 0.15% de soluções de CaO e PBS sem a toxina foram usados como controle negativo.

Uma forma de testar se o cálcio é realmente o responsável pela inativação da toxina foi utilizar um agente quelante. Dessa forma, o cálcio da amostra seria capturado e não teria efeito sobre a toxicidade da ricina. Para isso EGTA foi usado. Num primeiro experimento foram definidas doses eficientes de CaO (em molaridade) e não tóxicas de EGTA, usando somente os compostos individualmente, com e sem ricina. Observou-se que 50 mM de CaO foi a concentração mínima eficiente para a desativação da toxina (Figura

28). O EGTA individualmente é tóxico quando usado em altas concentrações, no entanto as células incubadas com concentração igual ou menor à 10 mM sobreviveram (Figura 28B). Para testar o efeito quelante sobre a inativação da ricina diferentes combinações para concentrações de CaO + EGTA, com e sem ricina, foram utilizadas. Usando-se 50 mM de EGTA obteve-se uma concentração tóxica do composto individualmente (como visto na Figura 28B), mas quando nós foi utilizado esta concentração combinada com 50 mM de CaO, o controle sem ricina sobreviveu. No entanto, ao utilizar a mesma combinação de EGTA 50 mM + CaO 50 mM com ricina, mesmo utilizando uma concentração de CaO eficiente para inativação da ricina (como visto na Figura 28A), observou-se citotoxicidade. Assim, seria possível que, ao quelar o cálcio adicionado no sistema, o composto não inativaria a ricina. Fixando-se a concentração de CaO à 50 mM e diminuindo-se a concentração do EGTA adicionado (10 mM e 1 mM), verificou-se que a toxina perdeu a toxicidade. Provavelmente a baixa concentração de EGTA utilizada não foi suficiente para capturar o cálcio do tratamento. Dessa forma, este experimento demonstrou que o cálcio poderia estar envolvido na inativação da toxina, uma vez que a sua provável captura pelo EGTA levou à ineficácia no processo de desativação da ricina.



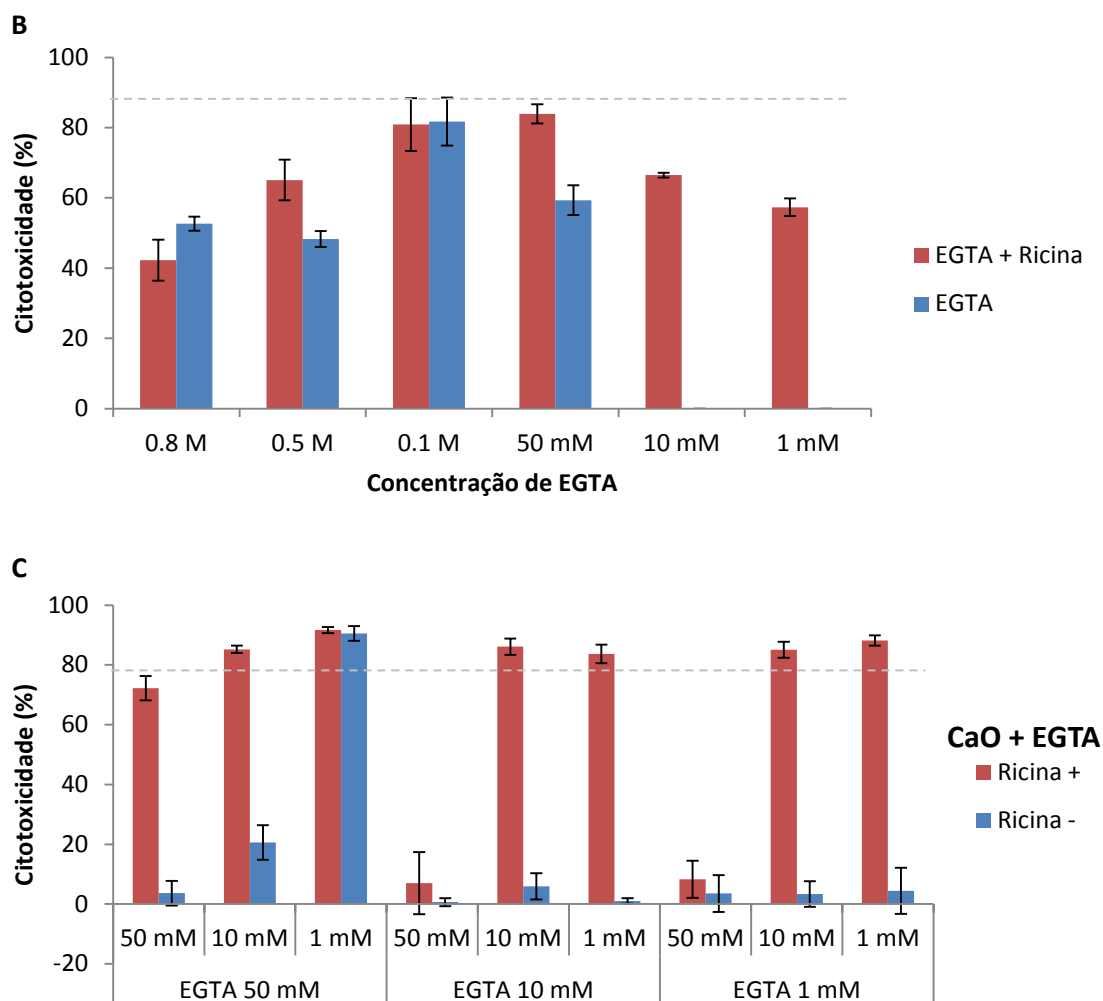


Figura 28. Ensaio de citotoxicidade para: A) CaO; B) EGTA separadamente em diferentes concentrações, com e sem ricina; C) CaO + EGTA (diferentes concentrações) com e sem ricina. O eixo x corresponde à três diferentes concentrações de CaO (50 mM, 10 mM e 1 mM) para cada concentração de EGTA testada. Ricina foi utilizada como controle positivo (----), com citotoxicidade de 82% (A), 87% (B) e 78% (C).

Uma vez que o pH das soluções de cálcio utilizadas nos tratamentos é muito alcalino (por volta dos 12), a ricina foi pré-tratada em tampões, sem cálcio, em diferentes faixas de pH (2 a 13). Primeiramente a presença da ricina após o tratamento foi avaliada por SDS-PAGE (Figura 29), e foi visto que as bandas das cadeias A (32 kDa) e B (34 kDa) desapareceram das amostras tratadas com tampão em pH 12.

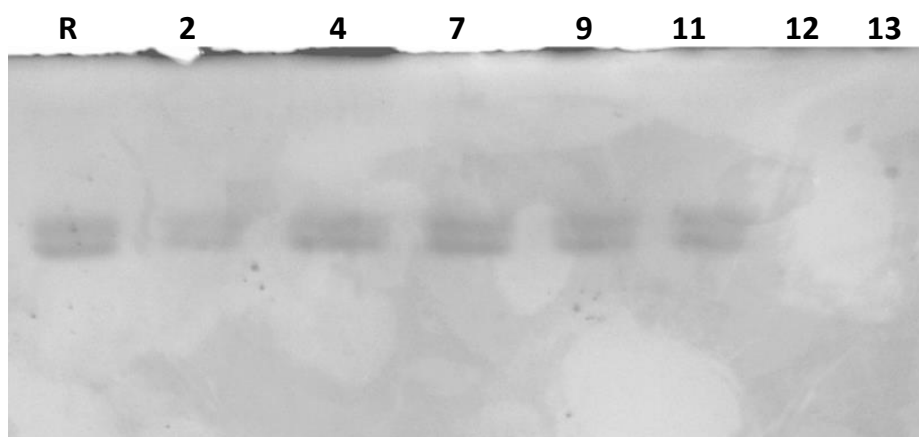


Figure 29. SDS-PAGE da ricina tratada com PBS em diferentes faixas de pH. Os números sobre as raias indicam o pH do tampão utilizado no tratamento. R = ricina não tratada.

A citotoxicidade também mostrou resultados similares. Do pH 2 ao 11 o tratamento foi ineficaz para inativação da ricina, enquanto amostras tratadas com PBS em pH 12 perderam a toxicidade (Figura 30). O tampão de pH 13 alcalinizou o meio de cultura, tornando-o inviável para a sobrevivência das células, como mostra o controle negativo, sem ricina, na Figura 30 (barras azuis).

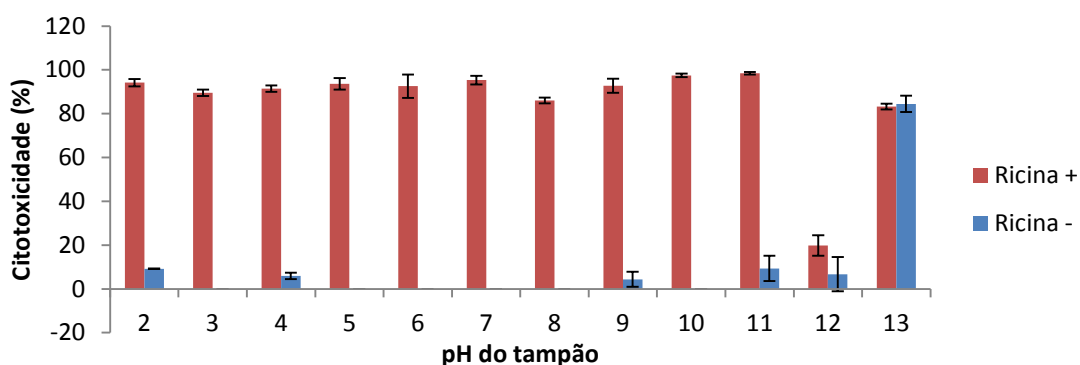


Figura 30. Citotoxicidade da ricina após o tratamento com PBS em diferentes faixas de pH. Os números nos eixo x representam os valores de pH testados.

Dessa forma foi observado mais um indicativo de que a eficiência da inativação da ricina, pelo tratamento com cálcio, pode estar relacionada à hidrólise alcalina da proteína.

DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

Entre as espécies de oleaginosas cultivadas no Brasil, a mamoneira é uma das menos exigentes em termos de clima, solo e manejo cultural. Além disso, ela tem a capacidade de gerar um produto (o óleo) cujo leque de possibilidades e aplicações industriais é bastante amplo (BELTRÃO & LIMA, 2007).

Com a implantação do programa de produção de biodiesel (PROBIODIESEL – Portaria MCT nº 702, de 30.10.2002), a tendência é que ocorra um aumento na disponibilidade de rejeitos agroindustriais oriundos da extração de óleo, dentro dos quais encontra-se a torta de mamona. Outrora considerada um sub-produto da extração de óleo, a torta de mamona é atualmente considerada um produto rico em nutrientes e já é utilizado como fertilizante (SILVA *et al*, 2013). Devido ao seu alto teor proteico, poderia ainda ser utilizada como alternativa para a alimentação de animais. No entanto, esta aplicação esbarra no problema da presença de compostos tóxicos, sendo o principal componente tóxico da torta de mamona, a proteína inativadora de ribossomos, ricina. Atualmente encontra-se em estudo diversos tratamentos para a eliminação da ricina presente na torta de mamona.

Muitos processos para destoxificação da torta de mamona já foram descritos mas não tiveram o mecanismo de inativação da toxina elucidado (DEUS-DE-OLIVEIRA & MACHADO, 2011). Além disto, poucos processos utilizaram métodos de validação baseado em teste *in vivo*, analisando a atividade biológica da ricina. Um método que se mostrou eficiente para eliminação da ricina em rejeito de mamona (um resíduo alcalino diferente da torta, gerado por um processo de produção de biodiesel da Petrobras) é a fermentação em estado sólido (FES). Godoy *et al.* (2009) mostrou que ao utilizar este rejeito como substrato para produção de lipases pelo fungo *Penicillium simplicissimum*, os níveis de ricina eram reduzidos a concentrações indetectáveis por SDS-PAGE e cromatografia. Os autores descrevem que a FES também reduziu o potencial alergênico do rejeito. O processo para o rejeito foi otimizado e a destoxificação foi também confirmada por ensaios de citotoxicidade em cultura de células Vero, segundo a metodologia descrita por

Fernandes (2010). Assim conclui-se que a FES do rejeito alcalino por *P. simplicissimum* era realmente eficiente (GODOY *et al.*, 2012).

A adequação da FES para o rejeito de mamona não foi suficiente para destoxificar a torta de mamona. Nosso grupo realizou estudos prévios com FES para destoxificação da torta de mamona (a tradicional, obtida por prensagem das semente), utilizando *Aspergillus niger*, um fungo considerado GRAS (Fernandes, 2010), obtendo resultados preliminares positivos. No presente trabalho foi mostrado que a torta de mamona fermentada por *A. niger* foi destoxificada após 24 horas de fermentação. Todos os testes foram realizados em triplicata, e a avaliação da citotoxicidade foi feita por contagem de células e medida de atividade de LDH. Com 36 horas de incubação já era possível comparar a atividade tóxica da torta *in natura* com a fermentada. A atividade biológica foi avaliada pelo ensaio de citotoxicidade, no qual verificou-se que o material fermentado estava parcialmente isento de componentes tóxicos. Isto porque, apesar da toxicidade não ter sido constatada (ou vista em níveis baixos) em 24 e 48 horas de fermentação, as amostras correspondentes a 72 e 96 horas apresentavam alguma toxicidez, visto que o crescimento celular sofreu uma inibição (Figura 24A). Por dosagem da atividade de LDH também observou-se que as amostras de 72 e 96 horas apresentam alguma citotoxicidade, mesmo que baixa comparado com a torta *in natura* (Figura 24B). No entanto, não poderíamos apontar a ricina como agente tóxico em questão sem antes checar a especificidade desta, o que foi feito pelo teste usando anticorpo anti-cadeia A. Desta forma, constatou-se que a ricina provavelmente não é a toxina responsável pelo mal crescimento das células tratadas com extrato fermentado por 72 e 96 horas. Isto porque, mesmo com o anticorpo bloqueando o sítio ativo da cadeia A na ricina que poderia estar presente (STIRPE & BATELLI, 2006), as células tratadas pelas amostras em questão continuaram apresentando sinais de intoxicação (liberação de LDH). Uma possível explicação para o caso seria a produção de algum componente tóxico pelo fungo.

Apesar de ser considerado um microrganismo GRAS, algumas cepas de *A. niger* podem produzir ocratoxina A (OTA), mesmo que em baixas concentrações (ESTEBAN *et al.*, 2006). Ocratoxina A, a mais potente dentre as ocratoxinas, provoca graves alterações teciduais em rim de humanos e

animais. Pel *et al.* (2007) mostraram, através do sequenciamento do genoma de *A. niger*, que este apresentava homólogos aos genes envolvidos na síntese de fumonisinas por *F. verticillioides*. Dessa forma, a síntese desta toxina por *A. niger* pode estar relacionada às condições de cultivo deste fungo.

A FES utiliza resíduos sólidos da agroindústria, de composição bastante complexa, e os microrganismos que crescem nesse tipo de processo necessitam produzir diversas enzimas capazes de degradar e tornar disponíveis os nutrientes presentes no meio de cultivo, dentre elas as proteases (GOMBERT *et al.* 1999; PALMA *et al.*, 2000). A maior produção de protease foi obtida, no presente trabalho, em 48 horas de fermentação, com uma atividade inferior a encontrada por Godoy (2009) no rejeito alcalino de mamona. Crespo-Neto (2009) mostrou que metalo-proteases estão envolvidas na degradação da ricina armazenada durante determinado tempo em determinadas condições. Assim, as proteases produzidas pelo *A. niger* poderiam estar hipoteticamente associadas à degradação da toxina por proteólise.

Apesar da torta de mamona passar por processo de autoclavagem antes de ser utilizada como substrato para FES, sabe-se que este processo, realizado para eliminar microrganismos contaminantes, não é suficiente para eliminar a ricina (FERNANDES, 2010; GODOY *et al.*, 2012), o que reforça a hipótese de que a destoxificação é devida à presença de proteases produzidas durante o crescimento do fungo. Recentemente outras publicações têm surgido com o uso de FES para destoxificação de resíduos agroindustriais, não só para torta de mamona (MADEIRA *et al.*, 2011) como também para torta de pinhão manso (KASUYA *et al.*, 2012).

Embora muitas técnicas de destoxificação de torta de mamona já terem sido descritas, muitas delas ainda utilizam métodos para detecção de ricina que não são suficientes para comprovarem a destoxificação, como por exemplo a eletroforese (ANANDAN *et al.*, 2005), *Western blotting* (BARNES *et al.*, 2009) e cromatografia (GODOY *et al.*, 2009). Desta forma, ao propor novos métodos de destoxificação da torta de mamona, o desenvolvimento de um ensaio eficiente que possa detectar não só a presença, mas também a atividade tóxica da ricina em células de mamíferos fez-se necessário. Fernandes e Machado (2012) descrevem dezenas de técnicas usadas até o momento para detecção de

ricina, não só em torta de mamona, mas como em várias outras matrizes, como alimentos e bebidas.

A ricina é uma toxina de uso potencial em bioterrorismo, e por isso técnicas que detectem quantidades mínimas de ricina em pouco tempo vêm sendo estudadas (ATLAS, 2002; FERNANDES & MACHADO, 2012). No entanto, praticamente nenhuma delas até então havia sido padronizada para torta de mamona. Os primeiros testes em células Vero para detecção de ricina extraída de torta de mamona foram conduzidos por Fernandes (2010), e então padronizados no presente trabalho (avaliação de dose resposta para ricina pura e uso de anticorpo para avaliação qualitativa). Foram testadas diferentes concentrações de ricina (holotoxina isolada) a fim de determinar a concentração mínima necessária para induzir morte celular, onde a menor dose letal para as células Vero foi de 10 ng/mL após 24 horas de incubação. Foi visto então que o ensaio proposto é capaz de detectar ricina na concentração de até 10 ng/mL. Um ensaio semelhante, proposto por Brzezinski e Craft (2007), mostrou que células Jurkat (linfócitos T derivados de linfoma) tratadas com ricina respondiam à ação tóxica numa concentração mínima de 100 pg/mL. A avaliação do ensaio foi feita apenas por dosagem da atividade de LDH, visto que células Jurkat são de linhagem não aderente, o que dificulta a contagem. Dessa forma, o ensaio proposto no atual trabalho mostra-se em vantagem, uma vez que oferece uma maior versatilidade na avaliação do comportamento celular, permitindo a sua utilização em laboratórios apropriados ao uso tanto da contagem de células aderidas, quanto da dosagem de atividade enzimática.

Outros métodos descritos na literatura se mostram mais eficazes no que diz respeito ao limite de detecção da ricina. Um exemplo é o imuno-PCR (LUBELLI *et al.*, 2006), que combina a especificidade de uma análise imunológica com a amplificação exponencial do PCR, e detecta ricina em até 0,01 pg/mL. No entanto, este e muitos outros ensaios baseados em ligação de anticorpo, não apresentam eficácia em mostrar a atividade tóxica da proteína. Além disso, kits para PCR são caros, e a aplicação do método em maior escala pode ser inviável. Outros métodos para detecção de ricina, com seus prós e contras são discutidos por Fernandes e Machado (2012), e estão disponíveis no Anexo 3 do presente trabalho.

Vários autores descrevem o tratamento da torta de mamona com CaO e Ca(OH)₂ como método eficiente de eliminação da ricina (ANANDAN *et al.*, 2005; BARNES *et al.*, 2009; FERNANDES, 2010). No entanto a confirmação desta destoxificação vem sendo feita principalmente por métodos de detecção como eletroforese e *Western blotting*. Sabe-se que a sensibilidade destes métodos é bem reduzida comparado à outros já descritos, e o teste biológico que mostre atividade tóxica da ricina ou de qualquer outro composto na torta após o tratamento é de extrema importância antes de utilizar este produto para alimentação animal. Mesmo que para testes de caráter acadêmico o teste em animais sirva como determinação de atividade tóxica, a aplicação de métodos de destoxificação em escala maior precisa de testes simplificados que não exijam sacrifícios de animais a cada novo lote do produto. No presente trabalho mostramos que o tratamento da torta de mamona com sais de cálcio reduz os níveis de ricina, como pode ser visto em gel de poliacrilamida. Demonstramos através de ensaios de citotoxicidade, a ausência de qualquer atividade tóxica da torta em células Vero. Verificamos que o CaCO₃ não foi eficiente na eliminação da toxicidade causada pela ricina. Por outro lado, já foi demonstrado que o CaCO₃ é eficiente para a desalergenização da torta de mamona, bem como o CaO e o Ca(OH)₂ (FERNANDES *et al.*, 2012; DEUS-DE-OLIVEIRA, 2014). Tanto o óxido quanto o hidróxido de cálcio se mostraram eficazes para redução dos níveis de ricina na torta, como visto por eletroforese, e na eliminação da toxicidade, como foi observado nos testes de citotoxicidade, especialmente após 48 horas de incubação em células Vero, sendo que os melhores resultados foram obtidos com soluções de CaO e Ca(OH)₂ a 8%. Tais compostos de cálcio já são tradicionalmente usados na indústria de rações animais para hidrólise de proteínas, o que facilita a digestão pelo animal (PERRY JR & HAZEL, 1946; USMAN *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2011; SAHRAEI *et al.*, 2012). E nesse caso, o método seria interessante para aplicação na indústria de óleo de mamona que gera grande quantidade de torta.

Ainda que vários métodos já tenham sido descritos para desativação de ricina na torta de mamona, não consta na literatura nenhum trabalho que tenha utilizado a toxina pura com o intuito de elucidar o mecanismo pelo qual ocorre a sua inativação. Alguns experimentos com o propósito de elucidar a ação dos

compostos de cálcio sobre a ricina foram realizados. Já foi mostrado pelo nosso grupo que as albuminas 2S, principais alérgenos de mamona, podem ter a atividade alergênica eliminada por tratamento com os mesmos compostos de cálcio, e uma das possíveis causas seria uma modificação química de um resíduo de ácido glutâmico (Glu) importante para a ligação do alérgeno com anticorpos do tipo IgE (FERNANDES *et al.*, 2012), interação fundamental para o deflagração do processo alérgico. Sabemos que a ricina também possui um resíduo de ácido glutâmico (Glu₁₇₇) que é crítico para sua atividade tóxica (LORD *et al.*, 1994; DAY *et al.*, 1996). Assim, estudos de inativação da toxina utilizando óxido e hidróxido de cálcio e checando a atividade da proteína em ensaios de citotoxicidade foram realizados. Foi observado que para a holotoxina purificada, a menor concentração de CaO e Ca(OH)₂ eficiente para sua inativação foi de 0,3%. Concentrações mais baixas, 0,15% e 0,075%, não foram capazes de eliminar a atividade tóxica da ricina. Para os testes de citotoxicidade, foram utilizadas duas concentrações diferentes de ricina, 5 ng/mL e 1 µg/mL, e obtivemos os mesmos resultados. Ao verificar por eletroforese a presença da ricina no material tratado os resultados, não foram visualizadas bandas proteicas para os tratamentos de maior concentração de cálcio (eficientes na desativação), enquanto para as concentrações de 0,15% e 0,075% as cadeias de ricina puderam ser observadas. A diminuição da intensidade para essas duas concentrações mais baixas sugere que o cálcio esteja, de certa forma, impedindo a entrada da ricina no gel. A não visualização da toxina ou de produtos de degradação (peptídeos de baixo peso molecular) sugere que a formação de agregados proteicos de alto peso molecular possa estar ocorrendo após o tratamento com sais de cálcio. Uma outra possibilidade seria que o pH alcalino das soluções de CaO e Ca(OH)₂ estivessem interferindo na entrada ou migração da toxina (ou fragmentos de degradação) no gel de poliacrilamida 12%. Desta forma, as proteínas nas amostras tratadas foram precipitadas utilizando TCA 20%, e resuspendidas em tampão de mesmo pH (7,0), para então aplicar no gel. Da mesma forma, também não foram visualizadas bandas proteicas para os tratamentos eficientes. Para as amostras tratadas com CaO 0,15% traços de uma das cadeias da toxina puderam ser observados no gel. . Sabe-se que íons cálcio podem induzir agregação de proteínas, levando à perda de função ou mesmo gerando formas tóxicas de

proteínas antes não prejudiciais (LOWE *et al.*, 2004). Um exemplo é a doença de Parkinson, que está associada à agregação anormal de proteínas do tipo α -sinucleína, onde o cálcio é um indutor da formação de agregados desta proteína (NATH *et al.*, 2010). Assim a agregação de proteínas induzidas por CaO seria uma possibilidade para o fato da ricina ou fragmentos não serem observados no gel após o tratamento, mesmo eliminando a interferência do pH.

Ao verificar a eficiência dos compostos de cálcio em inativar a ricina em tratamento prévio aos testes de citotoxicidade, foi testado também a capacidade da ricina de conferir proteção às células tratadas com ricina. Já foi mostrado que tratamentos com manganês são eficientes em inibir a citotoxicidade causada por toxina Shiga (STx), uma outra RIP do tipo 2, em cultura de células e em ratos (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2012). De acordo com os autores, isto ocorre porque o Mn^{2+} bloqueia o transporte de STx do endossomo para o Golgi, e então a toxina é degradada nos lisossomos. Sendo assim, foram realizados testes de citotoxicidade com o tratamento no tempo zero, com incubação da ricina na cultura de células, seguido imediatamente dos compostos de cálcio. Foi observado que as soluções de maior concentração de CaO e $Ca(OH)_2$, contendo material insolúvel (1,25% e 0,6%), foram prejudiciais ao crescimento celular mesmo na ausência da toxina (Figura 14). No entanto, mesmo quando o tratamento foi feito com CaO e $Ca(OH)_2$ 0,3%, ora visto como eficaz no tratamento prévio da ricina antes da incubação nas células, não funcionou como proteção neste tipo de ensaio.

O trabalho também objetivou reduzir o tempo de tratamento, comparado com o que já foi visto para albuminas 2S (DEUS-DE-OLIVEIRA, 2014) e mesmo para a ricina em trabalhos anteriores (ANANDAN *et al.*, 2005) e no tratamento que realizamos anteriormente para a torta (descrito na metodologia). Obsevou-se que, em 30 minutos, já foi possível alcançar a inativação da toxina com o tratamento de CaO 5% e 0,6%. Anandan *et al.* (2005) obteve os melhores resultados de inativação de ricina após 5 horas de tratamento da torta de mamona com CaO e 2,5 horas de tratamento com $Ca(OH)_2$. O tratamento para inativação de alérgenos com os mesmos compostos e $CaCO_3$ tiveram bons resultados após 12 horas (DEUS-DE-OLIVEIRA, 2014). Dessa forma, comparado com o método anteriormente mais

rápido (5 horas ou 300 minutos) utilizando CaO, o tempo necessário para desativação da toxina foi 10 vezes menor.

Para verificar as modificações estruturais na cadeia A da ricina, foi realizado um ensaio de *Dot blotting* utilizando anticorpo anti cadeia A de ricina. O não reconhecimento da toxina após tratamento com CaO a 10%, 2,5% e 0,6% nos indica que o tratamento altera a estrutura da cadeia A da toxina.

Para tentar confirmar mais uma vez se o cálcio é necessário para a desativação da toxina, um ensaio utilizando EGTA como quelante, com o propósito de capturar o Ca^{2+} das soluções de tratamento e entender a sua necessidade para a desativação da toxina foi realizado (OUANOUNOU *et al.*, 1999; NISHITANI *et al.*, 2011). Ao utilizar uma concentração de CaO eficiente para desativação da ricina em adição de EGTA na mesma concentração (CaO 50 mM + EGTA 50 mM), foi observado que as células incubadas com ricina tratada nesta solução morriam, o que não deveria ocorrer caso tivessem sido tratadas apenas com CaO, sem EGTA. No mesmo experimento o controle sem ricina, mesmo sendo incubado com uma solução mais alta que o apropriado de EGTA, não sofreu ação tóxica, devido à equivalente concentração de cálcio disponível na solução de CaO + EGTA. Ao diminuir a concentração de EGTA para 10 mM em adição de 50 mM de CaO, observou-se que a ricina foi inativada, pois a baixa concentração de EGTA não foi suficiente para capturar o cálcio da solução, mostrando então que Ca^{2+} pode mesmo ser essencial para a inativação da ricina.

No entanto, observamos que a adição de EGTA 50 mM à solução de CaO 50 mM para o tratamento da ricina ocasionou um decréscimo do pH da solução de cálcio de 12,1 para 11,4. Sabe-se que, devido ao elevado pH, o hidróxido de cálcio realiza hidrólise alcalina de proteínas (USMAN *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2011). Dessa forma, utilizou-se tampões em diferentes faixas de pH para pré-tratar a ricina, da mesma forma que foi feito anteriormente com os compostos de cálcio, e então avaliou-se a citotoxicidade da toxina e sua presença nas amostras por eletroforese. Em pH 12 a toxina teve sua toxicidade reduzida, enquanto os tampões abaixo disso não foram eficientes. As soluções de CaO e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ entre 10% e 0,3% testadas para desativação de ricina possuem pH entre 12,4 e 11,6. As soluções não eficientes na desativação da toxina (0,15% ou menores) possuem pH igual ou inferior à 11,2, o que seria

condizente com os resultados obtidos, no caso a toxina pode ter sido hidrolisada.

Dessa forma, estes primeiros resultados sugerem fortemente que a ricina seja hidrolisada pelas soluções alcalinas de CaO e Ca(OH)₂. Apesar das suspeitas de Deus-de-Oliveira (2014) de que houvesse incorporação do Ca²⁺ em resíduos de ácido glutâmico nos epitopos alergênicos das albuminas 2S, inativando a alergenicidade da proteína, um recente trabalho do mesmo autor mostrou, por análise em espectrometria de massas, que os alérgenos de mamona tratados com CaO e Ca(OH)₂ sofrem hidrólise alcalina, o que acarreta na desalergenização da torta de mamona (DEUS-DE-OLIVEIRA, 2014). Assim, para melhor elucidar o que ocorre com a estrutura da ricina, novos estudos precisam ser realizados, e a espectrometria de massas pode ser uma interessante ferramenta para estudos futuros.

CONCLUSÕES

6 – Conclusões

- O teste de citotoxicidade padronizado para detecção de ricina em células Vero mostrou-se eficiente para indicar concentrações relativamente baixas da toxina, baseado na sua atividade biológica.
- A adição de anticorpos específicos para a cadeia A da toxina ainda conferem caráter qualitativo ao ensaio.
- A fermentação em estado sólido utilizando *Aspergillus niger* destoxificou a torta de mamona, como pôde ser observado por análise em gel de poliacrilamida e pelos testes de citotoxicidade utilizando extrato proteico total do farelo.
- Durante o crescimento do fungo verificou-se produção de proteases
- Os tratamentos da torta de mamona com óxido e hidróxido de cálcio foram eficazes para a desativação da ricina no material, como foi observado por ensaios de citotoxicidade.
- Soluções de CaO e Ca(OH)₂ a 0,6%, em 1 hora, são eficazes para a desativação da toxina purificada.
- Ocorrem modificações estruturais na cadeia A da toxina, que após o tratamento com os compostos de cálcio.
- O alto pH das soluções de cálcio e a presença de íons Ca²⁺ podem ser responsáveis pela desativação da toxina.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLA, G.; CABANES, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 60, p. 2650-2652, 1994.
- AGÊNCIA BRASIL. Disponível em: <http://memoria.ebc.com.br/agenciabrasil/noticia/2013-12-19/distribuidoras-pedem-aumento-gradual-da-adicao-de-biodiesel-ao-diesel>). Último acesso em 12/01/2014. 2013.
- AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. B. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 12, p. 6-9, 1981.
- AMBEKAR, V. R.; DOLE, K. K.. Detoxification of castor cake. *Indian Journal of Dairy Science*. v. 10, p. 107–122, 1957.
- ANANDAN, S.; ANIL KUMAR, G. K.; GHOSH, J.; RAMACHANDRA, K. S. Effects of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor bean cake. *Animal Feed Science and Technology*. v. 120, p. 159-168, 2005.
- ATLAS, R.M. Bioterrorism: from threat to reality. *Annual Reviews on Microbiology*. v. 56, p. 167-189, 2002.
- AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, J.; SCHIER, J.; OSTERLOH, J. Ricin poisoning: a comprehensive review. *Journal of the American Medical Association*. v. 294, p. 2342-2351, 2005.
- AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. *O agronegócio da mamona no Brasil*. Campina Grande: Embrapa Algodão, 350 p, 2001.
- BANDEIRA, D. S.; CARTAXO, W. V.; SEVERINO, L. S.; BELTRÃO, N. E. M. Resíduo industrial da mamona como fonte alternativa na alimentação animal. *I Congresso Brasileiro de Mamona - Conferência*. Novembro 23-26, Campina Grande-PB, 2004.
- BARNES, D. J.; BALDWIN, B. S.; BRAASCH, D. A. Degradation of ricin in castor seed meal by temperature and chemical treatment. *Industrial Crops and Products*. v. 29, p. 509-515, 2009.

- BECHER, F.; DURIEZ, E.; VOLLAND, H.; TABEL, J. C.; EZAN, E. Detection of functional ricin by immunoaffinity and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. v. 79, p. 559-565, 2007.
- BELTRÃO, N. E. M.; LIMA, R. L. S. Aplicação do óleo de mamona como fonte de energia: Biodiesel. In: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M (Ed.). *O agronegócio da mamona no Brasil*. 2ª Edição, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília-DF, p. 395-416, 2007.
- BHATIA, Y. N.; MOHAPATRA, L. N. Experimental aspergillosis in mice. Part I: Pathogenic potential of *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Mykosen*. v. 12, p. 651-654, 1969.
- BIRK, R.; BRAVDO, B.; SHOSEYOV, O. Destoxification of cassava by *Aspergillus niger* B-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 45, p. 411-414, 1996.
- BORÉM, A.; SAVY FILHO, A. Melhoramento da mamoneira. In: *Melhoramento de plantas cultivadas*. Editora UFV, Viçosa-MG, p. 385-407, 1999.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Lei 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. Brasília, 25 de outubro 2005.
- BREITENEDER, H.; RADAUER, C. A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 113, p. 821-30, 2004.
- BRZEZINSKI, J. L.; CRAFT, D. L. Evaluation of an in vitro bioassay for the detection of purified ricin and castor bean in beverages and liquid food matrices. *Journal of Food Protection*. v. 70, p. 2377-2382, 2007.
- CARRIELO-GAMA, C. Desenvolvimento de uma tecnologia para desativar epítomos alergênicos de *Ricinus communis* (mamona). *Monografia – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2006*.

- CARVALHO, M. E. A. Estudo para obtenção de concentrados de proteínas da mamona desintoxicados e desalerginizados. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 1978.
- CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA JR, G. L.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*. v. 4, p. 239-247, 2000.
- CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *Journal of Biological Chemistry*. v. 171, p. 501-505, 1947.
- CRESPO-NETO, H. A. Avaliação dos teores de ricina e de proteases envolvidas no processamento desta toxina em torta de mamona. *Dissertação de mestrado* – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2009.
- DAI, W. D.; BONOS, S.; MEYER, W. A.; DAY, P. R.; BELANGER, F. C. Expression of pokeweed antiviral proteins in creeping bentgrass. *Plant Cell Reports*. v. 21, p. 497-502, 2003.
- DANTAS, E. M.; AQUINO, L. C. L. Fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais para a obtenção de lipase microbiana. *XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos – Resumo Expandido*. Agosto 02-05, Natal-RN, 2009.
- DAY, P. J.; ERNST, S. R.; FRANKEL, A. E.; MONZINGO, A. F.; PASCAL, J. M.; ROBERTUS, J. D. Structure and activity of an active site substitution of ricin A chain. *Biochemistry*. v. 35, p. 11098-11103, 1996.
- DELEHANTY, J. B.; LIGLER, F. S. A microarray immunoassay for simultaneous detection of proteins and bacteria. *Analytical Chemistry*. v. 74, p. 5681-5687, 2002.
- DEUS-DE-OLIVEIRA, N. Alérgenos de oleaginosas: Tratamento químico para redução da alergenicidade, detecção no ar e resposta imune. *Dissertação de mestrado* – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2014.

- DEUS-DE-OLIVEIRA, N.; FÉLIX, S. P.; CARRIELO-GAMA, C.; FERNANDES, K. V.; DAMATTA, R. A.; MACHADO, O. L. T. Identification of critical amino acids in IgE epitopes of Ric c 1 and Ric c 3 and use of glutamic acid as IgE-blocker. *Plos One*. 6(6): e21455, 2011.
- DEUS-DE-OLIVEIRA, N; MACHADO, O. L. T. Allergens and toxins of oleaginous plants: problems and solutions. *In: Enviromental impact of Biofuels*. Intech Open. p. 41-66, 2011.
- DINIZ, L. L.; VALADARES FILHO, S. C.; OLIVEIRA, A. S; PINA, D. S.; DA SILVA, L. D.; BENEDETI, P. B.; BAIÃO, G. F.; CAMPOS, J. M. S.; VALADARES, R. F. D. Castor bean meal for cattle finishing: nutritional parameters. *Livestock Science*. v. 135, p. 153-167, 2011.
- DURAND, A.; ALMANZA, S.; RENAUD, R; MARATRAY, J. Solid state fermentation: an attractive alternative to sumerged liquid fermentation. *Agro Food Industry Hi-tech*. v. 8, p. 39-42, 1997.
- EHREN, J.; MORÓN, B.; MARTIN, E.; BETHUNE, M. T.; GRAY, G. M.; KHOSLA, C. A food-grade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. *PLOS One*. v. 4, e6313, 2009.
- ENDO, Y.; GLUCK, A.; WOOL, I. G. Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. *Journal of Molecular Biology*. v.221, p. 193-207, 1991.
- ENDO, Y.; TSURUGI, K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*. v.262: p. 8128-8130, 1987.
- ESTEBAN, A.; ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CABANES, F. J. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *Food Microbiology*. v. 23, p. 634-640, 2006.
- FÉLIX, S. P.;MAYERHOFFER, R. O.; DAMATTA, R. A.; VERÍCIMO, R. A.; NASCIMENTO, V. V.; MACHADO, O. L. T. Mapping IgE-binding epitopes of Ric c 1 and Ric c 3, allergens from *Ricinus communis*, by mast cell degranulation assay. *Peptides*. v. 29, p. 497-504, 2008.
- FERNANDES, K. V. Desenvolvimento de um bioensaio para detecção da ricina e utilização da fermentação em estado sólido para destoxificação da torta de mamona e produção de lipase. *Dissertação de mestrado* –

Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

- FERNANDES, K. V. Análise dos níveis de ricina e de albuminas 2S em sementes de diferentes linhagens e cultivares de mamona. *Monografia* – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- 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. Simultaneous allergen inactivation and detoxification of castor bean cake by treatment with calcium compounds. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 45, p. 1002-1010, 2012.
- FERNANDES, K. V.; MACHADO, O. L. T. 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, 2012.
- FORNAZIERI, A. Mamona, Uma rica fonte de óleo e divisas. *Coleção Brasil Agrícola*. Editora Ícone, São Paulo-SP, 1986.
- FREDRIKSSON, S. A.; HULST, A. G.; ARTURSSON, E.; JONG, A. L.; NILSSON, C.; BAAR, B. L. M. Forensic identification of neat ricin and of ricin from crude castor bean extracts by mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. v. 77, p. 1545-1555, 2005.
- FROST, G. M.; MOSS, D. A. Production of enzymes by fermentation. In: REHM, H. J.; REED, G. *Biotechnology*. v. 7, VCH, Weinheim, p. 65–102, 1987.
- FUNATSU, G., KIMURA, M., FUNATSU, M. Primary structure of A-chain of ricin D. *Agricultural and Biological Chemistry*. v. 43, p. 2221-2224, 1979.
- GARBER, E. A. E.; EPPLEY, R. M.; STACK, M. E.; McLAUGHLIN, M. A.; PARK, D. L. Feasibility of immunodiagnostic devices for the detection of ricin, amanitin, and T-2 toxin in food. *Journal of Food Protection*. v. 68, p. 1294-1301, 2005.
- GARCIA, R. A.; PYLE, D. J.; PIAZZA, G. J.; WEN, Z. Hydrolysis of animal protein meals for improved utility in non-feed applications. *Applied Engineering in Agriculture*. v. 27, p. 269-275, 2011.

- GATEHOUSE, A. M. R.; BARBIERI, L.; STIRPE, F.; CROY, R. R. D. Effects of ribosome-inactivating proteins on insect development – Differences between Lepidoptera and Coleoptera. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. v. 54, p. 43-51, 1990.
- GATTO-MENKING, D. L.; YU, H.; BRUNO, J. G.; GOODE, M. T.; MILLER, M.; ZULICH, A. W. Sensitive detection of biotoxoids and bacterial spores using an immunomagnetic electrochemiluminescence sensor. *Biosensors & Bioelectronics*. v. 10, p. 501-507, 1995.
- GHANDI, V. M.; CHERIAN, K. M.; MULKY, M. J. Detoxification of castor seed meal by interaction with sal seed meal. *Journal of American Oil Chemistry Society*. v.71, p. 827-831, 1994.
- GIRBÈS, T.; FERRERAS, J. M.; ARIAS, F. J.; STIRPE, F. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. v.4, p. 461–476, 2004.
- 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. Use of Vero cell line to verify the biotransformation efficiency of castor bean waste. *Process Biochemistry*. v. 47, p. 578-584, 2012.
- GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; MACIEL, F. M.; FELIX, S. P.; BEVILAQUA, J. B.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, D. M. G. Use of a low-cost methodology for biotransformation of castor bean waste and lipase production. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 44, p. 317-322, 2009.
- GOMBERT, A. K.; PINTO, A. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*. v. 35, p. 85-90, 1999.
- GOMBERT, A. K.; PINTO, A. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*. v. 35, p. 85-90, 1999.
- GOWDA, N. K. S.; PAL, D. T.; BELLUR, S. R.; BHARADWAJ, U.; SRIDHAR, M.; SATYANARAYANA, M. L.; PRASAD, C. S.; RAMACHANDRA, K. S.; SAMPATH, K. T. Evaluation of castor (*Ricinus communis*) seed cake in

the total mixed ration for sheep. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 89, p. 216-220, 2009.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. v. 144, p. 1-22, 2008.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid state fermentation using a residue of the babassu oil industry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v. 82, p. 313-318, 2007.

HEISLER, I.; KELLER, J.; TAUBER, R.; SUTHERLAND, M.; FUCHS, H. A colorimetric assay to quantitation of free adenine applied to determine the enzymatic activity of ribosome inactivating proteins. *Analytical Biochemistry*. v. 302, p. 114-122, 2002.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*. v. 8, p. 301-306, 2005.

JAMES, W. Aptamers. In: MEYERS, R. A. (Ed). *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. p. 4848-4871, 2000.

KALB, S. R.; BARR, J. R. Mass spectrometric detection of ricin and its activity in food and clinical samples. *Analytical Chemistry*. v. 81, p. 2037-2142, 2009.

KASUYA, M. C. M.; DA LUZ, J. M. R.; PEREIRA, L. P. S.; DA SILVA, J. S.; MONTAVANI, H. C.; RODRIGUES, M. T. Bio-detoxification of *Jatropha* seed cake and its use in animal feed. In: *Biodiesel – Feedstocks, Production and Applications*. p. 309-330, 2012.

KEENER, W. K.; RIVERA, V. R.; YOUNG, C. C.; POLI, M. A. An activity-dependent for ricin and related RNA *N*-glycosidase based on electrochemiluminescence. *Analytical Biochemistry*. v. 357, p. 200-207, 2006.

KOJA, N.; SHIBATA, T.; MOCHIDA, K. Enzyme-linked immunoassay of ricin. *Toxicon*.v. 18, p. 611-618, 1980.

- KORARDI, R.; BILLETER, M.; WUTHRICH, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics*. v. 14, p. 51-55, 1996.
- KULL, S.; PAULY, D.; STORMAN, B.; KIRCHNER, S.; STAMMLER, M.; DORNER, M. B.; LASCH, P.; NAUMANN, D.; DORNER, B. G. Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. v. 82, p. 2916-2924, 2010.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v. 227, p. 680-685, 1970.
- LANGER, M.; ROTHE, M.; ECK J.; MÖCKEL, B.; ZINKE, H. A nonradioactive assay for ribosome-inactivating proteins. *Analytical Biochemistry*. v. 243, p. 150-153, 1996.
- LEIFA, F.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. *III International Seminar on Biotechnology in Coffee Agro-industry – Comunicação Oral*. Maio24-28, Londrina-PR, p. 51, 1999.
- LI, S. S. L.; LIN, T. T. S.; FORDE, M. D. Isolation and characterization of a low-molecular weight seed protein from *Ricinus communis*. *Biochemistry and Biophysical Acta*. v.492, p. 364-369, 1977.
- LI, X, P.; BERICEVIC, M.; SAIDASAN, H.; TUMER, N. E. Ribosome depurination is not sufficient for ricin-mediated cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Infection and Immunity*. v. 75, p. 417-428, 2007.
- LIN, J.-Y.; KAO, W.-Y.; TSERNG, K.-Y.; CHEN, C.-C.; TUNG, T.-C. Effect of crystalline abrin on the biosynthesis of protein, RNA and DNA in experimental tumors. *Cancer Research*. v. 30, p. 2431-2433, 1970.
- LODGE, J. K.; KANIEWSKI, W. K.; TUMER, N. E. Broad-spectrum virus-resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 90, p. 7089-7093, 1993.
- LORD, J. M.; ROBERTS, L. M. Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. *Journal of Cell Biology*. v. 140, p. 733-736, 1998.

- LORD, J. M.; ROBERTS, L. M.; ROBERTUS, J. D. Ricin: structure, mode of action and some current applications. *The FASEB Journal*. v. 8, p. 201-208, 1994.
- LORD, J. M.; SPOONER, R. A. Ricin trafficking in plant and mammalian cells. *Toxins*. v. 3, p. 787-801, 2011.
- LOWE R.; POUTNEY, D. L.; VOELCKER, N. H. Calcium (II) selectively induces α -synuclein annular oligomers via interaction with C-terminal domain. *Protein Science*. v. 13, p. 3245-3252, 2004.
- LUBELLI, C.; CHATGILIALOGLU, A.; BOLOGNESI, A.; STROCCHI, P.; COLOMBATTI, M.; STIRPE, F. Detection of ricin and other ribosome inactivating proteins by immuno-polymerase chain reaction assay. *Analytical Biochemistry*. v. 355, p. 102-109, 2006.
- LUGNIER, A. A. J.; LE MEUR, M. A.; GERLINGER, P.; DIRHEIMER, G. Inhibition of *in vitro* protein synthesis in a rabbit reticulocyte cell-free system by toxic tryptic peptides from ricin. *Biochimie*. v. 56, p.1287-1289, 1974.
- MACHADO, O. L. T.; MARCONDES, J. A.; DE SOUZA-SILVA, F.; HANSEN, E.; RIBEIRO, P. D.; VERÍSSIMO, M.; KANASHIRO, M.; KIPNIS, T. L.; DA SILVA JR., J. G.; DOS SANTOS, M. F.; COSTA E SILVA, M. C. Characterization of allergenic 2S albumin isoforms from *Ricinus communis* seeds. *Allergologie*. v. 26, p. 45-51, 2003.
- MACHADO, O. L. T.; SILVA JR, J. G. An allergenic 2S storage protein from *Ricinus communis* seeds which is part of the albumin precursor predicted by c-DNA data. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. v. 25, p. 567-582, 1992.
- MADEIRA JR, J. V.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotti*. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 7343-7348, 2011.
- MAJOUL, I.; FERRARI, D.; SOLING, H. D. Reduction of protein disulfide bond in an oxidizing environment. The disulfide bridge of cholera toxin A-subunit is reduced in the endoplasmic reticulum. *FEBS Letter*. v. 40, p. 104-108, 1997.

- MAZZANI, B. Almacenamiento y conservación de semillas oleaginosas. In: MAZZANI, B (Ed.). *Cultivo y mejoramiento de plantas oleaginosas*. Caracas, Venezuela, Fondo Nacional de investigaciones Agropecuárias, p. 73-93, 1983.
- MEI, Q.; FREDRICKSON, C. K.; LIAN, W.; JIN, S.; FAN, Z. H. Ricin detection by biological signal amplification in a well-in-a-well device. *Analytical Chemistry*. v. 78, p. 7659-7664, 2006.
- MILANI, M; NÓBREGA, M. B. M. Castor breeding. In: ANDERSEN, S. B (Ed) *Plants Breeding from Laboratories to Field*. *Intech Open*. DOI: 10.5772/56216. p. 239-254, 2013.
- MITCHELL, A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Reviews*. v. 8, p. 183-225, 2002.
- MITCHELL, D. A.; LOSANE, B. K. Definition, characteristic and potential. In: DOELLE, H.; MITCHELL, D. A., ROLS C. E. *Solid substrate cultivation*. Elsevier Applied Science, p. 1-16, 1992.
- MORAIS E SILVA, R. D. Produção de biodiesel em pequena escala com aproveitamento de co-produtos. *III Congresso Brasileiro de Mamona – Minicurso*. Agosto 04-07, Salvador-BA, CD-ROM, 2008.
- MOSHKIN, V. A. *Castor*. Livro, New Delhi: Amerind, 315 p, 1986.
- MOTANARO, L.; SPERTI, S.; STIRPE, F. Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro. Ribosomes as the target of the toxin. *Biochemistry Journal*. v. 136, p. 677-683, 1973.
- MUKHOPADHYAY, S.; REDLER, B.; LINSTEDT, A. D. Shiga toxin-binding site for host cell receptor GPP130 reveals unexpected divergence in toxin-trafficking mechanism. *Molecular Biology of Cell*. v. 24, p. 2311-2318. 2013.
- NATH, S.; GOODWIN, J.; ENGELBORGH, Y.; POUNTNEY, D. L. Raised calcium promotes α -synuclein aggregate formation. *Molecular and Cellular Neuroscience*. v. 46, p. 516-526, 2010.

- NISHITANI, W. S.; SEIF, T. A.; WANG, Y. Calcium signaling in live cells on elastic gels under mechanical vibration at subcellular levels. *Plos One*. v. 6(10), e26181, 2011.
- NYIREDY, I.; ETTER, L.; FESÜS, I.; MAYER, G. The fate of mould "spores" in the digestive tract of chicks. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*. v.25, p. 123-128, 1975.
- OLIVEIRA, L. B. Biodiesel, combustível limpo para o transporte sustentável. In: RIBEIRO, S. K. *Transporte sustentável, alternativas para ônibus urbanos*. Rio de Janeiro-RJ. COPPE: UFRJ, p. 79-112, 2001.
- OLSNES, S. The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*. v. 44, p. 361-370, 2004.
- OLSNES, S.; FERNANDEZ-PUENTES, C.; CARRASCO, L.; VAZQUEZ, D. Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymic activity of the toxin A-chain. *European Journal of Biochemistry*. v. 60, p. 281-288, 1975.
- OLSNES, S.; WESCHE, J.; FALSNES, P.O. Binding, uptake, routing and translocation of toxins with intracellular sites of action. In: ALOUF J.E.; FREER, J.H. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Toxins*. Academic Press: London, p. 73-93, 1999.
- OUANOUNOU, A.; ZHANG, L.; CHARLTON, M. P.; CARLEN, P. L. Differential modulation of synaptic transmission by calcium chelator in young and aged hippocampal CA1 neurons: evidence for altering calcium homeostasis in aging. *The Journal of Neuroscience*. v. 19, p. 906-915, 1999.
- PALMA, M. B.; PINTO, A. L.; GOMBERT, A. K.; SEITZ, K. H.; KIVATINITZ, S. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. 2000. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 84, p. 1137-1145, 2000.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemistry Engineering Journal*. v. 13, p. 81-84, 2003.

- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- PEL, H. J.; WINDE, J. H.; ARCHER, D. B.; DYER, P. S.; HOFMANN, G.; SCHAAP, P. J.; TURNER, G.; DE VRIES, R. P.; ALBANG, R.; ALBERMANN, K.; ANDERSEN, M. R.; BENDTSEN, J. D.; BENEN, J. A.; VAN DEN BERG, M.; BREESTRAAT, S.; CADDICK, M. X.; CONTRERAS, R.; CORNELL, M.; COUTINHO, P. M.; DANCHIN, E. G.; DEBETS, A. J.; DEKKER, P.; VAN DIJCK, P. W.; VAN DIJK, A.; DIJKHUIZEN, L.; DRIESSEN, A. J.; D'ENFERT, C.; GEYSENS, S.; GOOSEN, C.; GROOT, G. S.; DE GROOT, P. W.; GUILLEMETTE, T.; HENRISSAT, B.; HERWEIJER, M.; VAN DEN HOMBERGH, J. P.; VAN DEN HONDEL, C. A.; VAN DER HEIJDEN, R. T.; VAN DER KAAIJ, R. M.; KLIS, F. M.; KOOLS, H. J.; KUBICEK C. P.; VAN KUYK, P. A.; LAUBER, J.; LU, X.; VAN DER MAAREL, M. J.; MEULENBERG, R.; MENKE, H.; MORTIMER, M. A.; NIELSEN, J.; OLIVER, S. G.; OLSTHOORN, M.; PAL, K.; VAN PEIJ, N. N.; RAM, A. F.; RINAS, U.; ROUBOS, J. A.; SAGT, C. M.; SCHMOLL, M.; SUN, J.; USSERY, D.; VARGA, J.; VERVECKEN, W.; VAN DE VONDERVOORT, P. J.; WEDLER, H.; WÖSTEN, H. A.; ZENG, A. P.; VAN Ooyen, A. J.; VISSER, J.; STAM, H. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*. v. 25, p. 221-231, 2007.
- PERRY JR, J. M.; HAZEL, F. Lime hydrolysis of soybean protein. *Industrial and Engeneering Chemistry*. v. 5, p. 549-554, 1946.
- PILON, M.; SCHECKMAN, R.; ROMISCH, K. Sec61 mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *The EMBO Journal*. v.16, p. 4540-4548, 1997.
- PINKERTON, S. D.; ROLFE, R.; AULD, D. L. Selection of castor with divergent concentration of ricin and *Ricinus communis* agglutinin. *Crop Science*. v. 39, p. 353-357, 1999.
- POLI, M. A.; RIVERA, V. R.; HEWETSON, J. F.; MERRILL, G. A. Detection of ricin by colorimetric and chemiluminescence ELISA. *Toxicon*. v. 32, p. 1371-1377, 1994.
- PURUSHOTHAM, N. P.; RAO, M. S.; RAGHAVAN, G. V. Utilization of castor-meal in the concentrate mixture of sheep. *Indian Journal of Animal Science*. v. 56, p. 1090-1093, 1986.

- QING, Y.; LI, X. P.; TUMER, N. E. *N*-glycosylation does not affect the catalytic activity of ricin A chain but stimulates cytotoxicity by promoting its transport out of the endoplasmic reticulum. *Traffic*. v. 13, p. 1508-1521, 2012.
- REINBOTHE, S.; REINBOTHE, C.; LEHMANN, J.; BECKER, W.; APEL, K.; Parthier, B. JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*. v.91, p. 7012-7016, 1994.
- REISS, J. Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. *Springer*. Berlin Heidelberg, New York, p. 33-41, 1986.
- RICHARDSON, P. T.; WESTBY, M.; ROBERTS, L.; GOULD, J. H.; COLMAN, A.; LORD, J. M. Recombinant pro-ricin binds galactose but does not depurinate 28 S ribosomal RNA. *FEBS Letter*. v. 255, p. 15-20, 1989.
- RODRIGUES, R. F. O.; DE OLIVEIRA, F.; FONSECA, A. M. As folhas de Palma Christi – *Ricinus communis* L. *Euphorbiaceae* Jussieu: Revisão de conhecimentos. *Revista Lecta*. v. 20, p. 183-194, Bragança Paulista, 2002.
- ROSÉS, R. P.; GUERRA, N. P. Optimization of amylase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation using sugarcane bagasse as solid support material. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 25, p. 1929-1939, 2009.
- SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, A. How dangerous could be the receiving of a ricin-contaminated letter?. *Iranian Journal of Biotechnology*. v. 11, p. 141-143, 2013.
- SAHRAEI, M.; JANMMAHAMDI, H.; LASHKARI, S.; TORKAMANI, M. D.; GITUEE, A. Evaluation of protein quality in hydrolyzed protein meals by biological assay methods in broiler chickens. *World Applied Sciences Journal*. v. 20, p. 1193-1196, 2012.
- SANDVIG, K.; VAN DEURS, B. Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *The EMBO Journal*. v. 19, p. 5943-5950, 2000.

- SANO, T.; SMITH, C. L.; CANTOR, C. R. Immune-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*. v. 258, p. 120-122, 1992.
- SANTOS, R. F.; KOURI, J.; BARROS, M. A. L.; MARQUES, F. M.; FIRMINO, P. T.; REQUIÃO, L. E. G. Aspectos econômicos do agronegócio da mamona. In: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M. *O agronegócio da mamona no Brasil*. 2ª Edição, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília-DF, p. 21-42, 2007.
- SAVY FILHO, A. *Mamona: Tecnologia Agrícola*. Campinas. SP: EMOPI, 2005.
- SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 59, p. 426-425, 2002.
- SHARIEF, F. S.; LI, S. S. L. Amino acid sequence of small and large subunits of seed storage protein from *Ricinus communis*. *Journal of Biological Chemistry*. v. 257, p. 14753-14759, 1982.
- SHYU, H. F.; CHIAO, D. J.; LIU, H. W.; TANG, S. S. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detection of ricin. *Hybrid Hybridomics*. v. 21, p. 69-73, 2002.
- SILVA, L. V. B. D.; DE LIMA, V. L. A.; SILVA, V. N. B.; SOFIATTI, V.; PEREIRA, T. L. P. Torta de mamona residual e irrigação com efluente sobre crescimento e produção de algodoeiro herbáceo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. v. 17, p. 1264-1270, 2013.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. v. 44, p. 13-18, 2009.
- SMALLSHAW, J. E.; FIRAN, A.; FULMER, J. R.; ROBACK, S. L.; GHETIE, V.; VITETTA, E. S. A novel recombinant vaccine which protects mice against ricin intoxication. *Vaccine*. v. 20, p. 3422-3427, 2002.
- SPHYRIS, N.; LORD, J. M.; WALES, R.; ROBERTS, L. M. Mutational analysis of the Ricinus lectin B-chains. Galactose-binding ability of the 2 gamma subdomain of *Ricinus communis* agglutinin B-chain. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 270, p. 20292-20297, 1995.

- SPIES, J. R., COULSON, E. J. The chemistry of allergens VIII. Isolation and properties of an active protein-polysaccharidic fraction, CB-1A, from castor bean. *Journal of American chemical society*. v. 65, p. 1720-1725, 1943.
- SRIVASTAVA, S.; THAKUR, I. S. Biosorption potency of *Aspergillus niger* for removal of chromium. *Current Microbiology*. v. 53, p. 232-237, 2006.
- STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins. *Toxicon*. v. 67, p. 12-16, 2013.
- STIRPE, F.; BATELLI, M. G. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cellular and Molecular Life Sciences*. v. 63, p. 1850-1866, 2006.
- USMAN, L. A.; IBIYEMI, S. A.; OLUWANIYI, O. O.; AMEEN, O. M. Effect of acid and alkaline hydrolysis on the concentrations of albumin and globulin in *Thevetia peruviana* seed cake protein extract. *Biokemistri*. v. 15, p. 16-21, 2003.
- VAN DEURS, B., PETERSEN, O. W., OLSNES, S., SANDVIG, K. The ways of endocytosis. *International Reviews of Cytology*. v. 117, p. 131-177, 1989.
- VIEIRA, M. R. Caracterização de peptídeos alergênicos de albuminas 2S de sementes de *Ricinus communis*. *Monografia – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2002.*
- VILHJÁLMSDÓTTIR, L.; FISCHER, H. Castor bean meal as a protein source for chickens: detoxification and determination of limiting amino acids. *Journal of Nutrition*. v. 101, p. 1185–1192, 1972.
- VILLENA, G. K.; GUTIÉRRES-CORREA, M. Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. *Letters in Applied Microbiology*. v. 43, p. 262-268, 2006.
- WADKINS, R. M.; GOLDEN, J. P.; PRITSIOLAS, L. M.; LIGLER, F. S. Detection of multiple toxic agents using a planar array immunosensor. *Biosensors & Bioelectronics*. v. 13, p. 407-415, 1998.

- WALSH, T. A.; MORGAN, A. E.; HEY, T. D. 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*. v.266, p. 23422-23427, 1991;
- YAHOO NEWS. Disponível em: <http://news.yahoo.com/blogs/ticket/letter-addressed-obama-contained-suspicious-substance-153931701--politics.html>. Último acesso em 14/12/2013. 2013.
- YOULE, R. J.; HUANG, A. H. C. Evidence that castor bean allergens are albumin storage proteins in protein bodies of castor bean. *Plant Physiology*. v .61 p. 1040-1042, 1978.
- YOULE, R. J.; MURRAY, G. J.; NEVILLE JR, D. M. Studies on galactose-binding site of ricin and the hybrid toxin Man6P-ricin. *Cell*. v. 23, p. 551-559, 1981.
- YU, H.; RAYMONDA, J. W.; McMAHON, T. M.; CAMPAGNARI, A. A. Detection of biological threat agents by immunomagnetic microsphere-based solid phase fluorogenic- and electrochemiluminescence. *Biosensors & Bioelectronics*. v. 14, p. 829-840, 2000.
- ZAMBONI, M.; BRIGOTTI, M.; RAMBELLI, F.; MONTANARO, L.; SPERTI, S. High-pressure-liquid chromatography and fluorimetric methods for the determination of adenine released from ribosomes by ricin and gelonin. *Biochemistry Journal*. v. 259, p. 639-643, 1989.
- ZHANG, W. J.; Xu, Z. R.; ZHAO, S. H.; SUN, J. Y.; YANG, X. Development of a microbial fermentation process for detoxification of gossypol in cottonseed meal. *Animal Feed Science and Technology*. v. 135, p. 176-186, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1

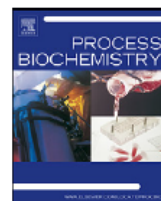
Process Biochemistry 47 (2012) 578–584



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio



Use of Vero cell line to verify the biodegradation efficiency of castor bean waste

Mateus G. Godoy^{a,*}, Keysson V. Fernandes^b, Melissa L.E. Gutarra^a, Edésio J.T. Melo^b, Aline M. Castro^c, Olga L.T. Machado^b, Denise M.G. Freire^{a,*}

^a Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

^c CENPES – Centro de Pesquisa da Petrobrás, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ANEXO 2

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2012) 45: 1002-1010
ISSN 1414-431X

Simultaneous allergen inactivation and detoxification of castor bean cake by treatment with calcium compounds

K.V. Fernandes¹, N. Deus-de-Oliveira¹, M.G. Godoy³, Z.A.S. Guimarães²,
V.V. Nascimento¹, E.J.T. de Melo², D.M.G. Freire³, M. Dansa-Petretski¹
and O.L.T. Machado¹

¹Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia,
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia,
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Laboratório de Biotecnologia Microbiana, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, RJ, Brasil

ANEXO 3

Approaches for the Detection of Toxic Compounds in Castor and Physic Nut Seeds and Cakes

Keysson Vieira Fernandes and
Olga Lima Tavares Machado

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/52332>

