

ALÉRGENOS DE OLEAGINOSAS: TRATAMENTO QUÍMICO PARA
REDUÇÃO DA ALERGENICIDADE, DETECÇÃO NO AR E RESPOSTA
IMUNE.

NATALIA DEUS DE OLIVEIRA CRESPO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
MAIO - 2013

ALÉRGENOS DE OLEAGINOSAS: TRATAMENTO QUÍMICO PARA
REDUÇÃO DA ALERGENICIDADE, DETECÇÃO NO AR E RESPOSTA
IMUNE.

NATALIA DEUS DE OLIVEIRA CRESPO

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY

RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

MAIO - 2013

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

Financiamentos:

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

ALÉRGENOS DE OLEAGINOSAS: TRATAMENTO QUÍMICO PARA
REDUÇÃO DA ALERGENICIDADE, DETECÇÃO NO AR E RESPOSTA
IMUNE.

NATALIA DEUS DE OLIVEIRA CRESPO

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

Aprovada em 29 de maio de 2013.

Comissão examinadora:

Dr.^a Elena Lassounskaia (LBR/CBB/UENF)

Dr. Edésio José Tenório (LBCT/CBB/UENF)

Dr. Gilberto Barbosa Domont (IQ/CCMN/UFRJ)

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

Dedico este trabalho

a todos que acreditaram que
era possível iniciar mais esta
etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual. Ele nasce de significativas contribuições que recolhi durante minha trajetória profissional, acadêmica e como cidadã, ao lidar com pessoas e instituições que foram fundamentais a essa construção.

A Deus, por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida.

Meu agradecimento e minha homenagem a Dr^a Olga L. T. Machado. Mais que minha professora e orientadora na Graduação, no Mestrado e no Doutorado, agradeço por sua cumplicidade e responsabilidade direta na construção desta tese. Como resultado desta progressiva formação, acabamos construindo uma amizade.

Ao revisor deste trabalho, professor Dr. Thiago Motta Venâncio, pela atenção, dedicação e profissionalismo dispensados na revisão deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Dr.^a Elena Lassounskaia, Dr. Edésio José Tenório e ao Dr. Gilberto Barbosa Domont pela atenção e profissionalismo já dispensados.

A todos que contribuíram experimentalmente em etapas fundamentais para a conclusão desta tese de doutorado: Dr. Felipp da Silveira Ferreira, Prof. Dr. André de Oliveira Carvalho, aos responsáveis pelo biotério da UENF, ao supervisor Antônio Müller Neto e ao Prof. Márcio Adonis Miranda da Rocha do INCAPER/ES, as alunas Giliane da Silva de Souza, Lívia Mattos Martins e Lívia Maia Crespo da UENF.

De forma coletiva, preciso registrar a contribuição das equipes de trabalho das quais participei, aos amigos dos laboratórios LQFPP, LBCT, LBR e a outros amigos da UENF.

Preciso homenagear, ainda, os amigos queridos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua força e estímulo para que eu conseguisse completar este percurso. As amigas Sílvia Soares, Thaís Coutinho, Tatiane Costa e, a minha amiga de sempre Adriana Pacheco, pelo companheirismo, pelas conversas e pela alegria nos reencontros... e, a tantos outros que fazem parte de minha vida.

A minha família, em especial minha mãe (*in memoriam*) e meu pai Adão, que se faz presente no meu dia-a-dia através dos ensinamentos plantados em minha vida. Aos meus irmãos, André e Mônica, aos meus sobrinhos e cunhados.

A família Crespo e a família Pepe por compartilhar comigo um pouco de suas feições familiares e o aconchego de um lar.

Finalmente, agradeço a presença, a ajuda, compreensão, sabedoria, paciência e o estímulo de meu marido e companheiro Hélio Arêas Crespo Neto. Caminhar em sua companhia é um prazer e um presente.

Enfim, a todos que contribuíram para o bom término deste trabalho.

"Se houver um general forte,
não haverá soldados fracos."

Provérbio chinês

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xviii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xx
1- Introdução.....	1
1.1- Alérgenos vegetais.....	4
1.2- Oleaginosas de interesse econômico – Mamona e Pinhão-manso.....	6
1.2.1- Compostos tóxicos.....	12
- Ricinina.....	12
- Ricina.....	12
- Curcina.....	16
- Ésteres de forbol.....	17
1.2.2- Compostos Alergênicos.....	20
- Albumina 2S de mamona.....	20
- Estrutura das albuminas 2S.....	23
- Albumina 2S de pinhão-manso.....	26
1.3- Alergia desencadeada por albumina 2S.....	27
1.4- Processos de destoxificação e desalergenização.....	28
2- Objetivo Geral.....	32
2.1- Objetivos Específicos.....	32
3- Materiais e métodos.....	33
3.1 - Obtenção do “pool” de albuminas 2S de sementes.....	33
3.2 - Produção de soros anti-albumina 2S.....	33
3.3 - Tratamento químico utilizando compostos de cálcio.....	34
3.4- Avaliação das alterações promovidas pelo tratamento.....	35
- Cromatografia de fase reversa.....	35
- Espectrometria de massas.....	36
3.5 - Caracterização biológica – Avaliação da alergenicidade.....	36

3.5.1 – Obtenção dos mastócitos de rato.....	36
3.5.2 – Ensaios de desgranulação de mastócitos.....	37
3.5.2.1 - Microscopia óptica.....	37
3.6- Caracterização biológica – Avaliação da toxicidade.....	38
3.7- Coleta de material aerobiológico.....	39
3.7.1- Área Experimental.....	40
3.7.2- Determinação de proteínas alergênicas retidas nos filtros.....	40
3.7.2.1- Padronização da extração.....	41
3.7.2.2- Quantificação de albumina 2S.....	42
3.8- Determinação de proteínas alergênicas na inflorescência.....	42
3.9- Protocolos de imunizações.....	44
3.9.1- Resposta imunológica no modelo animal.....	46
3.9.2- Ensaios de bloqueio com aminoácidos livres.....	47
4- Resultados.....	49
4.1- Purificação de albuminas 2S de sementes.....	49
4.2- Sensibilidade dos soros policlonais anti-albumina 2S.....	50
4.3- Avaliação das modificações estruturais promovidas pelo tratamento com cálcio.....	53
4.3.1- Análise por cromatografia de fase reversa.....	53
4.3.2- Análise por espectrometria de massas.....	55
4.4- Avaliação da alergenicidade do material tratado.....	57
4.4.1- Observação da morfologia das células por microscopia óptica..	57
4.4.2- Ensaios de desgranulação de mastócitos.....	58
4.5- Avaliação da toxicidade do material tratado.....	61
4.6- Determinação de proteínas alergênicas retidas nos filtros.....	63
4.6.1- Padronização do solvente para extração.....	63
4.6.2- Quantificação de albumina 2S nos extratos de filtros.....	64
4.7- Avaliação da resposta imunológica no modelo animal.....	66
4.7.1- Imunização com 10 µg de albumina 2S de mamona.....	66
4.7.1.1- Resposta humoral (IgG/IgM) específica.....	66
4.7.1.2- Padrão de resposta Th1 ou Th2.....	67
4.7.1.3- Imunoabsorção do soro com proteína A.....	68
4.7.2- Imunização com 0,01 µg, 0,1 µg ou 1,0 µg de albumina 2S de mamona.....	69

4.7.3- Ensaio de bloqueio com aminoácidos livres.....	76
5- Discussão.....	77
6- Conclusão.....	88
Referências Bibliográficas.....	89
Apêndice.....	108
Anexo 1.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos envolvidos nas reações alérgicas.....	3
Figura 2: Mamona (<i>Ricinus communis</i> L.) e suas estruturas, folhas e frutos.....	6
Figura 3: Pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	9
Figura 4: Partes do pinhão-manso: a – ramo floral, b – caule, c – nervuras foliares, d – flor feminina, e – flor masculina, f – corte perpendicular de frutos imaturos, g – frutos, h – corte longitudinal do fruto, i – semente. (Adaptado de Heller, 1996).....	10
Figura 5: Estrutura quaternária da molécula de ricina. A cadeia B (RTB) está localizada no lado esquerdo e a cadeia A (RTA) está à direita. O círculo vermelho indica a ponte dissulfureto ligando as cadeias A e B (RUTENBER E ROBERTUS, 1991).....	14
Figura 6: Representação esquemática da curcina mostrando os arranjos de alfa-hélices, folhas-beta e regiões de loops na estrutura tridimensional predita por Srivastava e colaboradores em 2012.....	17
Figura 7: Estrutura do tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA).....	18
Figura 8: Esquema do processamento do precursor das isoformas Ric c 3 e Ric c 1.....	21
Figura 9: Histórico das albuminas 2S de <i>Ricinus communis</i> L.....	22
Figura 10: Estrutura Primária do precursor das Albuminas 2S. Verde = cadeia leve e cadeia pesada de Ric c 3; Marrom= cadeia leve e cadeia pesada de Ric c 1; Cinza = peptídeos que são eliminados durante o processamento (SILVA JR., 1996).....	22

Figura 11: Evolução do estudo dos epitopos de IgE presentes nas albuminas 2S de mamona.....	24
Figura 12: Sequência parcial da albumina 2S isolada de sementes de pinhão-manso denominada Jat c 1.....	26
Figura 13: Fluxograma do tratamento proposto para desativar epitopos alergênicos de albumina 2S de mamona utilizando diferentes compostos de cálcio.....	35
Figura 14: Aparelho de coleta de ar - Eight Stage Non-Viable Impactor.....	39
Figura 15: Características encontradas no primeiro dia da coleta de material particulado na plantação de pinhão-manso.....	40
Figura 16: Modelo experimental de padronização da extração de proteína dos filtros de coleta.....	41
Figura 17: Cronograma do protocolo experimental número 1 de imunização. As setas representam as imunizações e, os asteriscos as coletas de sangue.....	44
Figura 18: Cronograma do protocolo experimental número 2 de imunização. As setas representam as imunizações e, os asteriscos as coletas de sangue.....	45
Figura 19: Cronograma do protocolo experimental número 3 de imunização. As setas representam as imunizações e, os asteriscos as coletas de sangue.....	45
Figura 20: Perfil cromatográfico da cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephadex G-50) do extrato bruto de sementes de mamona (A) e de sementes de pinhão-manso (B)	49

Figura 21: Perfil cromatográfico e espectro de absorção da albumina 2S (Ric c 3 e Ric c 1) de mamona (A) e da albumina 2S de pinhão-manso (B) após cromatografia de fase reversa em coluna C-18, sistema HPLC (Pharmacia Biotech C18 5u 4,6 X 250 mm).....	50
Figura 22: Titulação do soro policlonal anti-albumina 2S de mamona produzido em coelho.....	51
Figura 23: Sensibilidade do anticorpo policlonal anti-albumina 2S de mamona produzido em coelho frente a concentrações decrescentes de albumina 2S.....	52
Figura 24: Sensibilidade do anticorpo policlonal anti-albumina 2S de pinhão-manso produzido em coelho frente a concentrações decrescentes de albumina 2S.....	53
Figura 25: Sobreposição dos perfis cromatográficos e espectros de absorção da albumina 2S após tratamento com hidróxido de cálcio, após cromatografia de fase reversa em coluna C-18.....	54
Figura 26: Sobreposição dos perfis cromatográficos e espectros de absorção da torta de mamona tratada com hidróxido de cálcio, após cromatografia de fase reversa em coluna C-18.....	55
Figura 27: Espectro de massas de albumina 2S mamona nativa.....	56
Figura 28: Espectro de massas de albumina 2S mamona tratada com óxido de cálcio.....	56
Figura 29: Ampliação do espectro de massas de albumina 2S mamona tratada com óxido de cálcio.....	57
Figura 30: Morfologia de mastócitos do lavado peritoneal de rato corados por azul de toluidina.....	58

Figura 31: Desgranulação de mastócitos do lavado peritoneal de rato incubados com compostos de cálcio (experimento controle).....	59
Figura 32: Desgranulação de mastócitos do lavado peritoneal de rato frente as amostras de albumina 2S tratadas, na presença do soro anti-albumina 2S.....	60
Figura 33: Desgranulação de mastócitos do lavado peritoneal de rato frente as amostras de torta de mamona tratadas, na presença do soro anti-albumina 2S.....	61
Figura 34: Viabilidade de células Vero após 24 e 48 horas de incubação com amostras de torta de mamona tratada quimicamente com compostos de cálcio.....	62
Figura 35: Atividade da enzima lactato desidrogenase liberada de células Vero incubadas por 24 a 48 horas com torta de mamona tratada com CaCO ₃ , CaO, ou Ca (OH) ₂ , 4 ou 8%, na proporção de 1:1 (v/v). Os dados representam experimentos realizados em triplicata.....	63
Figura 36: Ensaio imuno-enzimático (ELISA) entre o anticorpo policlonal anti-Albumina 2S (1:500) de sementes de mamona produzido em coelho e as proteínas presentes nos filtros submetidos a diferentes técnicas de extração.....	64
Figura 37: Quantificação de albumina 2S de pinhão-manso em amostras de papel de filtro coletado no município de Viana-ES utilizando ensaio imuno-enzimático (ELISA).....	65
Figura 38: Produção de IgG/IgM específica nos camundongos submetidos a imunização com 10 µg de albumina 2S de mamona. C1, C2, C3= camundongos....	67
Figura 39: Perfil de imunoglobulinas após a 3 ^a imunização nos camundongos sensibilizados contra albumina 2S de mamona. Br: Branco. Os títulos indicados abaixo de cada anticorpo referem-se ao anticorpo primário (soro do camundongo).....	68

Figura 40: Ensaio imuno-enzimático do soro submetido a cromatografia de afinidade com proteína A-agarose 6MB.....	69
Figura 41: Produção de IgG1 específica em camundongos Balb/c após intervalos de imunizações (i.p.) com PBS (A), 0,01 µg (B), 0,1 µg (C) ou 1,0 µg (D) de albumina 2S de mamona. Legenda: T= Tratamento; G= Grupo; C= Camundongo.....	70
Figura 42: Produção de IgE total em camundongos Balb/c após intervalos de imunizações (i.p.) com PBS (A), 0,01 µg (B), 0,1 µg (C) ou 1,0 µg (D) de albumina 2S de mamona. Legenda: T= Tratamento; G= Grupo; C= Camundongo.....	71
Figura 43: Produção de IgE específica em camundongos Balb/c após intervalos de imunizações (i.p.) com PBS (A), 0,01 µg (B), 0,1 µg (C) ou 1,0 µg (D) de albumina 2S de mamona. Legenda: T= Tratamento; G= Grupo; C= Camundongo.....	72
Figura 44: Características morfológicas documentadas nos camundongos submetidos ao terceiro protocolo de imunizações.....	73
Figura 45: Ensaio imuno-enzimático para avaliar o bloqueio de IgG1 pelos aminoácidos livres.....	76
Figura 46: Esquema da interação eletrostática entre o cálcio e as carboxilas dos ácidos glutâmicos (epitopo) presentes na estrutura da albumina 2S de mamona.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Características estruturais dos peptídeos sintéticos derivados de isoformas de albuminas 2S de mamona.....	24
Tabela II: Diferentes inoculações empregadas nos grupos de animais submetidos ao terceiro protocolo de imunização.....	45
Tabela III: Relação de ácidos glutâmicos modificados utilizados nos ensaios de bloqueio.....	48
Tabela IV: Esquema representativo dos óbitos dos animais/grupos T0, T1, T2 e T3 observado após o terceiro protocolo experimental.....	74
Tabela V: Relação de tamanho e peso dos animais/grupos T0, T1, T2 e T3 observado após o terceiro protocolo experimental.....	75

RESUMO

Nos últimos anos têm-se observado um aumento na incidência de doenças alérgicas, o que alerta para a necessidade de desenvolvimento de métodos eficazes de detecção de alérgenos. A mamona e o pinhão-manso possuem sementes oleaginosas que contém componentes tóxicos ou alergênicos. O presente estudo tem por objetivo geral desenvolver métodos para a redução da alergenicidade de albuminas 2S de oleaginosas. Nesse sentido, realizamos modificações nos resíduos dos aminoácidos que compõem os epitopos de ligação a IgE da albumina 2S de mamona por tratamento químico com compostos de cálcio. Além disso, os níveis de albuminas 2S dispersos no ar foram quantificados em regiões de plantio de oleaginosas e, também, protocolos de imunizações foram iniciados para validar ensaios *in vivo* com aminoácidos livres anteriormente propostos como terapia para tratamento da alergia. Compostos de cálcio foram adicionados às amostras do alérgeno ou da torta de mamona e, as alterações foram verificadas por cromatografia de fase reversa e por espectrometria de massas. Ensaios de desgranulação de mastócitos e citotoxicidade foram empregados, respectivamente, para avaliar as atividades alergênica e tóxica do material tratado. Amostras aéreas, coletadas em filtros de papel, foram submetidas à quantificação da presença de albuminas 2S. Animais foram sensibilizados com alérgeno de mamona e os níveis de IgE e IgG foram monitorados. Verificou-se neste trabalho que todos os tratamentos com compostos de cálcio modificaram a estrutura do alérgeno de mamona. Em contrapartida, observamos que óxido ou hidróxido de cálcio, ambos a 8%, foram mais eficientes para reduzir a toxicidade da ricina presente na torta de mamona. A presença de alérgenos da classe das albuminas 2S foi confirmada nos extratos de filtros recolhidos na presença de inflorescência indicando o risco de sensibilização por alérgenos de oleaginosas. Por fim, padrão de resposta imune do tipo Th2 (IgG1) e alta porcentagem de óbito (60%) foram observados nos animais sensibilizados com albumina 2S de mamona. Observamos também que a IgG1 presente no soro não sofre bloqueio pelos aminoácidos livres, sugerindo que a eficácia da nossa proposta de terapia só funciona para bloquear epitopos de IgE. Concluimos que as modificações químicas contribuem para a obtenção de um produto mais seguro para manipulação dos trabalhadores e com possibilidade de expansão da aplicabilidade econômica, por exemplo, na alimentação animal. A confirmação da presença de alérgenos no ar alerta e contribui para pesquisas aerobiológicas em nosso país.

Palavras-chave: epitopos, compostos de cálcio, aeroalérgenos, agentes bloqueadores da IgE.

ABSTRACT

Currently there is observed an increase in the incidence of allergic diseases, which alerts to the development of effective methods to detect allergens. The castor bean and physic nut have oilseeds containing toxic or allergenic components. The present study overall aims to develop methods for reducing the allergenicity of oilseed's 2S albumins. Accordingly, we conducted changes in amino acid residues that comprise the IgE binding epitopes of castor seeds 2S albumin by chemical treatment with calcium compounds. In addition, the levels of 2S albumin dispersed in the air were quantified in oilseed growing regions and also immunization protocols were started to validate *in vivo* tests with free amino acids previously proposed as a therapy for allergy treatment. Calcium compounds were added to samples of the allergen or castor cake and the changes were verified by reverse phase chromatography and mass spectrometry. Mast cell degranulation testing and cytotoxicity assays were used, respectively, to evaluate the allergenic activity and toxic in treated materials. Air samples collected in paper filters were submitted to quantifying the presence of 2S albumins. Animals were sensitized with castor bean allergen and IgE and IgG levels were monitored. It was found in this work that all chemical treatments with calcium compounds altered the castor allergen structure. In contrast, was observed that calcium oxide or calcium hydroxide, both 8%, were more efficient to reduce the toxicity of ricin present in castor bean. The presence of allergens class of 2S albumin was confirmed in extracts of filters collected in the presence of inflorescences, indicating risk of sensitization to oilseed's allergens. Finally, the Th2-type immune response pattern (IgG1) and a high rate of death (60%) were observed in animals sensitized with castor 2S albumin. We also observed that the IgG1 present in the serum does not suffer blocking by free amino acids, suggesting that the effectiveness of our therapy proposal only works to block IgE epitopes. We conclude that the chemical modifications contribute to obtaining of a safer product for manipulation of the worker and with the possibility of expanding the economical applicability, for example, in animal feed. Confirmation of the presence of allergens in the air alert and contributes to aerobiological research in our country.

Keywords: epitopes, calcium compounds, aeroallergens, IgE-blocking agents.

1. Introdução:

Um aumento progressivo de doenças alérgicas tem afetado o mundo desde a metade do século passado. Evidências clínicas revelam um aumento geral da incidência e prevalência de doenças respiratórias, como a rinite alérgica e asma, sendo uma das principais causas de aumento dos custos com saúde, e da perda de produtividade (LAMB *et al.*, 2006; SCHOENWETTER *et al.*, 2004). Na Europa e nos Estados Unidos a prevalência de rinite alérgica sazonal, ou seja, aquela que ocorre repetidamente em determinadas épocas do ano, é de aproximadamente 15% (ZIELLO *et al.*, 2012; FERNANDEZ-LLAMAZARES *et al.*, 2012; NATHAN *et al.*, 1997).

Além da pesquisa de material biológico disperso no ar, existe a necessidade de estudar os impactos relacionados as mudanças climáticas, desencadeadas pelo aumento de gás carbônico e de gases do efeito estufa, e a fisiologia e distribuição de organismos vivos, como plantas e fungos (WHO, 2003). O pólen é fonte importante de potentes aeroalérgenos e, o ciclo de vida do vegetal é, geralmente, sensível à temperatura e umidade. As alterações climáticas como, por exemplo, a concentração de gás carbônico, de ozônio e o aumento da temperatura global, podem afetar a produção e o tempo de exposição aos pólenes. Desta forma, o aumento nos níveis de alérgenos dispersos no ar, em especial os presentes nos pólenes, pode contribuir para o crescimento de doenças alérgicas (ZIELLO *et al.*, 2012; EFSTATHIOU *et al.*, 2011).

O aumento dos casos de alergias respiratórias pode estar relacionado não só à poluição do ar e as mudanças no estilo de vida, mas também a um aumento real na qualidade do ar com relação a quantidades de pólen alergênico (ZIELLO *et al.*, 2012). Evidências sugerem que as alterações climáticas afetam os diferentes processos aerobiológicos (emissão de dispersão, e / ou transporte e deposição) de aeroalérgenos (CECCHI *et al.*, 2010).

O documento da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2003 descreve que a sensibilização contra alérgenos presentes no pólen está aumentando na maioria dos países desenvolvidos e, existe o sinergismo com outros poluentes atmosféricos (EFSTATHIOU *et al.*, 2011). Outro fator importante destacado neste documento é que o pólen não é só um transportador de alérgenos, mas também é capaz de liberar outras substâncias inflamatórias (WHO, 2003).

Compreender a exposição humana aos aeroalérgenos requer estimativas precisas da distribuição espacial dos níveis de pólen no ar, bem como de poluentes em variados momentos (CECCHI *et al.*, 2010). Nesse sentido, a aerobiologia estuda as partículas biológicas suspensas na atmosfera e seus efeitos nocivos para a saúde humana. Esta área da ciência tem se expandido rapidamente devido ao aumento do número de doentes alérgicos a diferentes partículas como esporos fúngicos, ácaros, pólenes, entre outros (EFSTATHIOU *et al.*, 2011; CECCHI *et al.*, 2010).

As doenças alérgicas são mediadas pela expansão da célula auxiliar T do tipo 2 (Th2), juntamente com o estímulo da célula B para produção de anticorpos IgE específicos contra alérgenos ambientais comuns. A resposta alérgica caracteriza-se pela seleção de linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2), iniciada pelo processamento de alérgenos por células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais, que apresentam os peptídeos associados as moléculas de MHC de classe II às células T virgens, desse modo, dirigindo-as a um fenótipo de resposta Th2. A secreção de citocinas pelos linfócitos T auxiliares determinam o padrão de resposta Th2, constituído por moléculas que estimulam a recombinação gênica para a síntese de IgE específica (IL-4 e IL-13), o recrutamento de mastócitos (IL-4, IL-9 e IL-13) e a maturação de eosinófilos (IL-3, IL-5 e GM-CSF) e basófilos, como mostrado pela figura 1 (IL-3 e IL-4) (HOLGATE E POLOSA, 2008).

Em processos alérgicos, ocorre o desenvolvimento de fortes respostas de hipersensibilidade imediata, e neste mecanismo estão envolvidos reações imunes humorais (hipersensibilidade do tipo I) e mediadas por células (hipersensibilidade do tipo IV) (MAINTZ E NOVAK, 2007). Sabe-se que as manifestações das respostas alérgicas acontecem de maneira diferente de um organismo para outro, porém, todas estas respostas se iniciam por um processo silencioso, conhecido como sensibilização (LICHTENSTEIN, 1993).

da biossíntese de IgE pelos linfócitos B, que se associam aos receptores FcεRI que estão ligados na superfície dos mastócitos e basófilos (KAMBAYASHI E KORETZKY, 2007).

Numa subsequente exposição ao mesmo antígeno, conhecida como segunda sensibilização, expressiva resposta alérgica é observada. Após a interação do alérgeno com o tecido humano, ocorrerá ligação cruzada entre os segmentos específicos do antígeno (epitopo de IgE) e as IgEs anteriormente ligadas aos receptores FcεRI nos mastócitos e/ou basófilos, promovendo a ativação de mensageiros intracelulares e posterior liberação de mediadores celulares (KAMBAYASHI E KORETZKY, 2007; GIERAS *et al.*, 2007).

Os grânulos secretados são elétron-densos e heterogêneos, contendo histamina, heparina e mediadores quimiotáticos que atraem monócitos, neutrófilos e eosinófilos circulantes do sangue, para os locais de ativação dos mastócitos (KAMBAYASHI E KORETZKY, 2007; GIERAS *et al.*, 2007; KIERSZEMBAUM *et al.*, 2004). Esses compostos induzirão mudanças fisiológicas e anatômicas que desencadearão os sintomas alérgicos da hipersensibilidade imediata (BAX *et al.*, 2012; KAMBAYASHI E KORETZKY, 2007).

O processo que atrai mastócitos e basófilos para o local de entrada do alérgeno no organismo é uma das razões para que os indivíduos alérgicos tornem-se mais sensíveis (GIERAS *et al.*, 2007). Observa-se também, que indivíduos atópicos, ou seja, aqueles pré-dispostos a hipersensibilidade imediata, possuem maiores títulos de IgEs no sangue quando comparados aos não-atópicos, aumentando portanto o reconhecimento do antígeno pelo organismo e, desencadeando os sintomas da alergia (ALEKSEEVA *et al.*, 2007).

1.1- Alérgenos vegetais:

O termo alérgeno, de uma forma geral, é utilizado para identificar substâncias que possuem a capacidade de: i) sensibilizar (isto é, induzir a produção de anticorpos de alta afinidade, particularmente da classe IgE, pelo sistema imune); ii) ligar-se aos anticorpos IgE; e ainda, iii) ativar uma reação alérgica (isto é, desencadear sintomas alérgicos em uma pessoa sensibilizada) (AALBERSE, 2000).

Os tecidos vegetais que são consumidos pelos humanos contêm milhares de diferentes proteínas, sendo muitas capazes de desencadear respostas imunológicas em indivíduos atópicos, sendo classificados como alérgenos. Aproximadamente

0.5% da população dos Estados Unidos é afetada por vários estágios de alergia alimentar mediada por imunoglobulina do tipo E (EL-AGAMY, 2007; BREITENEDER E RADAUER, 2004).

A organização dos alérgenos dos vegetais é feita dentro de famílias e superfamílias, baseados na estrutura e função, por BREITENEDER E RADAUER, 2004: Alérgenos pertencentes às proteínas do sistema de defesa de plantas; Alérgenos associados às Proteínas estruturais e ao metabolismo; Alérgenos da família Cupin; e Alérgenos da super-família Prolaminas. As proteínas são agrupadas dentro de uma mesma família se possuir 30% (ou mais) de identidade ou ainda se tiverem baixa identidade, mas apresentarem função e estrutura muito similares.

Os alérgenos vegetais mais abundantes pertencem às superfamílias Cupin e Prolamina, sendo que as albuminas 2S pertencem à família das prolaminas. Existem também outros alérgenos pertencentes aos grupos das “proteínas relacionadas à patogênese” e profilinas (BREITENEDER E RADAUER, 2004). Adicionalmente tornou-se evidente que o nível de exposição e, as propriedades do alérgeno em si são importantes para a determinação do potencial alergênico (BREITENEDER E MILLS, 2005).

A existência da superfamília das prolamina é baseada na presença de uma sequência conservada de oito resíduos de cisteína. Todas as proteínas dessa superfamília são de baixo peso molecular e, apresentam α -hélices. Nesta família estão incluídas as proteínas transportadoras de lipídeo não específico (nsLTPs), inibidores de α -amilase/protease tipo Cereal, a prolamina de cereais e as albuminas 2S (BREITENEDER E RADAUER, 2004).

A família das albuminas 2S é um grupo de proteínas de reserva presente nas dicotiledôneas ou magnoliopsidas, além de serem os principais alérgenos da mamona. As proteínas deste grupo são heterodiméricas e, apresentam massa molecular de 10.000 - 18.000 Da e altos teores de arginina, serina e glutamina. Sabe-se que algumas delas são inibidoras de proteases e outras podem ainda apresentar propriedades alergênicas (DEUS-DE-OLIVEIRA E MACHADO, 2011; MACHADO E SILVA, 1992).

Muitos alérgenos de sementes pertencem a classe das albuminas 2S e, estes podem também ser encontrados no pólen de plantas como girassol, gergelim, amendoim e castanha; alérgenos semelhantes estão também presentes em algumas fontes animais como peixe e camarão. Tais proteínas possuem estruturas

semelhantes o que poderia promover reações cruzadas entre tais alérgenos. Alguns exemplos de alérgenos dessa família são: Ber e 1, de castanha do Maranhão (*Bertholletia excelsa*), Jug r 1, de noz (*Juglans regia*) (BREITENEDER E RADAUER, 2004).

Muitas plantas são cultivadas para fins econômicos em diversas regiões do mundo e seu plantio pode desencadear processos alérgicos em pessoas atópicas, através da dispersão aérea de alérgenos. Em todo o mundo vegetais estão sendo cultivados para a produção de biocombustíveis a fim de suprir a demanda energética atual. Dentre os vegetais produzidos e, potenciais fontes de alérgenos, pode-se citar a soja (*Glycine max* L.), o girassol (*Helianthus annuus* L.), o algodão (*Gossypium* spp.), a colza (*Brassica napus* L.), a mamona (*Ricinus communis* L.), o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) (DEUS-DE-OLIVEIRA E MACHADO, 2011).

1.2- Oleaginosas de interesse econômico – Mamona e Pinhão-manso:

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa conhecida desde a antiguidade por suas propriedades medicinais e como azeite para iluminação (Figura 2) (AZEVEDO E LIMA, 2001). Sua origem não é muito bem esclarecida, devido a alguns autores divergirem, em sendo ora asiática, ora africana, e até mesmo, como planta nativa da América. Sementes e outros objetos encontrados nos túmulos comprovam que a mamona já era utilizada pelos egípcios há pelo menos 4000 anos (FELIX *et al.*, 2008; FORNAZIERE JÚNIOR, 1986).



Figura 2: Mamona (*Ricinus communis* L.) e suas estruturas, folhas e frutos. Disponível em: <http://www.riogrande.rs.gov.br/pagina/index.php/noticias/detalhes+d104a,,secretario-de-agricultura-acompanhou-inicio-do-plantio-de-mamona.html#.UblAZcWx60s> (Acesso em 07/06/2013).

Segundo o Banco de Desenvolvimento de Minas Gerais S. A., da mamona se aproveita tudo, já que as folhas servem de alimento para uma espécie do bicho da

seda e a haste, além de celulose própria para a fabricação de papel, fornece matéria-prima para a produção de tecidos mais robustos. Além dessas aplicações, 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 lactação das vacas (DEUS-DE-OLIVEIRA E MACHADO, 2011; AZEVEDO E LIMA, 2001).

Economicamente, a mamona é cultivada em várias partes do mundo. A industrialização de sua semente obtém-se o óleo e a torta, sendo o primeiro, o principal produto, e o segundo, um produto com capacidade de restaurar terras esgotadas (FERNANDES E MACHADO, 2012; AZEVEDO E LIMA, 2001). 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 E SILVA, 2008). O óleo é extensivamente utilizado para fins medicinais e industriais, podendo ser empregado em rotas de síntese de muitos produtos, como cosméticos, lubrificantes, polímeros, entre outros produtos. (CHIERICE E NETO, 2007; ANANDAN *et al.*, 2005).

A maior parte do óleo extraído da mamona é usada na fabricação de tintas, vernizes, cosméticos e sabões. É utilizado também na produção de plásticos e de fibras sintéticas, sendo essas últimas, antitóxicas e antialérgicas. Salienta-se também que este óleo, devidamente processado, é um excelente lubrificante, sendo ideal para motores de alta rotação, como foguetes espaciais e sistemas de freios automotivos. O óleo desta oleaginosa pode ser utilizado na fabricação de corantes, anilinas, desinfetantes, germicidas, óleos lubrificantes de baixa temperatura, colas e aderentes, base para fungicidas, inseticidas, tintas de impressão, vernizes, nylon e matéria-plástica. Outro uso deste óleo é na biomedicina, na elaboração de próteses e implantes, substituindo o silicone, como ocorre em cirurgias ósseas, de mama e de próstata (SANTOS *et al.*, 2007; OGUNNIY, 2006; MENEGHETTIA *et al.*, 2006; AZEVEDO E LIMA, 2001).

De uma forma geral, biodiesel é um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis fósseis (BELTRÃO E LIMA, 2007; OGUNNIY, 2006; MENEGHETTIA *et al.*, 2006; PARENTE, 2004).

Alguns pesquisadores reconhecem que o óleo de mamona seja o melhor óleo vegetal para a produção de biodiesel por ser o único solúvel em álcool e não necessitar de calor, reduzindo o gasto de energia para sua transformação em combustível (BELTRÃO E LIMA, 2007; PARENTE, 2004).

Além da qualidade/versatilidade do óleo extraído das sementes de mamona, a planta apresenta grande potencial para ser cultivada em amplas áreas do território brasileiro devido a resistência à seca e adaptação ao clima semi-árido (VISSER *et al.*, 2011; CARTAXO *et al.*, 2004). No Brasil, as indústrias de extração do óleo de mamona em atividade estão instaladas na Bahia, em Minas Gerais, no Mato Grosso e em São Paulo e a capacidade destas empresas é suficiente para processar 440 mil toneladas/ano de mamona em baga (semente descascada), gerando, num período de 200 dias/ano, o equivalente a 198 mil toneladas de óleo (SANTOS *et al.*, 2007).

De acordo com Severino (2005), a torta é o principal produto da cadeia produtiva da mamona, produzida a partir da extração do óleo das sementes na proporção aproximada de 1,2 toneladas para cada tonelada de óleo extraída, ou seja, corresponde a 55% de peso das sementes, valor que pode variar de acordo com o teor de óleo da semente e do processo industrial de extração do óleo. Na Índia, principal produtor mundial de mamona, cerca de 85% da torta é utilizada como fertilizante orgânico (KONNUR E SUBBARAO, 2004) por ser excelente fonte de nitrogênio e apresentar propriedades inseticidas e nematicidas (DIRECTORATE OF OILSEEDS RESEARCH, 2004). Além disso, a torta pode ser usada como matéria-prima para a produção de aminoácidos, plásticos, em especial os biodegradáveis, colas e outros produtos (CHIERICE E NETO, 2007).

Com a intenção de expandir o uso de biocombustíveis no país, o Brasil criou em 2004 o programa interministerial do Governo Federal denominado PNPB (Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel). O PNPB tem por objetivo a implementação sustentável da produção e uso do biodiesel, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, via geração de emprego e renda. Desta forma, o programa traçou algumas metas estabelecidas em janeiro de 2005 (Lei #11.097/2005), para introduzir na matriz energética brasileira o uso obrigatório de pelo menos 2% (B2) de biodiesel até 2008 e de 5% (B5) até 2013 (Disponível em <http://www.mda.gov.br>).

Em julho de 2009, o país aumentou de 3% para 4% (B4) o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel proveniente de petróleo (Resolução nº 2/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), publicada no Diário Oficial da União em 18 de maio de 2008) e o biodiesel B5 já se encontra em uso desde janeiro de 2010, antecipando as previsões realizadas pelo PNPB (Resolução nº 6 do Conselho Nacional de Política Energética, publicada no Diário Oficial da União em 26 de outubro de 2009).

Esta contínua elevação do percentual de adição de biodiesel ao diesel demonstra o sucesso do PNPB e da experiência acumulada pelo Brasil na produção e no uso em larga escala de biocombustíveis. Desta forma, diversas oleaginosas são cultivadas em território nacional a fim de analisar o potencial de seu óleo para síntese de biocombustíveis (VISSER *et al.*, 2011).

Além disso, a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) está avaliando várias solicitações para o financiamento do biodiesel, e abertura das novas fábricas de biodiesel para aumentar a produção nacional e alcançar as metas propostas pelo PNPB. Entretanto, um maior aumento no processamento será necessário para alcançar o requerimento legal de 5% de biodiesel para 2013 (BELTRÃO E LIMA, 2007; NASS *et al.*, 2007).

Para atender a demanda por óleos vegetais, outra oleaginosa candidata a cultivo no Brasil para síntese do biodiesel é o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) (Figura 3). O pinhão-manso, assim como a mamona, pertence a família Euphorbiaceae e, possui provável origem no México e América central. A planta do pinhão-manso é conhecida como “physic nut” e “purging nut” em inglês, “pourghère” e “pignon d’Inde” em francês, “piñoncillo” no México, purgueira em Portugal, e também como “mundubi-assu” aqui no Brasil (TIWARI *et al.*, 2007; HELLER, 1996).



Figura 3: Pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). Disponível em: <http://visaoglobal.org/2007/10/02/moambique-destina-60-mil-hectares-para-projeto-de-biodiesel/> Acesso em: 07/06/2013.

O pinhão-mansô pode ser encontrado sob como uma pequena árvore que pode alcançar cerca de 5 metros de altura, Figura 4 (HELLER, 1996). Após a polinização da flor (inflorescência), desenvolve-se um fruto elipsoidal trilobular (cápsula) cujo exocarpo permanece carnudo até que as sementes estejam maduras (Luo *et al.*, 2012). Floração é monóica, apresentando na mesma planta, mas com sexo separado, flores masculinas, em maior número, nas extremidades das ramificações e femininas nas ramificações, as quais são amarelo-esverdeadas e diferencia-se pela ausência de pedúnculo articulado nas femininas que são largamente pedunculadas. As sementes de pinhão-mansô são negras, possuem 2 cm de comprimento e 1 cm de espessura (KARAJ E MÜLLER, 2010; SIRISOMBOONA *et al.*, 2007; HELLER, 1996).

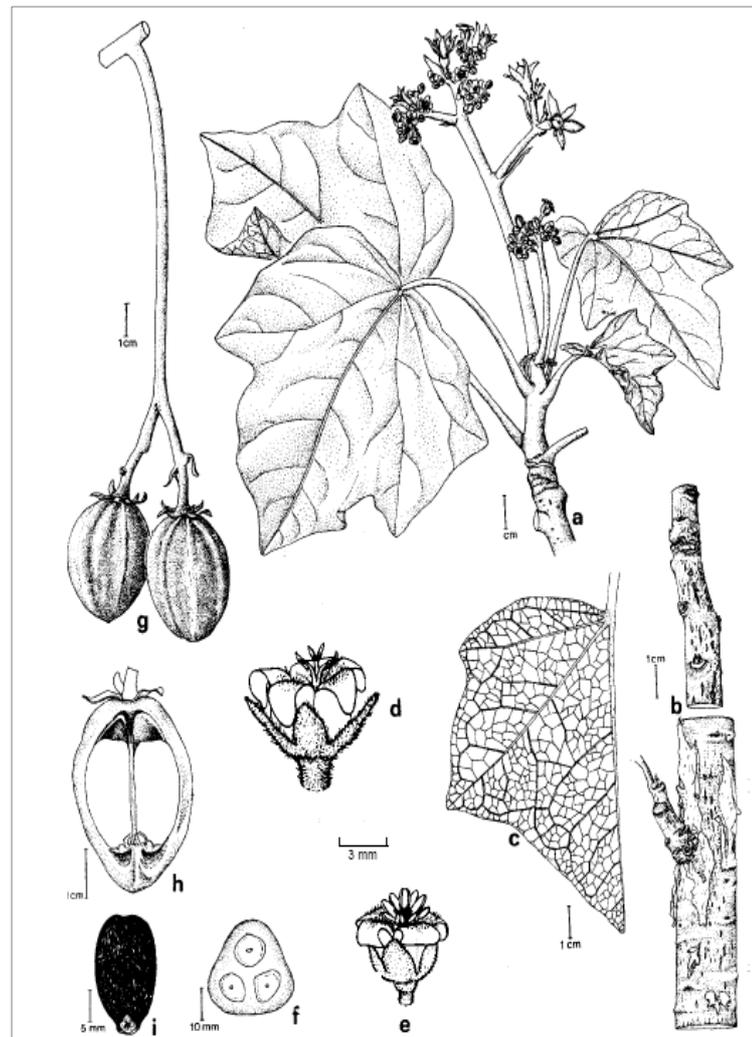


Figura 4: Partes do pinhão-mansô: a – ramo floral, b – caule, c – nervuras foliares, d – flor feminina, e – flor masculina, f – corte perpendicular de frutos imaturos, g - frutos, h – corte longitudinal do fruto, i – semente. (Adaptado de Heller, 1996).

As sementes de *J. curcas* contêm de 35 a 45% de óleo, que pode ser utilizado na fabricação de sabão, cosméticos e combustíveis alternativos que substituem o diesel e o querosene. O óleo de pinhão-mansão também pode ser aplicado para o tratamento de eczema e doenças de pele, e no alívio de dores reumáticas. O alto conteúdo de ácido linoleico (36%, C18:2) é de grande interesse em tratamentos de pele e utilização em cosméticos (KUMAR E SHARMA, 2008; KAUSHIKA *et al.*, 2007; HELLER, 1996).

Além de produzir óleo, outras partes do pinhão-mansão também podem ser utilizadas para outras finalidades, tais como: a) substituição parcial do arame em cercas vivas, já que os animais evitam tocá-lo devido ao látex cáustico que escorre das folhas arrancadas ou feridas; b) pode ser usado como suporte para plantas trepadeiras como a baunilha (*Vanilla aromática*), visto que o tronco possui casca lisa e macia e c) atua como fixador de dunas na orla marítima (PEIXOTO, 1973). Na medicina doméstica, aplica-se o látex da planta como cicatrizante, hemostático e também como purgante. As raízes possuem propriedades farmacológicas, sendo consideradas diuréticas e antileucêmicas e as folhas são utilizadas para combater doenças de pele. São eficazes também contra o reumatismo e possui poder antissifilítico. As sementes são utilizadas como purgativo, verificando-se casos de intoxicação em crianças e adultos quando as ingerem em excesso, o que pode ser perigoso e até fatal (FERNANDES E MACHADO, 2012). A toxina presente nas sementes de pinhão-mansão possui atividade contra larvas dos mosquitos *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* (NUCHSUKI *et al.*, 2012).

A plena utilização das sementes de mamona e de pinhão-mansão e, dos produtos obtidos a partir de seu processamento para a retirada do óleo, é limitada por compostos tóxicos e alergênicos presentes em algumas partes destes vegetais (DEUS-DE-OLIVEIRA E MACHADO, 2011). Na mamona são encontrados a proteína tóxica ricina (toxalbumina), o alcalóide volátil ricinina e o complexo alergênico, denominado de CB-1A (Castor-bean allergen) que é uma mistura de proteínas de baixo peso molecular e polissacarídeos. A torta de pinhão-mansão *in natura*, obtida após a extração do óleo das sementes, é tóxica e pode apenas ser utilizada como fertilizante, sendo esta rica em nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) (OPENSHAW, 2000). A toxicidade das sementes de pinhão-mansão e, conseqüentemente da torta, é atribuída principalmente à presença de dois componentes: uma proteína inativadora de ribossomos (curcina) e a ésteres diterpenos, substâncias capazes de induzir

tumores de pele quando administrados em camundongos (FERNANDES E MACHADO, 2012; DEVAPPA *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 1988; STIRPE *et al.*, 1976).

1.2.1- Compostos tóxicos:

Os compostos tóxicos encontrados nas sementes e, também encontrados na torta de mamona são: a proteína ricina (toxalbumina) e o alcalóide volátil ricinina, (BEWLEY E BLACK, 1994). As sementes de pinhão-mansão contêm curcina, uma glicoproteína tóxica com 54% de homologia com a cadeia A da ricina e modo de ação semelhante a esta toxina (ALEXANDER *et al.*, 2008;. KUMAR E SHARMA, 2008), bem como outra classe de compostos policíclicos tóxicos, os ésteres de forbol (DEVAPPA *et al.*, 2010; MARTINEZ-HERRERA *et al.*, 2006), que podem induzir tumores de pele, quando administrado a ratos (CHEN *et al.*, 1988.).

- Ricinina:

A ricinina é um alcalóide que atua na defesa vegetal, sendo sintetizado em maior quantidade em situações como danos mecânicos ou alta temperatura. Segundo Beltrão e Lima (2007), este alcalóide 1,2-dihidro-4-metoxi-1-metil-2-oxo-3-piridinocarbonitrila ($C_8H_8N_2O_2$) 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 (GODOY *et al.*, 2009; Audi *et al.*, 2005). Moshkin (1986) afirma que a concentração de ricinina na semente aumenta de dentro para fora, ou seja, o endosperma contém uma pequena quantidade deste composto (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 E LIMA, 2007).

- Ricina:

A ricina é uma das mais potentes fitotoxinas conhecidas e, é classificada como uma proteína inativadora de ribossomos (RIP) do tipo 2. As RIPs apresentam papéis interessantes na história das ciências biomédicas e, a estrutura e o mecanismo de ação destas toxinas têm 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, removendo uma adenina em uma região de *loop* bem conservada no rRNA. 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*). Atualmente existem mais de 50 RIPs do tipo 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 E BARTELLI, 2006).

A ricina é uma proteína encontrada exclusivamente no endosperma das sementes de mamona, não sendo detectada em outras partes da planta, como raízes, folhas ou caules. Representa de 1,5 a 4,0% do conteúdo proteico total da semente (FERNANDES E MACHADO, 2012) e é a principal responsável pela toxicidade da torta de mamona, sendo das proteínas mais tóxicas já caracterizadas (MOSHKIN, 1986). A ricina é o principal empecilho para uso alimentar da torta da mamona para animais (NA *et al.*, 2004). A ricina (66 kDa) é sintetizada como uma única cadeia polipeptídica que é posteriormente clivada nas cadeias A de 32 kDa (RTA) que exibe atividade catalítica unida por uma única ponte dissulfeto a cadeia B, de 34 kDa (RTB), figura 5. O seu precursor, apesar de ser capaz de se ligar à galactose, não faz a retirada da purina do RNAr (RICHARDSON *et al.*, 1989). A ricina é uma proteína tóxica por ser capaz de inibir a síntese de proteínas, sendo classificada como RIP (Proteína Inativa Ribossomos) do tipo 2 por apresentar as duas cadeias descritas anteriormente. (FERNANDES E MACHADO, 2012; OLSNES, 2004).

A cadeia B (RTB) liga frações de β -D-galactopiranosídeo, e é a porção correspondente à lectina (OLSNES, 2004). A cadeia B se liga a glicoproteínas e glicolípidos na superfície da célula e do citosol permitindo a internalização e translocação intracelular da cadeia A (RTA) (YOULE *et al.*, 1981; STIRPE E BARTELLI, 2006). 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).

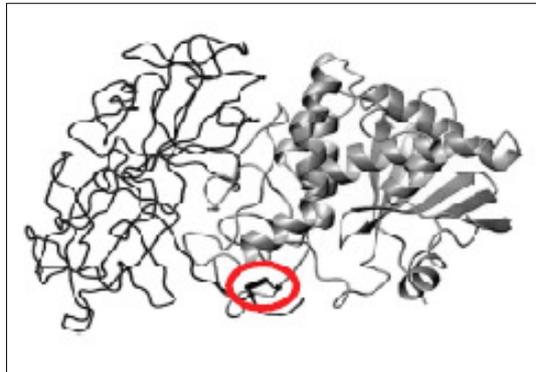


Figura 5: Estrutura quaternária da molécula de ricina. A cadeia B (RTB) está localizada no lado esquerdo e a cadeia A (RTA) está à direita. O círculo vermelho indica a ponte dissulfeto ligando as cadeias A e B (RUTENBER E ROBERTUS, 1991).

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 E VAN DEURS, 2000). A cadeia B pode se ligar à superfície de glicoproteínas contendo resíduos de galactose e N-acetil-galactosamina, de forma análoga a algumas lectinas, permitindo a internalização da cadeia A (BRANDT *et al.*, 2001).

A cadeia A da ricina possui atividade catalítica que em 1987, Endo e colaboradores apontaram-na como uma N-glicosidase, ou seja, remoção de uma adenina específica (depurinação), o resíduo A_{4324} , a partir de uma região de rRNA conhecido como o loop-sarcin/ricin (SRL) (SPIES E COULSON, 1973). Esta região do RNAr modificada é essencial para ligação do fator de alongamento, sendo assim, os ribossomos modificados não podem dar suporte à síntese proteica (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 de forma que a célula morre por não poder manter a síntese de proteínas.

A dose letal da ricina por inalação ou por injeção intramuscular ou venosa, segundo Bradberry e colaboradores (2003) é de aproximadamente 5–10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, que corresponde a 350–700 μg para um indivíduo adulto de 70 kg. A morte ocorre em poucas horas. O estabelecimento de uma correlação entre a quantidade de semente ingerida de forma acidental e a morte de um animal não é tão simples de ser estabelecida. O teor de ricina por semente varia entre cultivares, além disto, Sehgal

e coautores (2010) demonstraram que existem isoformas de ricina, com diferentes níveis de toxicidades, em uma mesma cultivar.

Sehgal *et al.*, 2010 demonstraram a presença de três isoformas de ricina em sementes de mamona. As isoformas foram subfracionados em ricina I, II e III por cromatografia e suas massas moleculares situam-se entre 60-65 kDa. Ricina I, II e III foram altamente citotóxicas contra células Vero com valores de IC50 de 60, 30 e 8 ng/ml, respectivamente. Diferença na citotoxicidade das isoformas foi confirmada através de ensaio de hemaglutinação e ricina III causou maior grau de hemólise

Na área médica, a ricina tem sido utilizada entre um grupo de proteínas tóxicas como imunotoxinas e agentes terapêuticos utilizados no tratamento de câncer e de doenças auto-imunes (BRANDT *et al.* 2005).

A ricina é um dos principais obstáculos à utilização da torta de mamona para alimentação animal (NA *et al.*, 2004). A transformação da torta de mamona em um produto não tóxico que pode ser utilizada na alimentação de animais é desde há muito tempo interesse de vários pesquisadores ao redor do mundo e, alguns resultados satisfatórios foram obtidos. Muitos métodos têm sido utilizados para desintoxicar a torta de mamona, alguns dos quais parecem ser mais eficazes do que os outros (DEUS-DE-OLIVEIRA E MACHADO, 2011; PUTTARAJ *et al.*, 1994).

Nos últimos anos, várias metodologias surgiram para desintoxicar a torta de mamona para usá-la como ração animal. Anandan *et al.* (2005) relataram que processos físicos com base no calor (ebulição, esterilização em autoclave, forno de ar quente) e processos químicos a base de álcali (hidróxido de sódio a hidróxido de cálcio, e amoníaco) podem desintoxicar este valioso produto obtido após a extração do óleo das sementes. A eficácia dos tratamentos foi avaliada com base nas alterações qualitativas e quantitativas do conteúdo ricina. De todos os métodos propostos nestes ensaios, a autoclavagem (15 psi., 60 min) e o tratamento com cálcio (40 g/kg) destruiu completamente a toxina, resultado observado por eletroforese, no entanto, os ensaios toxicológicos com estas amostras não foram realizados.

Godoy e colaboradores (2009) propuseram a utilização de fermentação em estado sólido (FSS) de resíduos de mamona com alguns objetivos: desintoxicar a ricina deste material, reduzir do potencial alergênico e, ainda estimular a produção de lipases. Observou-se que o fungo, *Penicillium simplicissimum*, um excelente produtor de lipase, foi capaz de crescer e produzir a lipases no resíduo de mamona.

O processo descrito de biodetoxificação poderia estender a utilização de resíduos fermentados de mamona e, potencialmente, ser usado como uma ração para animais ou fertilizantes, sem desencadear danos ao meio ambiente (GODOY *et al.*, 2009). O processo FSS utilizados por Godoy e colaboradores (2009) permitiu a total desintoxicação da ricina como observado por eletroforese e análise toxicológica.

- Curcina:

A curcina é uma RIP do tipo I isolada das sementes de pinhão-manso (STIRPE *et al.*, 1976). Sua sequência foi resolvida por Li *et al.* (2003) e a ausência de uma porção lectina impede esta proteína de se ligar às células, dificultando sua internalização e a tornando muito menos tóxica do que as RIPs do tipo II, como a ricina presente nas sementes de mamona (HUANG *et al.*, 2008).

Por muito tempo se pensou que a atividade tóxica da planta era causada pela ação da curcina abundante nas sementes. Contudo, vários trabalhos vêm contribuindo para demonstrar que a atividade tóxica das sementes, bem como do óleo de *J. curcas*, deve-se, na verdade, à presença de ésteres de forbol, e não da curcina (FERNANDES E MACHADO, 2012). Aregheore *et al.* (1998) compararam a atividade da curcina para variedades tóxicas e não tóxicas de *J. curcas*, e observaram que o efeito da proteína é similar para ambas as variedades. Gandhi *et al.* (1995) relatam que a atividade inibidora da síntese de proteínas da curcina é cerca de mil vezes menor que a da ricina e a da abrina (fitotoxina do gênero *Aleurites*) e, que para ela, esta atividade só foi demonstrada *in vitro*. Os mesmos autores realizaram ensaios de toxicidade aguda, via oral, em ratos e toxicidade tópica em coelhos, ratos e camundongos. Eles observaram que os efeitos tóxicos do óleo das sementes sobre estes animais é similar aos efeitos produzidos pelo óleo de tungue, extraído das sementes de *Aleurites fordii* Hemsley, o qual é tóxico devido à presença de ésteres de forbol.

Recentemente, Lin *et al.*, 2010 purificaram uma molécula de curcina que inibe fortemente a síntese proteica de lisado de reticulócitos de coelho, com uma IC50 de 0,42 nM. A curcina isolada teve uma atividade hemaglutinante, quando a sua concentração era maior que 7,8 mg/L. A estrutura secundária de curcina também foi analisada por espectro de Dicroísmo Circular (CD).

Embora a toxicidade de curcina esteja bem documentada na literatura, as propriedades tóxicas e detalhes da estrutura 3D de curcina ainda não foram

determinada por cristalografia de raios X, espectroscopia de RMN ou de qualquer das técnicas de silico. Nesta busca, o trabalho desenvolvido por Srivastava e colaboradores (2012) apresenta a estrutura 3D da curcina (Figura 6) realizada por modelagem usando uma abordagem de predição da estrutura.

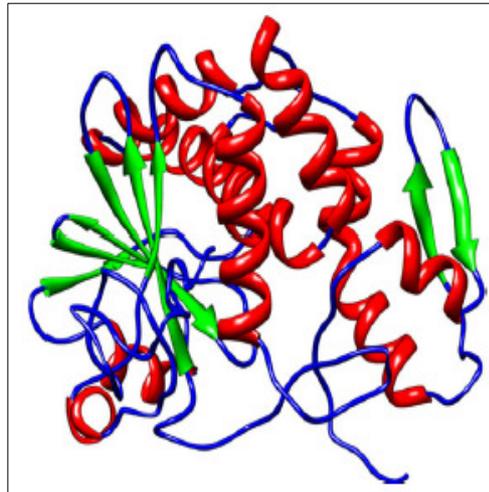


Figura 6: Representação esquemática da curcina mostrando os arranjos de alfa-hélices, folhas-beta e regiões de loops na estrutura tridimensional predita por Srivastava e colaboradores em 2012.

Além da preocupação com a presença da toxina curcina na torta de pinhão-manso, há outra preocupação a ser abordada: a presença de ésteres de forbol.

- Ésteres de forbol:

O termo éster de forbol (EF) é usado hoje para descrever uma família natural de compostos amplamente distribuídos em espécies vegetais das famílias Euphorbiaceae e Thymelaeaceae (RAKSHIT *et al.*, 2008). Os ésteres de forbol são definidos como compostos policíclicos nos quais dois grupos hidroxila em carbonos vizinhos são esterificados à ácidos graxos, e estão presentes em muitas plantas incluindo o pinhão-manso (BEUTLER *et al.*, 1989).

A estrutura dos ésteres de forbol é dependente de um esqueleto carbônico diterpeno tetracíclico conhecido como tigliano, a principal porção álcool nos ésteres de forbol (Figura 7). Os diferentes pontos de hidroxilação no tigliano determinam as diferentes variedades de EF, o que determina também o grau de toxicidade (GOEL *et al.*, 2007).

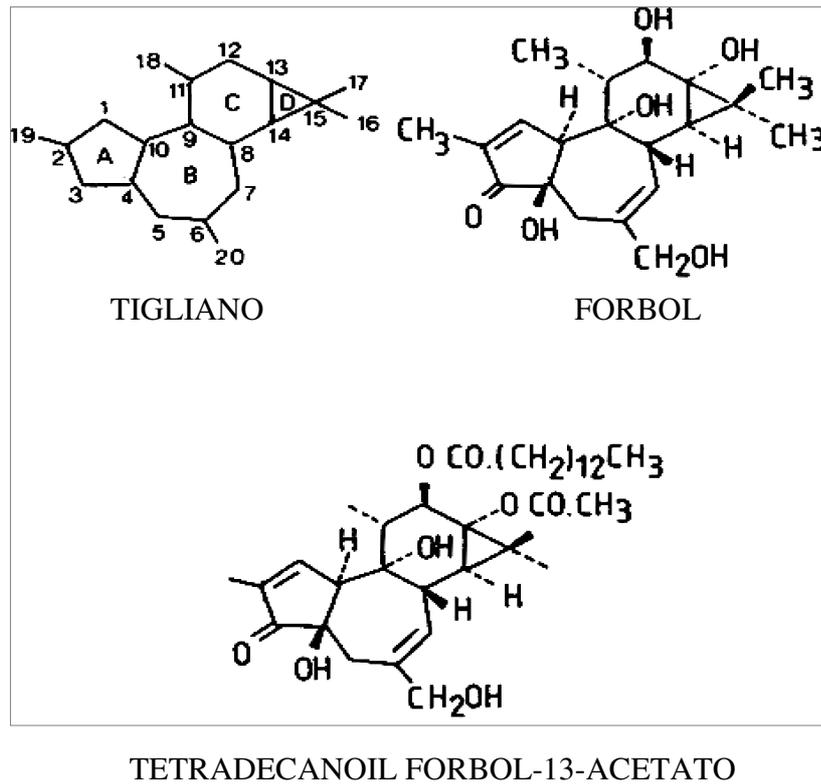


Figura 7: Estrutura do tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA).

Estas moléculas são naturalmente instáveis e são susceptíveis à oxidação, hidrólise e epimerização durante os processos para seu isolamento (HAAS *et al.*, 2002). Além disso, esses compostos podem ser encontrados no óleo, os quais, ao conter estas substâncias são conhecidos como purgantes (GANDHI *et al.*, 1995).

Os ésteres de forbol e seus diferentes derivados são ditos como promotores de tumor. Em adição a este efeito, eles induzem uma considerável gama de efeitos biológicos, mesmo em baixas concentrações. A ação primária dos ésteres de forbol ocorre em membranas biológicas. É uma toxina anfifílica e tende a se ligar aos fosfolípidios de membrana. Os efeitos iniciais na membrana incluem modificação nas atividades dos receptores celulares, aumento na captação de 2-desoxiglicose e outros nutrientes, adesão celular alterada, indução de ácido aracdônico liberado e de síntese de prostaglandina, inibição da ligação de fatores de crescimento, e metabolismo de lipídeos alterado (WEINSTEIN *et al.*, 1979).

Os ésteres de forbol são análogos do diacilglicerol, um ativador de muitas isoformas da proteína quinase C (PKC). A atividade mais investigada destes ésteres é a sua ligação e ativação da proteína quinase C (PKC), que desempenha um papel crítico nas vias de transdução de sinal e regula o crescimento e diferenciação

celular. A ligação do éster de forbol hiperativa a PKC e dispara a proliferação celular, assim amplificando a eficácia de carcinógenos (GOEL *et al.*, 2007; SEGAL *et al.*, 1975).

Contraditório com a sua capacidade de promoção tumoral, existem relatos sobre a capacidade pro-apoptose de alguns ésteres de forbol em células tumorais (BRODIE E BLUMBERG, 2003; GONZALEZ-GUERRICO E KAZANITEZ, 2005). Alguns ésteres de forbol são inibidores da replicação do HIV e tem atividade anti-leucêmica (GOEL *et al.*, 2007). Alguns tipos de éster de forbol afetam muitas atividades enzimáticas a partir da sua interação com a PKC. O forbol-12-miristato-13- acetato (PMA) provoca o decréscimo concentração e tempo dependentes do RNAm codificante para enzimas como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase, a enzima chave na gliconeogênese (CHU E GRANNER, 1986). Os ésteres de forbol também têm efeito sobre a fosforilação da tirosina hidroxilase, a qual possui papel na biosíntese de catecolamina (GOEL *et al.*, 2007).

O efeito da exposição aguda da pele de humanos a estas plantas tóxicas leva à inflamação, e os sintomas pré-inflamatórios são dor e necrose do tecido epitelial. Tumores só se desenvolvem após uma exposição crônica às plantas. Este fenômeno tem sido demonstrado apenas na pele de camundongos. Quando partes das plantas são ingeridas, os sintomas são ardência nos lábios, língua e mucosas orais, seguidos de dores intestinais, vômitos e diarréias severas (FERNANDES E MACHADO, 2012).

Animais que ingeriram material vegetal contendo éster de forbol apresentaram redução da produção de leite e do potencial reprodutivo, além da contaminação do leite com os constituintes tóxicos e, outros vieram a óbito. Em caprinos alimentados com material vegetal contaminado com ésteres de forbol foi observado redução dos níveis de glicose, aumento nas concentrações de arginase, glutamato, e oxaloacetato transaminase, perda de apetite, reduzida absorção de água, diarréia, desidratação, e outros efeitos hemorrágicos em diferentes órgãos (ADAM E MAGZOUB, 1975).

A solubilidade dos ésteres de forbol no óleo extraído da semente torna este produto tóxico. Sabe-se que o óleo causa manifestações toxicológicas como diarréia e inflamações gastrointestinais, e irritações seguidas de necrose dérmicas. O óleo e a fração tóxica também têm atividade hemolítica (GHANDI *et al.*, 1995). O contato com os olhos pode causar conjuntivites e edema (EVANS E EDWARDS, 1987). Os

ésteres de forbol possuem efeitos contraditórios, alguns efeitos negativos, mas, também outros benéficos. Alguns forbóis são inibidores de tumor, inibidores da replicação do HIV, e possuem atividade antileucêmica (GOEL *et al.*, 2007).

Em relação aos ésteres de forbol presentes no pinhão-manso, Haas *et al.* (2002) isolaram do óleo de *J. curcas* seis diferentes formas por HPLC. Eles nomearam as frações de C1 à C6. A diferença na toxicidade entre estes compostos ainda não foi avaliada. Quanto à importância dos ésteres de forbol para a fisiologia da planta, no caso o pinhão-manso, sabe-se muito pouco. Apesar de alguns pesquisadores afirmarem que a substância não possui efeito fisiológico e nenhuma relação com a defesa da planta contra pragas e doenças, sabe-se que o éster de forbol, forbol-12-miristato-13-acetato: PMA, promove a ativação de uma proteína quinase de 45 kDa relacionada com injúria (WIPK: proteína quinase induzida por injúria - *wound-induced protein kinase*) em células de tabaco. A ativação da proteína quinase em resposta ao éster de forbol está associada com a fosforilação (BAUDOIN *et al.*, 2002).

1.2.2- Compostos Alergênicos:

- Albumina 2S de mamona:

Assim como outras proteínas de reserva, as proteínas alergênicas de mamona são sintetizadas em tempos específicos durante o desenvolvimento da semente e depositadas dentro dos vacúolos (corpúsculos proteicos) durante o desenvolvimento da semente, para então serem degradadas durante a germinação, dando suporte ao seu crescimento (AHN E CHEN, 2007; REGENTE E LA CANAL, 2001).

As albuminas 2S são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, como um precursor proteico de alto peso molecular, Figura 8. Posteriormente este precursor é clivado proteoliticamente, gerando um peptídeo ligante e outros pequenos peptídeos (JOLLIFFE *et al.*, 2004; SHEWRY *et al.*, 1995). A glicosilação dessas proteínas pode ocorrer durante a síntese proteica e, os carboidratos incorporados são, em sua maioria, manose e glicosamina (JOLLIFFE *et al.*, 2004; BEWLEY E BLACK, 1994).

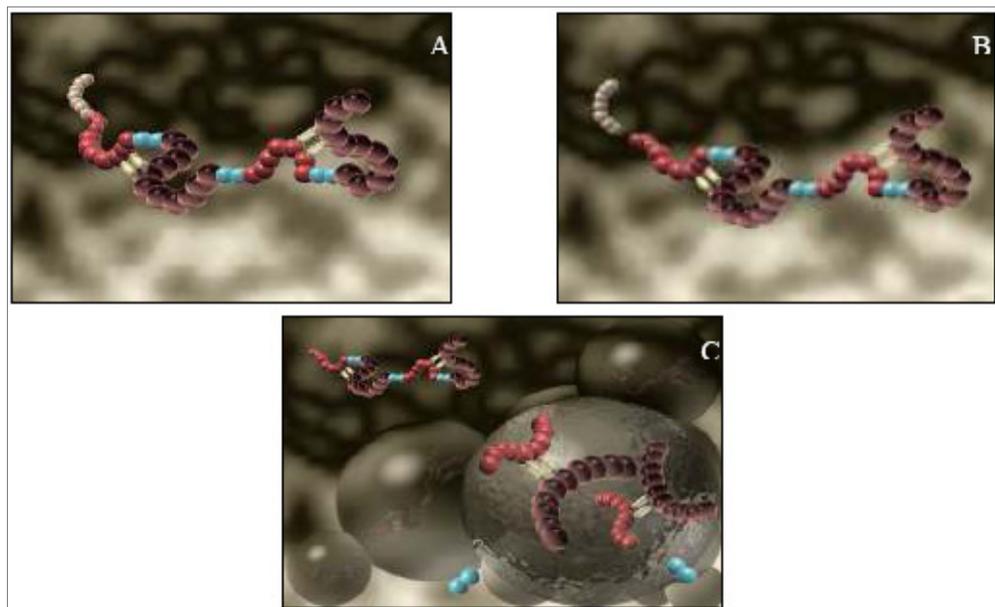


Figura 8: Esquema do processamento do precursor das isoformas Ricin B e Ricin A. (A) Precursor intacto com Peptídeo sinal em bege, pontes de enxofre em amarelo, Ricin B e Ricin A respectivamente em vermelho (cadeias leves) e em marrom (cadeias pesadas), peptídeos de ligação em azul; (B) Perda do peptídeo sinal; (C) Perda dos peptídeos de ligação com consequente separação das duas isoformas (DEUS-DE-OLIVEIRA E MACHADO, 2011).

Os pesquisadores acreditavam que as albuminas 2S fossem inativas metabolicamente, mas atualmente, devido à sua capacidade inibidora de proteinases, às propriedades alergênicas (MACHADO E SILVA, 1992), e à ação antifúngica (AGGIZIO *et al.*, 2003), acredita-se que elas estejam envolvidas em funções de defesa constitutivas da planta (REGENTE E LA CANAL, 2001). As propriedades alergênicas das albuminas 2S de mamona são resistentes à desnaturação térmica e química, podendo, mesmo após os tratamentos de desintoxicação, desencadear alergia por contato bem como por inalação (MACHADO E SILVA, 1992; SILVA JR. *et al.*, 1996).

Historicamente (Figura 9), no ano de 1943, Spies e Coulson isolaram da semente de mamona uma fração proteica de baixo peso molecular, estável ao calor, que foi denominada CB-1A (castor bean allergens). No ano de 1947 a hipersensibilidade desencadeada por mamona foi descrita pela primeira vez e em 1977, Li e colaboradores isolaram e caracterizaram uma proteína das sementes de *Ricinus communis* L. de baixo peso molecular com alto “teor” de glutamina que mostrou propriedades similares àquelas da proteína anteriormente isolada de mamona. Posteriormente, no ano de 1978, Youle e Huang concluíram que CB-1A era a mesma proteína de reserva caracterizada por Li *et al.* em 1977. Em 1982,

Sharief e Li isolaram e sequenciaram uma proteína das sementes de *Ricinus communis* L. (Ric c 1), com coeficiente de sedimentação 2S, constituída de duas subunidades unidas por pontes de enxofre. A menor contendo 34 aminoácidos (Ric c 1 cadeia leve) com massa molecular aparente de 4 kDa e a subunidade maior composta de 61 aminoácidos (Ric c 1 cadeia pesada) com massa molecular de 7 kDa.

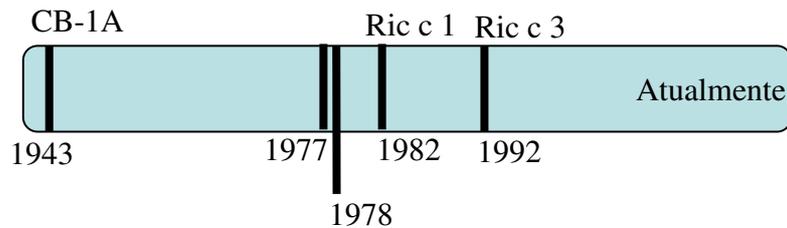


Figura 9: Histórico das albuminas 2S de *Ricinus communis* L. **1943** - Spies e Coulson, (CB-1A); **1977** - Li e colaboradores isolaram e caracterizaram uma “outra”; **1978** – Youle e Huang; **1982**- Sharief e Li, sequenciaram Ric c 1; **1992** – Machado e Silva isolaram e sequenciaram Ric c 3 (~11 KDa); **Atualmente:** ~ 20 isoformas de albuminas 2S já foram isoladas e parcialmente caracterizadas.

No ano de 1992, Machado e Silva isolaram e seqüenciaram um segundo alérgeno da semente de mamona, denominado de Ric c 3, tendo peso molecular em torno de 11 kDa, presente no mesmo precursor de 29 kDa de Ric c 1, como mostrado na Figura 10 abaixo. Este alérgeno teve sua estrutura completamente elucidada no ano de 1996. Desde 2003, muitas outras proteínas alergênicas, pertencentes à classe das albuminas 2S, têm sido identificadas nas sementes de mamona por Machado e colaboradores (FELIX *et al.*, 2008; FREIRE *et al.*, 2007).



Figura 10: Estrutura Primária do precursor das Albuminas 2S. Verde = cadeia leve e cadeia pesada de Ric c 3; Marrom= cadeia leve e cadeia pesada de Ric c 1; Cinza = peptídeos que são eliminados durante o processamento (SILVA JR., 1996).

- Estrutura das albuminas 2S:

A sequência de aminoácidos reconhecida pela molécula de anticorpo é muito menor que a macromolécula imunogênica. Por isso, a ligação do anticorpo ocorre somente numa porção específica do antígeno. Esta região é chamada de epitopo ou determinante antigênico. Os antígenos podem ter múltiplos epitopos e cada um pode se ligar a uma molécula de anticorpo (ALEKSEEVA *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2004). Numa reação alérgica, o epitopo é reconhecido pelas imunoglobulinas do tipo E específicas, desencadeando todo o processo alérgico. Estas regiões presentes no antígeno podem ser compostas por resíduos de aminoácidos sequenciais ao longo da cadeia polipeptídica (epitopo linear ou contínuo) ou por resíduos não-sequenciais oriundos de segmentos linearmente afastados, que após a montagem da conformação da proteína permanecem unidos (epitopo conformacional ou descontínuo) (GIERAS *et al.*, 2007; SCHEIN *et al.*, 2005). Os epitopos contínuos são mantidos após desnaturação, ao contrário dos epitopos conformacionais (SCHEIN *et al.*, 2005).

Com relação aos estudos dos epitopos presentes na molécula de albumina 2S de mamona (Figura 11), Vieira em 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 epitopos contínuos nas duas isoformas. Posteriormente, Mayerhoffer (2004) verificou que após a clivagem enzimática dessas isoformas, dois peptídeos presentes na cadeia pesada de Ric c 3, induziram uma resposta significativa quanto a desgranulação dos mastócitos previamente armados com IgE anti-albumina 2S de mamona. Neste mesmo trabalho, Mayerhoffer caracterizou um epitopo linear, cuja sequência peptídica está presente também em outros alérgenos.

Dando prosseguimento aos trabalhos realizados por Mayerhoffer, Felix e colaboradores, mapearam os aminoácidos responsáveis pela ligação da proteína alergênica de mamona nas IgEs, identificando, deste modo, epitopos de ligação a IgE contínuos em Ric c 1 e Ric c 3, sendo estes, mais resistentes a desnaturação térmica, química e a proteólise (FELIX *et al.*, 2008).

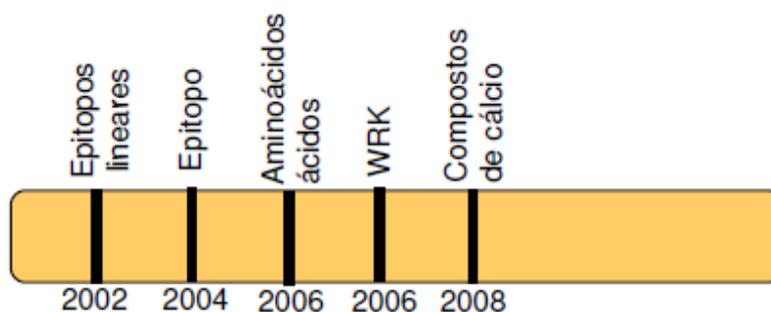


Figura 11: Evolução do estudo dos epitopos de IgE presentes nas albuminas 2S de mamona. **2002** – Vieira demonstra a presença de epitopos contínuos Ric c1 e Ric c3; **2004** – Mayerhoffer identifica 1 epitopo (Desgranulação de mastócitos); **2006** – Felix demonstra a participação de resíduos de aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e aspártico) nos 5 epitopos; **2006** – Carrielo-Gama confirma da participação do glutâmico no epitopo, com o tratamento utilizando WRK; **2008** – Oliveira inicia modificações no grupamento lateral deste aminoácido utilizando compostos de cálcio.

A sequência dos peptídeos sintéticos anteriormente utilizados para avaliar os epitopos de ligação a IgE presentes nas isoformas alergênicas de albumina 2S de mamona (Ric c 1 e Ric c 3) por Felix e colaboradores em 2008 é apresentada na tabela I abaixo. As cadeias leves de Ric c 3 e de Ric c 1 apresentam, respectivamente, um total de 35 e de 34 resíduos de aminoácidos enquanto as cadeias pesadas são compostas de 65 e de 64 resíduos de aminoácidos, respectivamente. O trabalho utilizando os peptídeos sintéticos realizado por Felix et al. em 2008 identificou quatro epitopos contínuos em Ric c 3 e dois em Ric c 1.

Tabela I: Características estruturais dos peptídeos sintéticos derivados de isoformas de albuminas 2S de mamona.

	Isoforma	Resíduos	Sequência Primária
P0	Ric c 1 (cadeia pesada)	22 ao 40	EGLRQAIEQQSQGQ
P1	Ric c 3 (cadeia leve)	1 ao 15	ESKGEREGSSSQCR
P2	Ric c 3 (cadeia leve)	16 ao 31	QEVQRKDLSSCERYLR
P3	Ric c 1 (cadeia leve)	11 ao 24	QEQQNLRQCQEYIK
P4	Ric c 3 (cadeia pesada)	30 ao 39	DECQCEAIKYIAEDQ
P5	Ric c 3 (cadeia pesada)	40 ao 54	LHGEESERVAQRAGE

Neste trabalho, Felix caracterizou cinco epitopos lineares alergênicos nas isoformas de albumina 2S, Ric c 1 e Ric c 3 de mamona. Nas sequências de todos os peptídeos identificados por Mayerhoffer em 2004 e por Felix em 2008, é possível observar a presença de pelo menos dois resíduos de aminoácidos dicarboxílicos (ácido glutâmico e/ou aspártico). Esta característica suporta a hipótese de que os grupamentos carboxílicos laterais destas cadeias podem ser importantes na interação com as moléculas de IgE.

Desta forma, Carriello-Gama em 2006, tratou as albuminas 2S, bem como os peptídeos sintéticos, identificados como epitopos ligantes de IgE por Felix em 2006 e por Mayerhoffer em 2004. Carriello-Gama utilizou o reagente Woodward's Reagent K (WRK – N-etil-5-fenilisoiazolium-3`-sulfonato) nas amostras citadas anteriormente para modificar os ácidos glutâmicos visto que, este reagente é específico para modificar este aminoácido (DUNN E ANFINSEN, 1974). Este trabalho desenvolvido por Carriello-Gama em 2006 obteve resultados satisfatórios para modificar a proteína alergênica de mamona ao nível dos ácidos glutâmicos e, foi fundamental para demonstrar a participação deste aminoácido na formação do epitopo. Sendo assim, Oliveira em 2008, iniciou os estudos a fim de utilizar outras substâncias, menos específicas, no entanto mais econômicas, que poderiam modificar o grupamento lateral deste aminoácido.

Conhecendo o envolvimento de ácidos glutâmicos na ligação à IgE, testes *in vitro* foram propostos utilizando aminoácidos livres como agente bloqueadores de IgE. Neste modelo, os experimentos empregaram o uso de aminoácidos dicarboxílicos, os quais protegeram os mastócitos de rato, já sensibilizados com IgE contra albuminas 2S de *R. communis* L. Nesses experimentos, ficou evidente que este tratamento impediu a resposta cruzada entre alérgenos de mamona e alérgenos alimentares e inalantes (patente depositada em 2005). Nesse sentido, além do desenvolvimento de agentes farmacêuticos bloqueadores na molécula de IgE, a produção de vacinas anti-alérgicas baseada nos peptídeos específicos, anteriormente descritos, poderia ser realizada de forma mais consciente através do reconhecimento dos epitopos presentes no alérgeno.

Continuando o estudo dos epitopos presentes nas albuminas 2S de mamona, em 2011, Nascimento e colaboradores analisaram as estruturas tridimensionais das principais isoformas alergênicas de mamona, Ric c 1 e c Ric c 3, pela construção de um modelo comparativo de Ric c 1 com base na estrutura de ressonância magnética nuclear (RMN) de Ric c 3. Sabendo do papel de defesa (inibição de alfa-amilases de insetos) e alérgico dessas isoformas, Nascimento analisou a estrutura tridimensional teórica, os sítios de interação com o alfa-amilase e o mapeamento de epitopos alergênicos. O estudo da estrutura das albuminas 2S de mamona é importante pois abre perspectivas biotecnológicas para a concomitante manutenção da atividade de defesa (inibição de alfa-amilase de insetos) e eliminação do potencial alergênico seja eliminada, a fim de produzir plantas resistentes a insetos e

seguras para a saúde humana. Com relação ao conhecimento da estrutura do alérgenos, este trabalho propôs importantes mutações nos resíduos de ácidos glutâmicos (epitopos de IgE) através de modelagem molecular com o objetivo de inativar os alérgenos de mamona.

Sabe-se que a mamona apresenta em suas sementes e, também no pólen proteínas alergênicas bem caracterizadas estrutural e funcionalmente que limitam, em parte, o aproveitamento da torta e podem provocar crises alérgicas aos que cultivam esta planta ou residem próximo às plantações ou indústrias de processamento da semente. Desta forma, outros vegetais podem ser potenciais fontes de proteínas alergênicas.

- Albumina 2S de pinhão-manso:

Visando melhor estudar a presença de proteínas alergênicas em pinhão-manso, Maciel e colaboradores em 2009, descrevem a presença de uma albumina 2S alergênica (12Kda), denominada Jat c 1 (Figura 12), isolada das sementes de pinhão-manso. Neste trabalho foi demonstrado a capacidade desta proteína em se ligar a moléculas de IgE pré-fixadas em mastócitos de rato por PCA (Reação de alergia tipo I *in vivo*) e, também, desencadear a liberação de histamina destas células, através de ensaio de desgranulação de mastócitos. Outra característica evidenciada por Maciel é que Jat c 1 apresentou a capacidade de forte ligação cruzada com as principais proteínas alergênicas de mamona, Ric c 1 e Ric c 3.

Jat c 1	
Cadeia leve	VRDKCGEEAERRTLXGCENYISQRR
Cadeia Pesada	PREQVPRQCCNQALE

Figura 12: Sequência parcial da albumina 2S isolada de sementes de pinhão-manso denominada Jat c 1.

Através das informações adquiridas após o trabalho de Maciel e colaboradores em 2009, a pesquisa de albuminas 2S presentes em sementes de pinhão-manso, a determinação destes alérgenos dispersos no ar, além da análise da sensibilização das pessoas frente a esse alérgeno se fazem necessária.

1.3- Alergia desencadeada por albumina 2S:

A alergia desencadeada pela albumina 2S de oleaginosas é causada principalmente pela inalação da poeira da torta, representando um problema para os trabalhadores das usinas de extração quanto para a população que habita as proximidades da fábrica (GARCÍA-GONZÁLEZ, *et al.*, 1999). Cabe salientar também que Thorpe e colaboradores em 1988 demonstraram que os alérgenos de mamona poderiam estar presentes também no pólen, uma vez que as pessoas que moravam próximo às áreas de plantio apresentavam anticorpos específicos contra estas proteínas (FREIRE *et al.*, 2007).

Além da poeira da torta, como dito anteriormente, o pólen também representa outro fator a ser considerado quando se trata de alergia desencadeada por mamona. A mamona é um vegetal que possui flores que podem ter mais de 60 mil grãos de pólen/flor que contém substâncias alergênicas, semelhantes às encontradas nas sementes. As condições para dispersão desses grãos são: temperatura de 26 °C a 29 °C e umidade relativa do ar de 60%, variando de acordo com o cultivar (BELTRÃO E AZEVEDO, 2007). A mamona apresenta longo período de floração e seu pólen pode ser encontrado em algumas estações do ano, apresentando-se com uma estrutura de tamanho médio e oval com 20 µm a 22 µm de largura e 29 µm a 33 µm de comprimento (BELTRÃO E AZEVEDO, 2007; GARCÍA-GONZÁLEZ, *et al.*, 1999).

Como descrito anteriormente, os alérgenos presentes na semente de mamona são bem conhecidos, mas observam-se poucos relatos quanto ao papel desempenhado pelos alérgenos presentes em seu pólen. Na Índia uma pesquisa desenvolvida por Singh e colaboradores em 1992 demonstrou que existe variação no perfil protéico de extratos de pólen de mamona em diferentes anos e lugares deste país. No ano de 1997, a reação cruzada e a presença de epitopos comuns entre as sementes e os extratos de pólen de mamona foram confirmadas (SINGH *et al.*, 1997). Neste mesmo ano, alguns trabalhos demonstraram a reação cruzada de pólen de mamona com pólen de outras espécies vegetais como, *Mercurialis annua* (VALLVERDU *et al.*, 1997), *Putranjiva roxburghii* (SINGH *et al.*, 1997). Em 1999, estudos desenvolvidos por Garcia-Gonzalez e colaboradores demonstraram que o pólen de mamona provoca sintomas de alergia respiratória. Nesse sentido, Parui e colaboradores em 1999 propuseram uma nova abordagem para identificação e caracterização parcial das proteínas alergênicas do pólen de *Ricinus communis* L.

No ano de 2002, Palosuo e colaboradores evidenciaram a reação cruzada entre alérgenos de mamona e outros vegetais da família Euphorbiaceae, ratificando a importância de estudos de reação cruzada como uma pesquisa diagnóstica.

As doenças alérgicas têm aumentado muito nos últimos anos e que, mais de 30% da população sofre de uma ou outra doença alérgica, tendo como principais agentes causadores grãos de pólen, esporos fúngicos, os ácaros, epitélios animais. Os trabalhos de Singh E Kumar em 2003 demonstraram, de forma quantitativa e qualitativa a prevalência de pólen na região da Índia, verificando que, além de outros aeroalérgenos, existe uma distribuição significativa de pólen de mamona nesta área. Conhecendo também que a poluição do ar tem sido descrita como um fator importante para o recente aumento na incidência de doenças respiratórias e, que o ar transporta muitos grãos de pólen, o trabalho desenvolvido por Bist e colaboradores, em 2004, observou uma variabilidade protéica do pólen de mamona antes e após a exposição a poluentes atmosféricos.

Outro recente estudo desenvolvido por Felix em 2007 demonstrou que mastócitos primeiramente sensibilizados com imunoglobulinas do tipo E anti-albuminas 2S de mamona podem sofrer desgranulação quando expostos a aeroalérgenos tais como poeira do ar, fungos e tabaco e, a componentes alergênicos presentes em diversos alimentos tais como camarão, peixe, glúten, trigo, soja, amendoim e milho. Estes estudos alertam para a importância das exposições ao pólen desta oleaginosa, indicando a cautela com relação à exposição a este antígeno para minimizar os riscos de reações cruzadas.

1.4- Processos de destoxificação e desalergenização:

Visando agregar valores a torta, produto da extração do óleo da semente, e aumentando o número de possíveis utilizações, dentre elas a alimentação animal, muitas pesquisas estão sendo realizadas em todas as partes do mundo visando eliminar fatores que impedem a sua plena utilização, como a toxina ricina e o alérgeno CB-1A.

A literatura (Perrone e colaboradores em 1966 e Kling em 1974) apresenta algumas metodologias, já testadas e patenteadas em diversos países, demonstrando a possibilidade de destoxificar a torta de mamona pelo seu cozimento. Em 1940, Pertrozyan e Ponomarev (citados por Kling, 1974) apontaram um processo de destoxificação que consistia em ferver a torta repetidamente, por

curtos períodos de tempo, com mudança de água após cada fervura. Do mesmo ano até 1942 algumas patentes foram concedidas para processos de destoxificação da torta de mamona em diferentes partes do mundo.

Em 1960, Gardner e colaboradores testaram diferentes processos para destoxificação da torta de mamona combinando diferentes temperaturas, adição de produtos químicos e outros processos, desde a adição de produtos alcalinos à fermentação aeróbia, não levando em consideração a viabilidade industrial nem econômica e tampouco as características nutricionais e a palatabilidade do produto obtido. Este foi um primeiro relato sobre a tentativa de desenvolver um método para destoxificação e, ao mesmo tempo, a desalergenização da torta de mamona, combinando diferentes temperaturas e adição de produtos químicos. As metodologias desenvolvidas por estes pesquisadores foram eficazes, mas ainda precisavam de avaliação quanto ao custo e a palatibilidade do produto obtido.

Freitas, em 1974, avaliou a destoxificação e desalergenização da torta de mamona pelo uso de radiação ionizante, concluindo que o processo foi capaz de eliminar ambos os fatores anti-nutricionais. Gandhi e colaboradores em 1994 propuseram um novo método para destoxificação que consistia na mistura da torta de mamona com a torta da planta *Shorea robusta* que também é tóxica devido ao alto teor de tanino o qual precipita a ricina.

Segundo Kling em 1974, os métodos de destoxificação referidos na literatura não possuem aplicabilidade industrial em virtude do alto custo e por prejudicarem a qualidade do produto. Um dos primeiros requisitos para que a indústria possa operar uma unidade de destoxificação e desalergenização é o desenvolvimento de métodos confiáveis e de fácil execução.

No ano de 2009, Godoy promoveu estudos experimentais das condições de cultivo do fungo *Penicillium simplicissimum* para produção de lipases em rejeito de mamona e, de forma indireta, obteve, após a fermentação em estado sólido submetida ao rejeito, um produto destoxicado, ou seja, sem a presença da ricina.

O problema da alergenicidade, em comparação com a toxidez da torta, está no fato que ela dificilmente causa a morte de animais ou seres humanos, porém a sua eliminação é bem mais difícil que a inativação da toxina. A preocupação com a alergenicidade da torta de mamona refere-se aos trabalhadores das indústrias de extração do óleo e os moradores dos arredores das indústrias ou áreas de plantio, os quais estão expostos à poeira levada pelo vento. Outro fator a ser analisado é o

risco de reações alérgicas dos trabalhadores de campo que utilizam a torta como adubo e ficam submetidos à poeira.

O primeiro relato de alergia causada em uma comunidade por uma indústria de extração de mamona foi feito no ano de 1928 em Toledo, Ohio, EUA (Estados Unidos da América). Após este caso, outros relatos foram feitos: Alemanha (1942), Figline Valdarno, Itália (1949), Tchecoslováquia (1949), Hungria (1950), Bauru, no estado de São Paulo (1953), África do Sul (1953) e outros (ICOA, 1989).

Verifica-se que, ainda não existem processos industriais viáveis de destoxificação da torta de mamona, porém em processos experimentais de pequena escala, como na área acadêmica, a destoxificação é obtida por tratamento térmico, como a autoclavagem (FREIRE *et al.*, 2007). Poucas metodologias visando à desativação dos alérgenos presentes na torta de mamona foram propostas, e nenhuma delas realmente atingiu resultados satisfatórios que possibilitasse o emprego industrial.

Em 2006, a inativação do alérgeno de mamona (CB-1A) foi descrita por KIM, pela utilização de aquecimento conjugado a tratamentos químicos (NaOH e NaOCl). Segundo o autor, o alérgeno mostrou um decréscimo drástico em sua atividade antigênica, desaparecimento de bandas na eletroforese, quando a temperatura (70°C) foi associada aos compostos químicos.

Apesar da escassez de resultados, comprovadamente promissores, com relação aos processos de inativação de alérgenos e do largo uso de terapias para o tratamento dos sintomas alérgicos, o desenvolvimento de tecnologias eficazes que reconheçam os epitopos alergênicos e inativem alérgenos, no nível dos epitopos, se fazem necessárias.

De acordo com os dados apresentados anteriormente, a necessidade de pesquisas que visam entender os mecanismos de defragração da alergia, baseadas no reconhecimento estrutural do alérgeno e sua dispersão/sensibilização são importantes.

Desta forma, a hipótese de que aminoácidos ácidos são importantes na formação do epitopos de IgE de albumina 2S de mamona foi criada. Para comprovar esta teoria propomos a utilização do bloqueio do sítio de ligação da IgE ao antígeno usando aminoácidos livres, ácido glutâmico ou ácido aspártico. Esta hipótese foi confirmada através do trabalho realizado por Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011, que demonstrou por ensaios de bloqueio *in vitro*, resultados positivos quando incubava-

se a IgE anti-albumina 2S com estes agentes bloqueadores. Sendo assim, a nova estratégia deste trabalho baseia-se na verificação da funcionalidade do bloqueio da molécula de IgE com os agentes bloqueadores em ensaios *in vivo*.

Neste sentido, uma das propostas deste trabalho é iniciar testes preliminares com animais a fim de estabelecer estratégias de imunizações que contribuam para a realização dos ensaios de bloqueio, com os aminoácidos livres anteriormente descritos. Para alcançarmos esta meta, diferentes protocolos de imunizações serão empregados com conseqüente acompanhamento da resposta imunológica dos animais.

Outra proposta deste trabalho é realizar modificações na estrutura do alérgeno a fim de promover a redução do potencial alergênico utilizando como metodologia o tratamento químico da proteína alergênica com compostos de cálcio. Além disso, este trabalho ainda se propõe a coletar material aerobiológico em regiões de cultivo de oleaginosas para verificar a presença/dispersão de alérgenos da classe das albuminas 2S pelo ar, com conseqüente sensibilização da população.

2- Objetivo Geral:

- Desenvolver métodos para a redução da alergenicidade de albuminas 2S de oleaginosas.

2.1- Objetivos Específicos:

- Modificar resíduos dos aminoácidos que compõem os epitopos de ligação a IgE da albumina 2S de mamona por tratamento químico com compostos de cálcio e verificar a redução de seu potencial alergênico;
- Quantificar os níveis de albuminas 2S dispersos no ar em regiões de plantio de oleaginosas;
- Estabelecer condições de imunizações em modelos animais que permitam a realização de ensaios *in vivo* com os aminoácidos livres propostos como agentes bloqueadores de IgE;

3- Materiais e Métodos:

3.1- Obtenção de albumina 2S de sementes:

As albuminas 2S foram extraídas de sementes de *Ricinus communis* L. cultivar IAC-226 e de sementes de pinhão-manso (*J. curcas* L.) segundo a metodologia descrita por Thorpe *et al.* (1988), com adaptações propostas por Felix e colaboradores, em 2008. O “pool” de albumina 2S das sementes após as etapas de extração foi obtido por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-50). Utilizou-se como fase móvel ácido trifluoracético (TFA) 0,1% num fluxo de 1,0 mL/min e, frações de 1 mL foram coletadas e detectadas a 280 nm no espectrofotômetro (T70 UV/VIS Spectrometer PG Instruments Ltd).

O material proveniente da cromatografia de exclusão molecular foi purificado por cromatografia de fase reversa em coluna C18, sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) da Shimadzu®, modelo LC-10AD (estação de trabalho “Class-LC10”). A cromatografia foi desenvolvida num fluxo de 0,7 mL/min, usando TFA 0,1% como solvente A e acetonitrila 80% contendo TFA a 0,1% como solvente B, com gradiente de eluição foi de 0-80% de solvente B durante 55 min. O perfil de eluição foi monitorado por medição da absorvância a 220 nm. Os espectros de UV (ultravioleta) foram obtidos utilizando um foto-diodo detector e as frações que continham os principais picos foram secas num sistema speed-Vac. As proteínas deste material foram determinadas pelo método do ácido bicinrônínico (BCA) (SMITH *et al.*, 1985) e foram acumuladas, liofilizadas e guardadas a -20°C, em pequenas alíquotas para posteriores análises.

3.2- Produção de soros anti-albumina 2S:

O soro policlonal de rato anti-albumina 2S de mamona ou de pinhão-manso foi produzido na Universidade Federal Fluminense, em colaboração com o professor Dr. Maurício Afonso Verícimo segundo metodologia descrita por Felix e colaboradores em 2008. Para tanto, 10 ratos RA/Thor foram imunizados por injeção intraperitoneal de 0.5 mL de salina contendo 0,01 mg do “pool” de albumina 2S e 5,0 mg de hidróxido de alumínio. Um mês, após a 1ª imunização, os animais receberam uma dose reforço de antígeno. Neste caso, a mesma quantidade do antígeno foi misturada com 2.5 mg de hidróxido de alumínio. Os animais foram anestesiados e sangrados, por punção cardíaca, 7 dias após o reforço, volumes de

soro iguais de cada animal foram recolhidos, reunidos e guardados em alíquotas de 0,1 mL. Essas alíquotas representam o “pool” de IgE anti-albumina 2S.

Os soros policlonais de coelho anti-albumina 2S de mamona e de pinhão-manso foram produzidos na própria UENF, utilizando coelho macho adquirido comercialmente e mantido no biotério desta universidade. Para cada um dos antígenos, o animal foi submetido a inoculações pela via intramuscular contendo 100 µg do antígeno (albumina 2S) na presença de adjuvante completo de Freund (Sigma Immuno Chemicals F-5881) e, doses de reforço, contendo a proteína emulsificada em adjuvante incompleto de Freund, foram realizadas com intervalos de 30 dias. Pequenas alíquotas de sangue foram coletadas para avaliação do título do soro após cada dose de reforço.

Os soros anti-albumina 2S produzidos nos coelhos foram retirados após os mesmos se encontrarem em altos títulos após as doses de reforço. Maiores volumes de sangue foram obtidos por punção cardíaca, seguida de sacrifício dos animais. Para a realização da punção cardíaca o animal foi anestesiado com cloridrato de cetamina 10% (Syntec), cloridrato de xilozina 2% (Syntec) e aceprom 1% (Univet) segundo normas éticas, no Hospital Veterinário da UENF. Os soros contendo anticorpos específicos contra albuminas 2S foram guardados a -20 °C para análises posteriores quanto a sua especificidade.

3.3- Tratamento químico utilizando compostos de cálcio:

Para modificar aminoácidos presentes nos epitopos da albumina 2S de mamona utilizamos como estratégia o tratamento químico com diferentes soluções de compostos de cálcio. Este tratamento consistiu da adição de 100 µL de diferentes soluções dos compostos (hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio ou óxido de cálcio) nas concentrações de 4 e de 8% a 100 µL de “pool” de albumina 2S (1mg/mL) ou a 100 µL de amostras de solução de torta de mamona (0,3 g/mL). O meio reacional (200 µL) foi deixado sob agitação por 12 horas, a temperatura ambiente, figura 13. A torta de mamona utilizada nos experimentos foi cedida pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária).

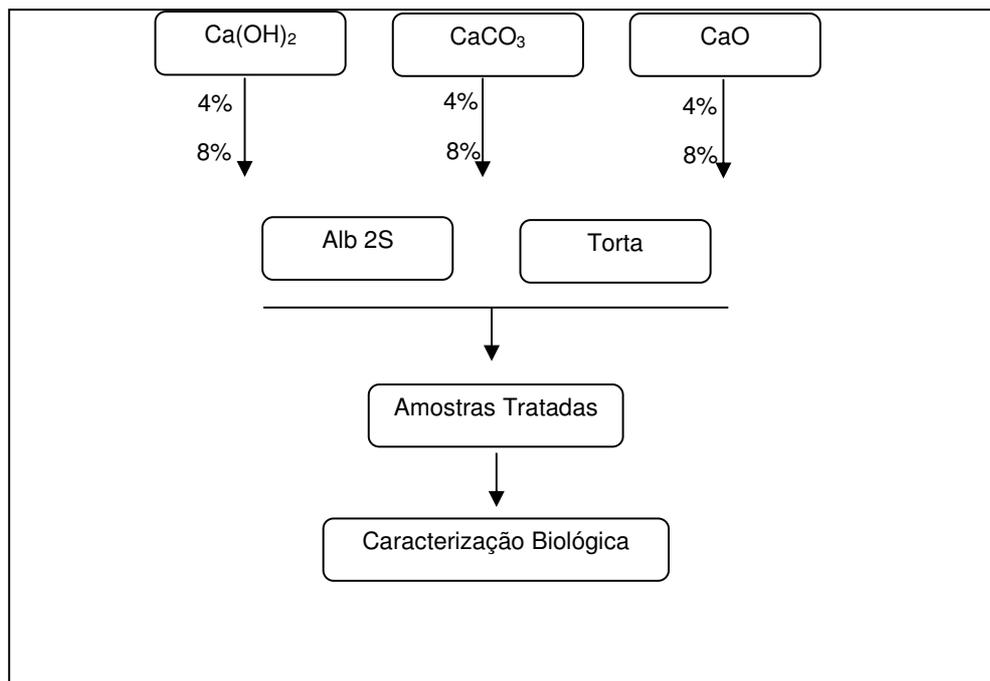


Figura 13: Fluxograma do tratamento proposto para desativar epitopos alergênicos de albumina 2S de mamona utilizando diferentes compostos de cálcio.

3.4- Avaliação das alterações promovidas pelo tratamento:

- Cromatografia de fase reversa:

A avaliação das modificações químicas promovidas na proteína pelo tratamento com os compostos do cálcio foi, primeiramente, monitorada por cromatografia de fase reversa (C18 - HPLC - RP).

Todas as amostras tratadas e não-tratadas foram analisadas por cromatografia de fase reversa em coluna C18, sistema HPLC da Shimadzu, modelo LC-10AD (estação de trabalho "Class-LC10"). O meio reacional sem as amostras também foi aplicado na coluna C-18, como branco de reação, e eluídos nos respectivos gradientes. Para eluição foi empregado um gradiente de hidrofobicidade formado por (TFA) 0,1% (solução A). Acetonitrila 80% contendo TFA 0,1% (solução B). O fluxo de eluição empregado foi de 0,7 mL/min. O gradiente utilizado foi: 10 minutos de solução A; de 0 a 80% de solução B de 10 a 40 minutos; nos 5 minutos finais com solução A.

- Espectrometria de massas:

Como avaliação complementar das alterações promovidas pelo tratamento com compostos de cálcio no alérgeno utilizamos análises por espectroscopia de massa. Alterações desencadeadas na estrutura da albumina 2S de mamona tratada com óxido de cálcio foram monitoradas utilizando o aparelho Synapt G2-S MS da Waters.

3.5- Caracterização biológica – Avaliação da alergenicidade:

Para analisar as propriedades alergênicas das amostras após o tratamento químico empregamos ensaio de desgranulação de mastócitos obtidos de lavado peritoneal de rato, o qual foi avaliado por análise da morfologia celular por microscopia óptica, segundo metodologia descrita por Felix *et al.*, 2008. Todos os experimentos com animais (protocolo nº112) foram aprovados e autorizados pelo CEUA/UENF (Comissão de Ética de Uso Animal/Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro) anexo 1.

3.5.1 – Obtenção dos mastócitos de rato:

Ratos da linhagem Wistar (não imunizados), de aproximadamente 250 g cada foram empregados como fonte de mastócitos. Três ratos foram sacrificados, um de cada vez, por asfixia em CO₂ e, posteriormente submetidos a uma incisão na cavidade peritoneal, de aproximadamente 5 cm. Nesta abertura, foram inseridos 20 mL de meio de cultura DMEM (meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco) contendo 12 U.I./ mL de heparina para realizar a lavagem. O conteúdo recolhido do primeiro rato foi utilizado para realizar a lavagem do segundo e assim sucessivamente, objetivando enriquecer o conteúdo do lavado com mastócitos. O lavado obtido dos animais foi retirado da cavidade peritoneal com o auxílio de uma pipeta Pasteur e armazenado em tubo cônico tipo Falcon.

O conteúdo final recolhido do peritônio dos ratos, aproximadamente 15 mL, foi transferido para uma placa de Petri, permanecendo por 30 minutos em estufa à 37°C, visando separar os mastócitos de outras células aderentes. Após esse período de tempo, 2/3 do meio de cultura foi retirado cuidadosamente da superfície da placa com auxílio da pipeta Pasteur e descartado. O líquido remanescente (cerca de 4 - 5 mL) contendo os mastócitos foi transferido para um tubo cônico tipo Falcon e essa

suspensão final de células não-aderentes, dividida em alíquotas de 100 μL , para posterior sensibilização.

3.5.2 – Ensaios de desgranulação de mastócitos:

Avaliamos a ativação dos mastócitos mediada ou não por imunoglobulinas. As alíquotas de 100 μL da preparação enriquecida em mastócitos foram submetidas ao tratamento com 1 μL de soro total anti-albumina 2S de rato e com 10 μL de cada uma das amostras (albumina 2S nativa, albumina 2S tratada, torta nativa, torta tratada) a serem testadas, ajustadas para a concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A mistura foi incubada por 1 hora a 37 °C. Nos controles de ativação inespecífica, o soro foi omitido do ensaio. Para a avaliação da desgranulação, uma alíquota de 10 μL foi utilizada para a contagem de mastócitos na câmara de Neubauer por microscopia óptica.

Para a detecção do percentual de desgranulação em todos os testes realizados, o “pool” dos soros contendo IgE anti-albumina 2S obtido após imunização de ratos RA/Thor foi diluído a uma proporção de 1:100 na suspensão de células. As amostras testes foram diluídas em água destilada para que se tivesse 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ na mesma solução. Esta mistura foi incubada por 1 hora na estufa de cultura de células a 37° C e, a desgranulação dos mastócitos foi avaliada por microscopia óptica (Felix *et al.*, 2008).

3.5.2.1 - Microscopia óptica:

A suspensão de células contendo os mastócitos (10 μL), após os diversos tipos de incubação descritas anteriormente no item 3.5.2, foram misturadas e incubadas durante 15 minutos com 10 μL de solução contendo 0,1% de azul de toluidina, 10% de formaldeído e 1% de ácido acético, pH 2,8 para evidenciar a desgranulação. A contagem diferencial dos mastócitos, íntegros e desgranulados, foi realizada em câmara de Neubauer, nos quatro quadrantes, sendo visualizados em microscopia de contraste de interferência diferencial de Normarski (DIC) utilizando o microscópio óptico Zeiss Axioplan.

Como controle negativo de sensibilização induzida, mastócitos sem tratamento prévio foram também incubados com o corante nas condições citadas e, observados ao microscópio óptico. Tal contagem de células desgranuladas permitiu uma avaliação do procedimento de obtenção. Cada experimento foi feito em

duplicata e, foram empregados mastócitos obtidos do “pool” dos três animais. Os gráficos apresentando os resultados dos ensaios de desgranulação foram construídos utilizando o programa GraphPad Prism 4.

Para verificar as mudanças morfológicas sofridas pelas células ao serem incubadas com albumina 2S de mamona na presença do “pool” dos soros contendo IgE anti-albumina 2S ao longo do tempo, os mastócitos do lavado peritoneal de rato expostos ao alérgeno de mamona foram incubados em diferentes tempos, variando de 0 a 1 hora. Transcorrido o tempo de cada amostra, as células foram coradas por azul de toluidina, como descrito anteriormente e, observadas através do microscópio óptico acoplado a uma filmadora para a captura das imagens.

3.6- Caracterização biológica – Avaliação da toxicidade:

Para analisar as propriedades tóxicas da ricina presente nas amostras de torta de mamona submetidas ao tratamento com os compostos de cálcio empregamos ensaios biológicos realizado em colaboração com professor Dr. Edésio José Tenório do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) da UENF.

A extração das proteínas a partir das amostras de torta de mamona tratadas e in natura foram feitas utilizando tampão PBS pH 7,0 na proporção 1:4 (1 g de torta para 4 mL de tampão). A mistura foi mantida em agitação durante 3 horas em temperatura ambiente e em seguida submetidas à centrifugação a 14.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante contendo o extrato protéico bruto foi coletado. A dosagens de proteínas totais foi feita pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como padrão um curva de ovalbumina 1mg/mL.

Células Vero (células de rim do macaco - *Chlorocebus sabaues*) foram desprendidas de uma garrafa de 25 cm² (TPP / 90025) contendo uma cultura em monocamada, utilizando uma solução de tripsina (tripsina 0.5 mg/ml + EDTA 0.2 mg/ml), durante 5 minutos à 37°C. As células foram resuspendidas em meio de cultura (DMEM + 5% de soro fetal bovino) e, esta suspensão foi dividida em uma placa de 24 poços, na proporção de 2,0 x 10⁴ células por poço. A cultura em placa foi mantida à 37 °C por 48 horas antes do uso.

As amostras (50 µg/mL) foram esterilizadas por passagem através de um filtro de 0,22 µm (TPP/99722) e, em seguida, incubada às células e, testada em triplicata. A concentração inicial de células foi de 1,6 x 10⁵ células/poço e, utilizamos a

incubação das células com PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7,0 como controle negativo ou, com 2% de Triton X-100 como controle positivo.

Para determinar a toxicidade das amostras, realizamos a contagem das células, viáveis (aderidas) ou não-viáveis (desprendidas), com uma ampliação de 40X e, confirmação da morte celular por dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH) por meio do kit de detecção (Roche - Alemanha) após 24 e 48 h de incubação. O sobrenadante da cultura de células (100 uL) foi colocado em cada poço de uma placa de 96 poços, seguindo-se a adição de 100 uL da solução de detecção de LDH e, posteriormente, incubamos na ausência de luz durante 30 min à temperatura ambiente. O produto de cor foi mensurado utilizando um leitor de placas (Thermo Plate) a 490 nm. A citotoxicidade mediada por cada uma das amostras foi calculada seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

3.7- Coleta de material aerobiológico:

O material aerobiológico foi coletado através do sistema de coleta de material particulado para pequenos volumes – MicroVol. A coleta de material particulado foi conduzida utilizando um aparato de madeira de 1,5 metros de altura como suporte para a parte do aparelho (Figura 14) onde são colocados os filtros e um gerador a gasolina como fonte elétrica para funcionamento da bomba do aparelho. O papel de filtro foi inserido na seção inferior do aparelho de coleta.



Figura 14: Aparelho de coleta de ar - Eight Stage Non-Viable Impactor.

As amostras foram coletadas por seis horas durante cinco dias, totalizando 30 horas de coleta de material aéreo. Foram realizados dois tipos de coleta de material aéreo, na ausência de floração (sem inflorescência) e na presença de floração (com inflorescência). O papel de filtro obtido após as coletas foi mantido sob refrigeração (4 °C) até análises futuras quanto ao teor de proteínas alergênicas.

3.7.1- Área Experimental:

A coleta foi realizada na Fazenda Experimental do INCAPER/ES (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural) da cidade de Viana, município localizado no estado do Espírito Santo a 225 Km de distância da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ.

Nesta fazenda existe uma plantação de pinhão-manso que foi utilizada como fonte de aeroalérgenos provenientes deste vegetal. Realizamos colaborações com o supervisor Antônio Müller Neto (Técnico Agrícola e Auxiliar de Pesquisa) e com o Prof. Márcio Adonis Miranda da Rocha (Engenheiro Agrônomo) deste instituto que nos possibilitaram a realização da instalação dos equipamentos necessários a coleta, além do auxílio para realização das mesmas.

A figura 15 abaixo apresenta todo o sistema que foi montado na área de coleta de material de pinhão-manso na cidade de Viana.

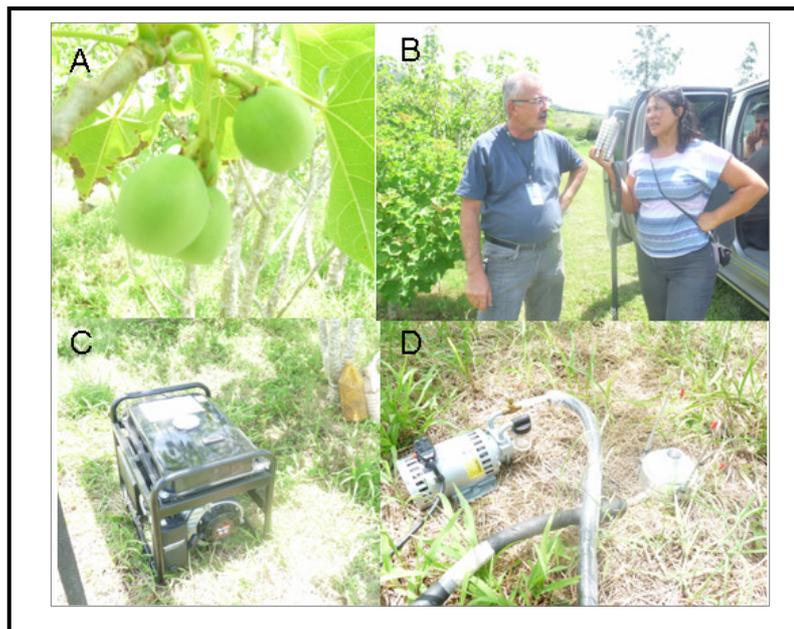


Figura 15: Características encontradas no primeiro dia da coleta de material particulado na plantação de pinhão-manso. (A): Frutos de pinhão-manso; (B): Prof. Márcio Adonis e Prof. Olga Machado; (C) Gerador a gasolina; (D): Sistema de coleta montado: à esquerda, bomba de vácuo e, à direita, aparato do papel de filtro.

3.7.2- Determinação de proteínas alergênicas retidas nos filtros:

A quantificação dos teores de albuminas 2S de pinhão-manso presentes no filtro coletado na plantação de pinhão-manso foi realizada em sistema ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), utilizando anticorpos policlonais, obtidos

em coelhos, como descritos no item 3.2. Para obtermos a amostra proteica proveniente dos filtros de papel, diversas técnicas de extração foram avaliadas para padronizarmos a capacidade extrairte de cada solvente.

3.7.2.1- Padronização da extração:

Realizamos ensaio com diferentes solventes como agentes extrairte para padronizarmos a extração e, posterior detecção de proteína retida neste material. Cada parte do papel de filtro, com área de 4 cm², foi incubada em diferentes condições, na presença de 500 µL de solução de albumina 2S de sementes de mamona (100 pg/µL) ou numa solução de água sem proteína e mantidos sob agitação por 2 horas.

Após a incubação, os papéis foram retirados das respectivas soluções e colocados para secar em estufa a 37 °C por 20 horas. Após a secagem os filtros foram embebidos com 800 µL dos diferentes solventes para extração proteica num banho-maria a 40 °C com intervalos de sonicação (de 4 em 4 horas por dez minutos). Utilizamos água (E1), tampão carbonato/bicarbonato (E2) e tampão fosfato de sódio (E3), como agentes extrairtes de acordo com o modelo experimental apresentado na figura 16 abaixo. O teor proteico foi avaliado tanto no líquido obtido após a retirada do papel para secagem, denominado sobrenadante (S), quanto nos solventes obtidos após a extração dos filtros, denominado retido no filtro (F). Estas avaliações foram feitas para quantificarmos a eficiência de cada solvente utilizado para extração.

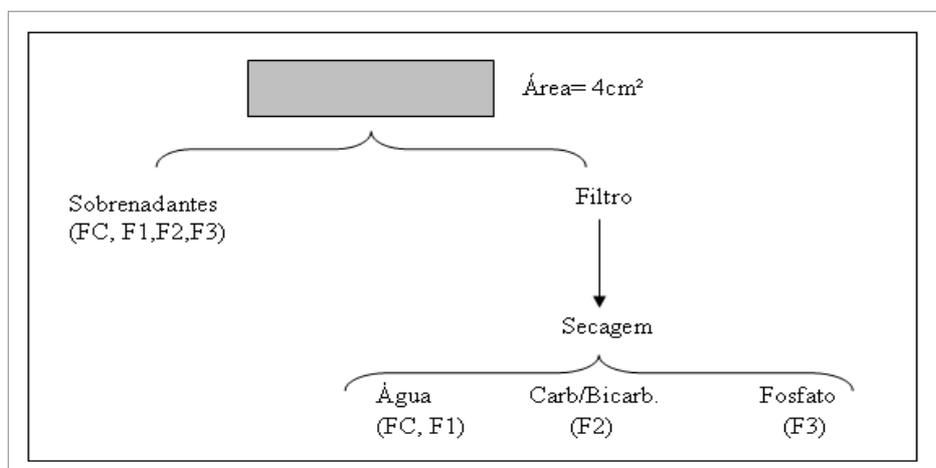


Figura 16: Modelo experimental de padronização da extração de proteína dos filtros de coleta.

3.7.2.2- Quantificação de albumina 2S:

Para avaliação dos diferentes solventes testados realizamos imunoenensaio (ELISA), no qual utilizamos soro contendo anti-albumina 2S de mamona produzido em coelho como anticorpo primário (1:500) e, anti-IgG de coelho acoplado a peroxidase como anticorpo secundário (1:2000). A microplaca foi sensibilizada (18 horas, a 4°C) com 100 µL de cada amostra (sobrenadantes ou filtros) proveniente das etapas de padronização da extração de proteínas do papel de filtro.

Para o ensaio utilizamos como controle positivo 1 ug de albumina 2S diluído em 100 uL de tampão carbonato/bicarbonato 0,05M, pH 9,6. Realizamos também alguns controles do experimento, o branco da amostra (Br1= proteína+revelação) para verificarmos se a própria amostra possui atividade peroxidásica intrínseca e, o branco do tampão (Br2= tampão carbonato/bicarbonato+anticorpos+revelação) para avaliarmos o tampão que estávamos utilizando para diluir nossas amostras.

As etapas gerais para realização do ELISA são as seguintes: sensibilização da microplaca (Nunc MaxiSorp®) com 1µg/100 uL da amostra por 18 horas, a 4°C. Após esse tempo, a placa foi lavada duas vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (300 µL/poço durante 1 hora). Em seguida, foram adicionados 300 uL de tampão bloqueador (gelatina 1% em PBS contendo Tween 20), permanecendo na placa por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse tempo de bloqueio, a placa foi novamente lavada com PBS contendo Tween 0,05% (300 µL/poço durante 1 hora), e foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo primário (soro) durante duas horas à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi novamente lavada com PBS contendo Tween, por três vezes de 5 minutos e, em seguida, foi incubada com o anticorpo secundário, por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi lavada com PBS contendo Tween, por três vezes de 5 minutos.

A revelação foi feita com 50 µL da solução de revelação (10 mg de OPD; 10 uL de H₂O₂ 30%; 6,5 mL de ácido cítrico 0,1 M; 7,0 mL de fosfato de sódio 0,2 M e 9,0 mL de H₂O destilada). A reação foi interrompida adicionando 50 µL de H₂SO₄ por poço. A leitura da microplaca foi realizada a 492 nm.

3.8- Determinação de proteínas alergênicas na inflorescência:

Amostras de inflorescência de pinhão-manso ainda fechadas ou inflorescência com flores abertas foram obtidas da mesma plantação onde as

amostras aerobiológicas imobilizadas em filtros de papel foram coletadas. As inflorescências foram mantidas a -20°C até posteriores análises.

As inflorescências de pinhão-mansão foram primeiramente submetidas a técnica de extração proteica descrita no item 3.1. Posteriormente, realizamos uma cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephadex G-50) visando separar as frações proteicas presentes neste material.

A quantificação de proteínas totais em cada fração obtida da cromatografia líquida de exclusão molecular foi realizada pelo método do ácido bicinchrônico (BCA) (SMITH *et al.*, 1985).

Para determinar a presença de proteínas alergênicas da classe das albuminas 2S nas frações obtidas após extração das inflorescências, as mesmas foram submetidas a uma eletroforese em gel SDS-PAGE a 15% (LAEMMILI, 1970). Terminada a corrida eletroforética mergulhou-se o gel na solução de azul-brilhante de coomassie para coloração de géis, permanecendo nesta por 30 min ou até o aparecimento das bandas. O fundo do gel (“background”) foi descorado utilizando a solução descorante (Metanol 450 mL, Ácido acético glacial 100 mL e Água Milli-Q 450 mL). O gel também foi corado por prata (0,1% de nitrato de prata - AgNO_3).

Para comprovar a presença de albuminas 2S no material extraído das inflorescências de pinhão-mansão ensaios específicos foram realizados, dot-blotting e ensaio de ELISA como descrito no item 3.7.2.2. O dot-blotting foi realizado utilizando membrana de nitrocelulose dividida em partes de 2x2 cm, e disposta numa placa de 24 poços onde adicionou-se, em cada poço, 2 μL de uma solução de PBS-T (PBS Tween-20 a 0,05% pH 7,6) e extrato da inflorescência numa concentração de 10 μg de proteína/poço. Os sítios livres de ligação de proteínas presentes foram bloqueados pela adição de 300 μL do tampão (PBS pH 7,6 com 2% de caseína) por 2 horas. Posteriormente ao bloqueio, cada poço foi incubado com o anticorpo primário anti-albumina 2S de pinhão-mansão produzido em coelho diluído em PBS-T (1:500) por 2 horas. Em seguida, acrescentou-se as membranas o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho) diluído em PBS-T (1:2000) por 1 hora. Cada uma das etapas apresentadas anteriormente são intercaladas por lavagens com PBS pH 7,6. Revelou-se a membrana numa solução de DAB (3,3'-Diaminobenzidina – Sigma), Imidazol (0,1M), tampão Tris/HCl (2M) pH 7,5 e peróxido de hidrogênio a 30% por 15 minutos, ao abrigo da luz. Na leitura foram considerados positivos todos aqueles soros que desenvolveram uma reação de cor, fraca ou forte.

3.9- Protocolos de imunizações:

Os testes *in vivo* propostos neste trabalho foram iniciados através das etapas de imunizações em colaboração com a professora Dra. Elena Lassunskaia do Laboratório de Biologia do Reconhecer da UENF. Para realizarmos o tratamento *in vivo* com os agentes bloqueadores propostos no trabalho de Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011 iniciamos testes para verificar a resposta imunológica dos animais a albumina 2S de mamona.

Três diferentes de protocolos de imunização pela via intraperitoneal (IP) foram aplicados no mesmo modelo animal, Balb/c (3 fêmeas de 5 a 6 semanas). Sabendo que a escolha da linhagem para estudos com sensibilização a um alérgeno é importante, estes testes foram realizados com camundongos do tipo BALB/c, linhagem mais utilizada em estudos de asma e, também bons produtores de anticorpos IgE contra ovalbumina (OVA). Além disso, camundongos BALB/c produzem maiores concentrações de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5) no lavado broncoalveolar, quando comparados, por exemplo, com animais da linhagem C57BL/6 (KUMAR *et al.*, 2008).

Um dos protocolos empregados consistiu de imunizações de animais (3 fêmeas de 5 a 6 semanas) com 50 μ g de albumina 2S de mamona na presença de adjuvante (2,0 mg de hidróxido de alumínio) de acordo com o protocolo experimental apresentado na figura 17 abaixo. O dia zero representa o primeiro dia da imunização, sendo seguido de uma dose de reforço 15 dias após a primeira dose.

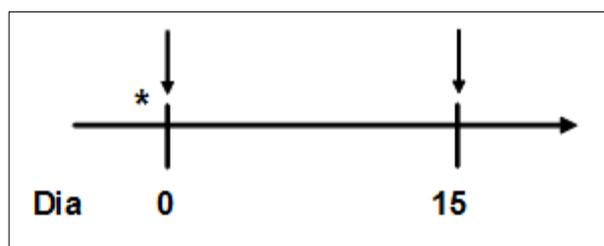


Figura 17: Cronograma do protocolo experimental número 1 de imunização. As setas representam as imunizações e os asteriscos as coletas de sangue.

Outro protocolo de imunização empregado seguiu a imunização de camundongos Balb/c (3 fêmeas de 5 a 6 semanas) com 10 μ g de alérgeno purificado na presença de 5,0 mg de hidróxido de alumínio/inoculação em intervalos, como mostra o modelo experimental, figura 18, apresentado abaixo:

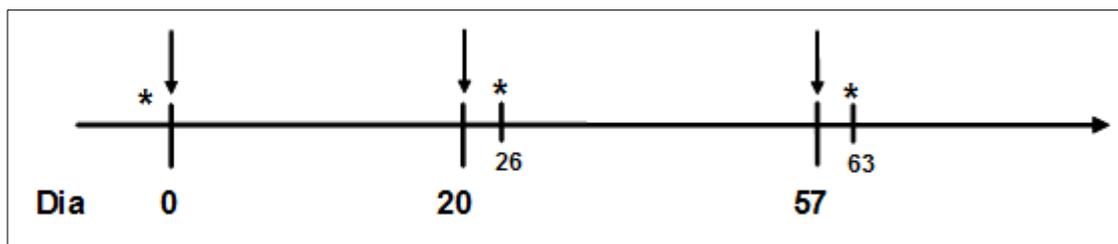


Figura 18: Cronograma do protocolo experimental número 2 de imunização. As setas representam as imunizações e os asteriscos as coletas de sangue.

Outra estratégia de imunização dos camundongos empregada neste trabalho consistiu em imunizar camundongos com doses de 0,01 μg , 0,1 μg ou 1,0 μg de albumina 2S de mamona na presença de 4,0 mg de hidróxido de alumínio como adjuvante. Neste protocolo (Figura 19) realizamos cinco imunizações em intervalos de 14 dias, com coleta de sangue após cada inoculação, com intervalos de 7 dias, ou seja, numa semana imunizávamos e na outra semana realizávamos a coleta de sangue para acompanharmos a resposta desses camundongos ao antígeno.

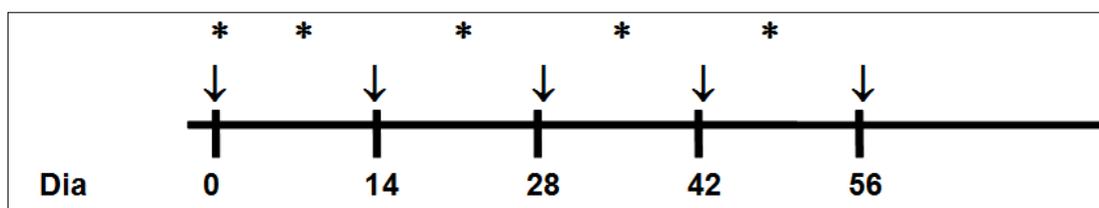


Figura 19: Cronograma do protocolo experimental número 3 de imunização. As setas representam as imunizações e os asteriscos as coletas de sangue.

Neste terceiro protocolo de imunização, utilizamos 5 camundongos/grupo, de acordo com a tabela II apresentada abaixo. Inoculações, somente com tampão fosfato salino (PBS), tratamento denominado T0, foram utilizadas como controle negativo. Os animais dos outros tratamentos, T1, T2 e T3, receberam inoculações contendo doses de proteína na presença de hidróxido de alumínio como adjuvante.

Tabela II: Diferentes inoculações empregadas nos grupos de animais submetidos ao terceiro protocolo de imunização.

TRATAMENTO	INÓCULO (200 μg /inoculação)
T0 (1 grupo = 5 animais)	PBS (Phosphate Buffered Saline)
T1 (3 grupos = 15 animais)	0,01 μg de proteína + 4,0 de $\text{Al}(\text{OH})_3$
T2 (3 grupos = 15 animais)	0,1 μg de proteína + 4,0 de $\text{Al}(\text{OH})_3$
T3 (3 grupos = 15 animais)	1,0 μg de proteína + 4,0 de $\text{Al}(\text{OH})_3$

Em todos os protocolos descritos acima as amostras de sangue foram coletadas por sangria pelo plexo retro-orbital de cada animal antes da primeira imunização (pré-imune) e, após imunizações de acordo com cada protocolo empregado, seguindo cada cronograma. Os soros provenientes de cada animal foram obtidos após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos a 4 °C e, posteriormente guardados a -20 °C para testes quanto a resposta humoral dos animais imunizados. Após o período previsto de cada protocolo experimental os animais foram sacrificados em câmara de gás (CO₂) e, posteriormente, descartados.

3.9.1- Resposta imunológica no modelo animal:

A resposta humoral inicial dos camundongos imunizados foi verificada nos soros coletados através da dosagem do título de IgG/IgM anti-albumina 2S de mamona por ELISA (protocolo geral apresentado anteriormente no item 3.7.2.2). Esta dosagem foi utilizada para demonstrar se os animais imunizados foram ou não estimulados para a produção de anticorpos específicos ao longo do experimento.

Posteriormente, para verificar o padrão de resposta humoral induzido por linfócito T auxiliares (helper), Th1 ou Th2, o soro dos animais imunizados com o antígeno, foram testados por ELISA utilizando como anticorpos (anti-mouse) secundários anti- IgG2a, imunoglobulina secretada num padrão Th1, ou anti-IgG1 ou anti-IgE, imunoglobulinas características de padrão Th2.

Visando separar a IgE da IgG específica presente nos soros produzidos nos camundongos imunizados, este material foi submetido a imunoadsorção - cromatografia de afinidade em batelada utilizando proteína A-agarose 6MB (Sigma P1925). A resina possui, segundo o fabricante, uma capacidade de ligação de IgG de aproximadamente 6 mg/mL.

Primeiramente, a resina agarose 6MB foi equilibrada numa proporção de 1:1 com o tampão A (Fosfato de sódio monobásico 0,2M e Cloreto de sódio 0,15M). Após esta etapa, 100 µL da resina foi incubada com 100 µL do soro obtido dos animais imunizados contra albumina 2S sob agitação manual por 1 hora a temperatura ambiente no tampão A. Posteriormente a esta etapa, a suspensão foi deixada em repouso por 30 minutos a fim de sedimentar a proteína A adsorvida da IgG. O sobrenadante rico em outras imunoglobulinas, fração não-ligada, foi obtido após a etapa de sedimentação espontânea e guardado para análises futuras.

Após a retirada do sobrenadante, a resina foi lavada com 1 mL de tampão A. Para desligarmos IgG adsorvidos na resina, a mesma foi incubada com o tampão B pH 6,0 (Fosfato de sódio Dibásico 0,2M, Ácido cítrico 0,1M e Água deionizada) sob agitação por 10 minutos, seguido de repouso para decantar a resina. O eluído desta etapa, fração ligada, foi coletado e guardado para análises futuras. A presença de IgE total e específica no material adsorvido na resina, fração ligada (teoricamente rico em IgG), e no sobrenadante, fração não-ligada (teoricamente rico em IgE) foi detectada por ensaios de ELISA.

3.9.2- Ensaios de bloqueio com aminoácidos livres:

O soro imune dos animais, contendo anticorpos específicos anti-albumina 2S de mamona, foi incubado com agentes bloqueadores a fim de verificar a ação bloqueadora destes compostos. Utilizamos nos ensaios de bloqueio soluções nas concentrações de 10 µg/mL de cada um dos oito aminoácidos livres descritos: L-ácido glutâmico (E), de L-ácido aspártico (D), pool de L-aminoácido (com exceção de ácido glutâmico, de ácido aspártico e de asparagina) (Pool) ou, de cinco ácidos glutâmicos modificados como apresentado na tabela III abaixo (Sigma-Aldrich). Cada um dos aminoácidos livres citados para os ensaios de bloqueio foram incubados na presença de soro imune dos camundongos imunizados (1:5000) contra albumina 2S de mamona por 15 minutos, na proporção de 1:10 (aminoácido:soro).

Para realização do ELISA a microplaca foi sensibilizada com 0,2 µg/µL de albumina 2S de mamona e, posteriormente, incubada na presença dos respectivos soros previamente bloqueados (anticorpos primários). A fim de avaliarmos o bloqueio da IgG1 pelos aminoácidos livres utilizamos como anticorpo secundário anti-IgG1 de camundongo HRP (1:5000).

Tabela III: Relação de ácidos glutâmicos modificados utilizados nos ensaios de bloqueio.

Ácidos glutâmicos Modificados	Sigla	Fórmula Estrutural	Massa Molecular
D- ácido glutâmico	E1		147.13
N-metil-L-ácido glutâmico	E2		161.16
N-acetil-L- ácido glutâmico	E3		189.17
N-(4-nitrobenzoi)-L-ácido glutâmico Hemihidratado	E4		305.24
N-carbamil-L- ácido glutâmico	E5		190.15

4- Resultados:

4.1- Purificação de albuminas 2S de sementes:

A cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephadex G-50) foi utilizada como primeira etapa para separar a fração rica em albuminas 2S das outras frações proteicas presentes nas sementes das oleaginosas estudadas neste projeto. O perfil cromatográfico para o extrato bruto obtido de sementes de *R. communis* (Figura 20A) apresentou três picos bem singulares entre si, denominados F1, F2 e F3. Três frações (F1, F2 e F3) também foram separadas no perfil cromatográfico para o extrato bruto de sementes de *Jatropha curcas* (Figura 20B).

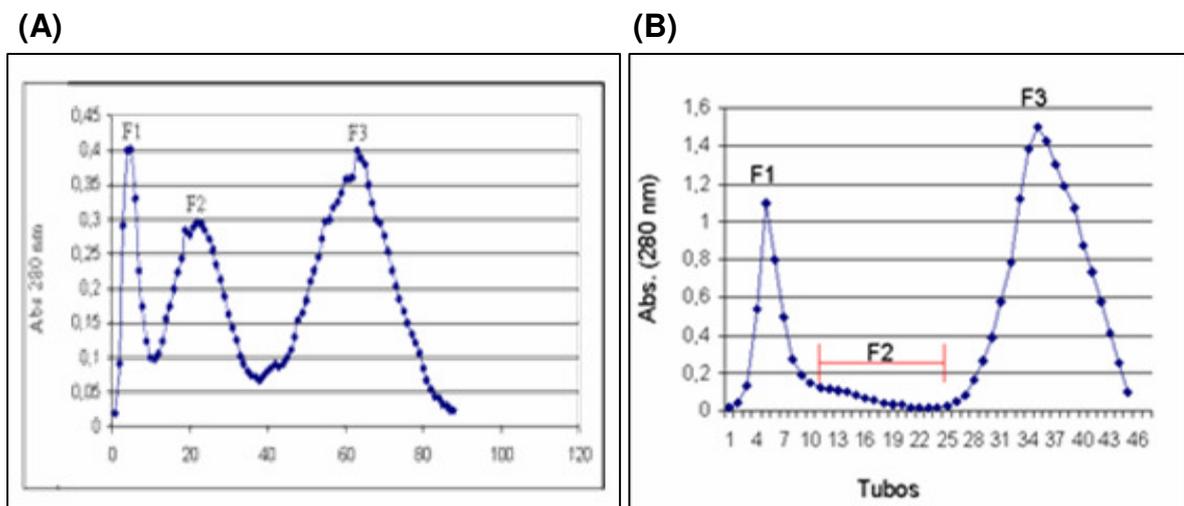


Figura 20: Perfil cromatográfico da cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephadex G-50) do extrato bruto de sementes de mamona (A) e de sementes de pinhão-manso (B). Eluente: Ácido Trifluoroacético 0,1%; Fluxo: 1mL/min. F1: Fração de alto peso molecular; F2: Fração de intermediário peso molecular; F3: Fração de baixo peso molecular.

Das frações proteicas obtidas da cromatografia das sementes, a fração F2, região prevista o perfil cromatográfico das albuminas 2S com massa molecular (10 a 12 KDa), foi agrupada e posteriormente submetida a etapa de purificação.

A purificação das frações F2 obtidas a partir da cromatografia líquida de exclusão molecular realizada a partir de extratos brutos de sementes de mamona e pinhão-manso foi realizada utilizando a cromatografia de fase reversa em coluna C18, sistema HPLC. O perfil cromatográfico desta etapa de purificação encontra-se representado pela figura 21A, para albumina 2S de mamona e, na figura 21B para albumina 2S de pinhão-manso.

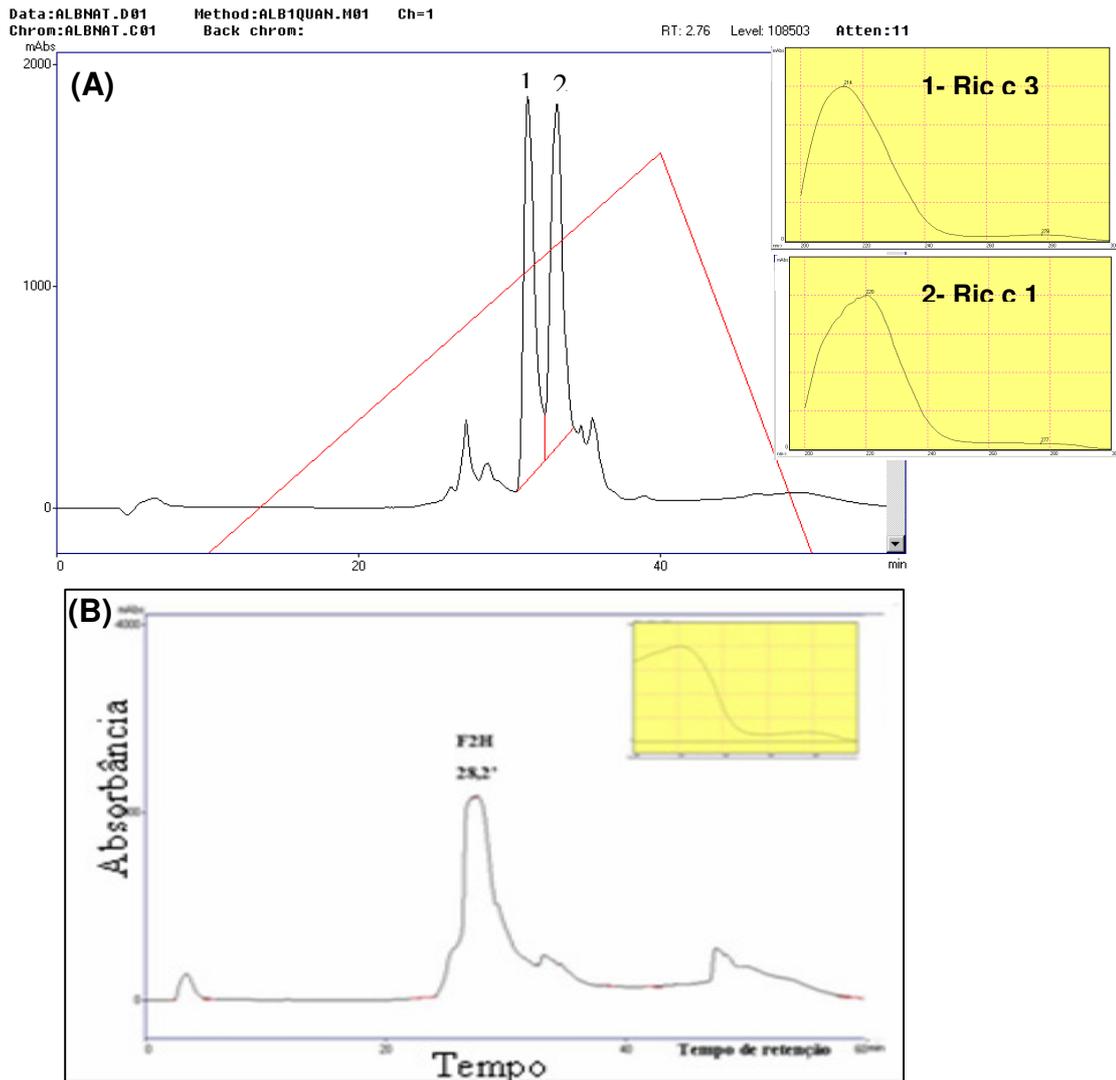


Figura 21: Perfil cromatográfico e espectro de absorção da albumina 2S (Ric c 3 e Ric c 1) de mamona (A) e da albumina 2S de pinhão-mansó (B) após cromatografia de fase reversa em coluna C-18, sistema HPLC (Pharmacia Biotech C18 5u 4,6 X 250 mm). Para eluição foi empregado um gradiente de hidrofobicidade formado por ácido trifluor-acético (TFA) 0,1% (solução A), e acetonitrila 80% contendo TFA 0,1% (solução B). O fluxo de eluição empregado foi de 0,7 mL/min, e o gradiente utilizado foi: 10 minutos de solução A; de 0 a 80% de solução B de 10 a 40 minutos; nos 5 minutos finais com solução A.

4.2- Sensibilidade dos soros policlonais anti-albumina 2S:

- Anti-albumina 2S de sementes de mamona:

A figura 22 a seguir representa o resultado para o teste de ELISA utilizado para quantificar a titulação do soro policlonal produzido. Para este teste, a microplaca foi sensibilizada com 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de albumina 2S de mamona e, posteriormente, incubada com o soro produzido em coelho contra albumina 2S de

mamona (anticorpo primário) em diferentes diluições seriadas de 1:500, 1:1000 e 1:2000.

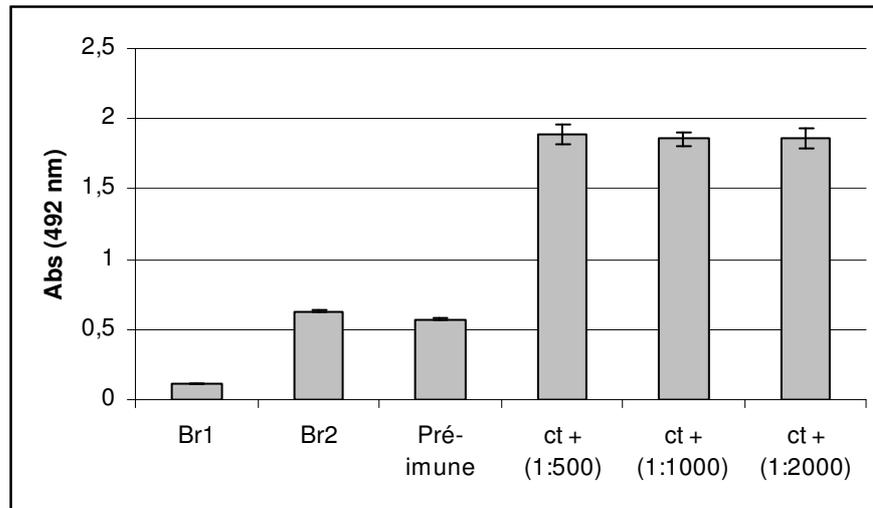


Figura 22: Titulação do soro policlonal anti-albumina 2S de mamona produzido em coelho. Ensaio imuno-enzimático (ELISA) entre o anticorpo policlonal anti-Albumina 2S de mamona produzido em coelho e o antígeno - albuminas 2S de mamona purificada (0,6 ug/ul).

Para determinarmos a sensibilidade do soro policlonal produzido em coelho contra o alérgeno de mamona, este soro foi testado na diluição de 1:500 frente a concentrações regressivas de albumina 2S de mamona (de 2,3 ng/ μ L a 9,1 pg/ μ L). Para as amostras referentes ao Br1 (Branco da amostra) e ao Pré-Imune (soro retirado antes das imunizações) foram utilizados como padrão a concentração de 0,6 ug/ul de albumina 2S de mamona para sensibilização da microplaca. A figura 23 apresenta os resultados da sensibilidade do soro.

De acordo com os dados apresentados na figura, podemos inferir que este ensaio imuno-enzimático, utilizando este soro, apresentou uma sensibilidade de 1 ng/ul a 50pg/ μ L, ou seja, o soro anti-albumina 2S de mamona produzido possui uma capacidade de reconhecimento de 1 ng/ μ L a 50 pg/ μ L do antígeno, barras de 2 a 6.

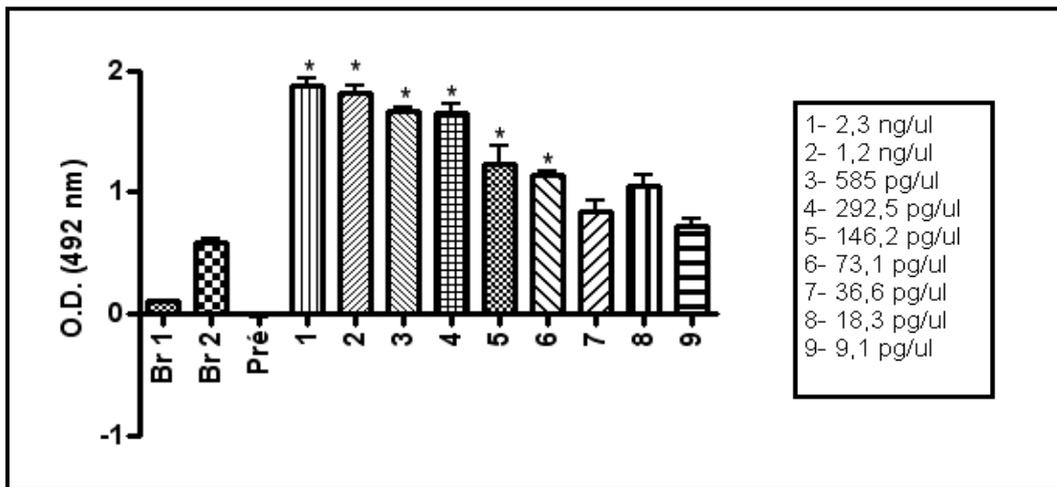


Figura 23: Sensibilidade do anticorpo policlonal anti-albumina 2S de mamona produzido em coelho frente a concentrações decrescentes de albumina 2S. Ensaio imuno-enzimático (ELISA) entre o anticorpo policlonal anti-Albumina 2S de mamona produzido em coelho e o antígeno - albuminas 2S de mamona purificada. (Br1): Branco da amostra; (Br2): Branco do tampão; (Pré): soro pré-imune; (1-9): Concentrações decrescentes de albumina 2S de mamona. (n=3, média \pm D.P.; * $P < 0,001$ em comparação com o Br2, pelo one way ANOVA, teste de comparação múltipla de Tukey).

- Anti-albumina 2S de sementes de pinhão-manso:

Amostras de soro obtido após as imunizações do coelho com albumina 2S purificada de sementes de pinhão-manso foram coletadas, alíquotadas e guardada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para determinação de seu título.

A figura 24 a seguir representa o resultado do teste imuno-enzimático utilizado para testar a sensibilidade do anticorpo policlonal produzido, na diluição de 1:500, frente a concentrações regressivas de albumina 2S de pinhão-manso (de 1 $\mu\text{g}/\text{ul}$ a 3,9 ng/ul). Neste ensaio, os poços referentes ao Br1 e ao Pré-Imune foram sensibilizados com 1 $\mu\text{g}/100\text{ul}$ de albumina 2S de pinhão-manso.

De acordo com os dados apresentados na figura, podemos inferir que este ensaio imuno-enzimático, utilizando este soro, apresentou uma boa sensibilidade para detectar pequenas concentrações de albumina 2S de pinhão-manso, ou seja, o soro anti-albumina 2S de pinhão-manso possui uma capacidade de reconhecimento de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ul}$ a 30 ng/ul do antígeno, barras de 2 a 6.

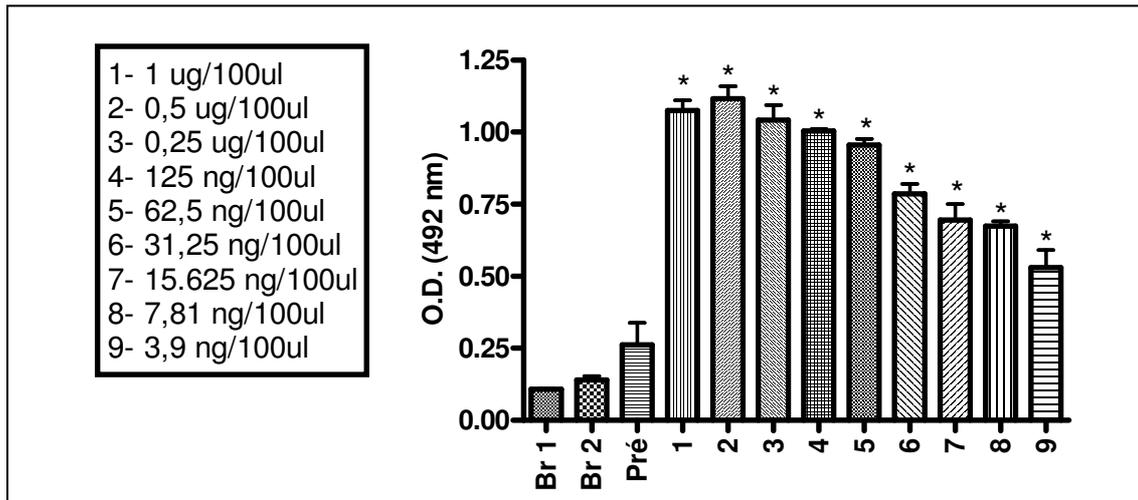


Figura 24: Sensibilidade do anticorpo policlonal anti-albumina 2S de pinhão-mansão produzido em coelho frente a concentrações decrescentes de albumina 2S. Ensaio imunoenzimático (ELISA) entre o anticorpo policlonal anti-Albumina 2S de sementes de pinhão-mansão produzido em coelho e o antígeno - albuminas 2S de pinhão-mansão purificada. (Br1): Branco da amostra; (Br2): Branco do tampão; (Pré): soro pré-imune; (1-9): Concentrações decrescentes de albumina 2S de mamona. (n=3, média \pm D.P.; * $P < 0,001$ em comparação com o Br2, pelo one way ANOVA, teste de comparação múltipla de Tukey).

Os soros policlonais produzidos em coelhos foram guardados para serem utilizados nas etapas de quantificação do teor de proteínas alergênicas retidas nos filtros (item 4.6.2).

4.3- Avaliação das modificações estruturais promovidas pelo tratamento com cálcio:

4.3.1- Análise por cromatografia de fase reversa:

- Albumina 2S purificada:

A figura 25 apresenta a sobreposição dos perfis cromatográficos das amostras de albumina 2S nativa e tratada com hidróxido de cálcio a 4%. Podemos observar através da comparação dos tempos de retenção da albumina 2S nativa e a tratada com hidróxido de cálcio que houve uma mudança no perfil cromatográfico indicando alterações na amostra, dadas as alterações nos tempos de retenção.

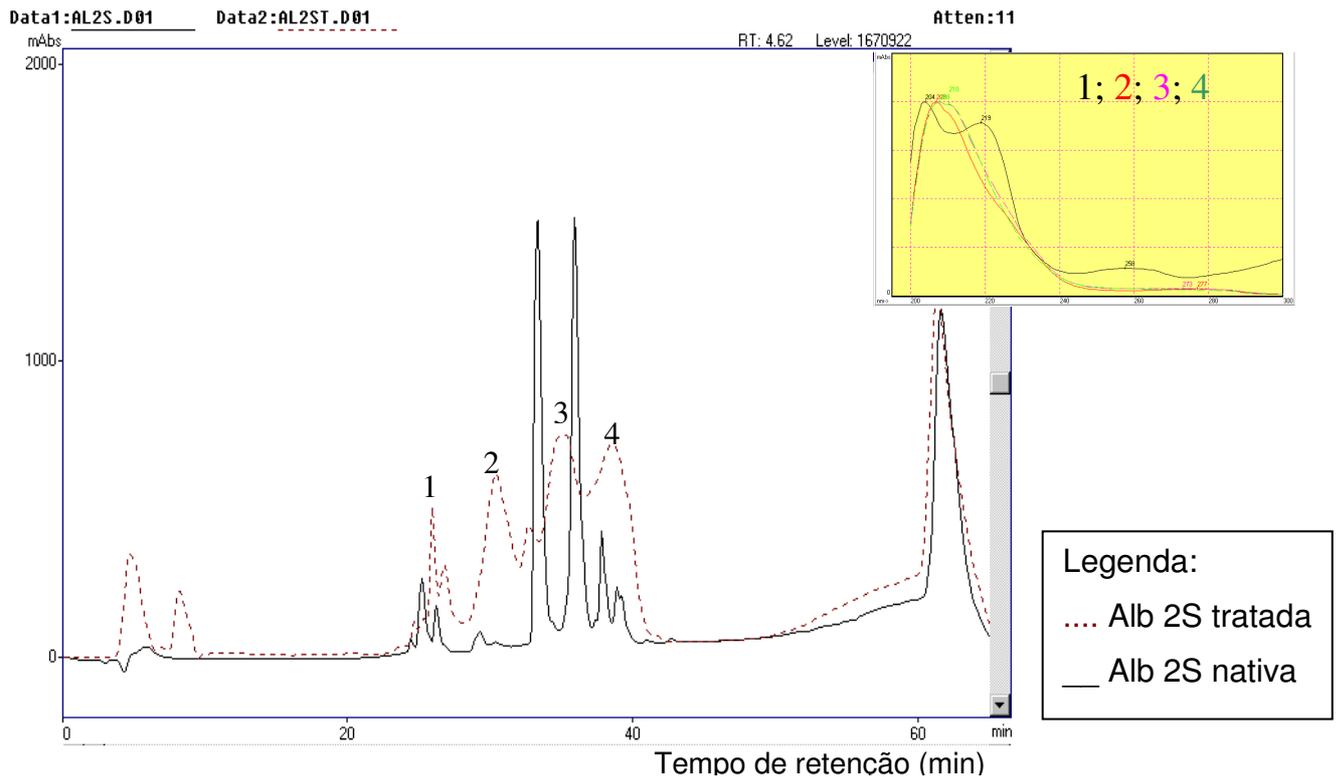


Figura 25: Sobreposição dos perfis cromatográficos e espectros de absorção da albumina 2S após tratamento com hidróxido de cálcio, após cromatografia de fase reversa em coluna C-18. Para eluição foi empregado um gradiente de hidrofobicidade formado por ácido trifluor-acético (TFA) 0,1% (solução A), e acetonitrila 80% contendo TFA 0,1% (solução B). O fluxo de eluição empregado foi de 0,7 mL/min, e o gradiente utilizado foi: 10 minutos de solução A; de 0 a 80% de solução B de 10 a 40 minutos; nos 5 minutos finais com solução A.

As quatro frações obtidas após o tratamento com hidróxido de cálcio (picos 1 ao 4) que apresentaram uma diferença considerável de acordo com o tempo de retenção em comparação a amostra nativa foram coletados. Estas frações foram guardadas para posterior caracterização biológica por ensaios de desgranulação dos mastócitos de rato.

-Albumina 2S presente na torta de mamona:

A figura 26 abaixo representa a sobreposição dos perfis cromatográficos das amostras de torta de mamona nativa e tratada com hidróxido de cálcio a 4% e, o espectro de absorção da amostra de torta de mamona após o tratamento. Observando a sobreposição dos perfis cromatográficos das amostras nativa e tratada de torta de mamona, vimos que tal tratamento promoveu alterações nas proteínas presentes neste material, porém, nenhum pico bem definido foi gerado.

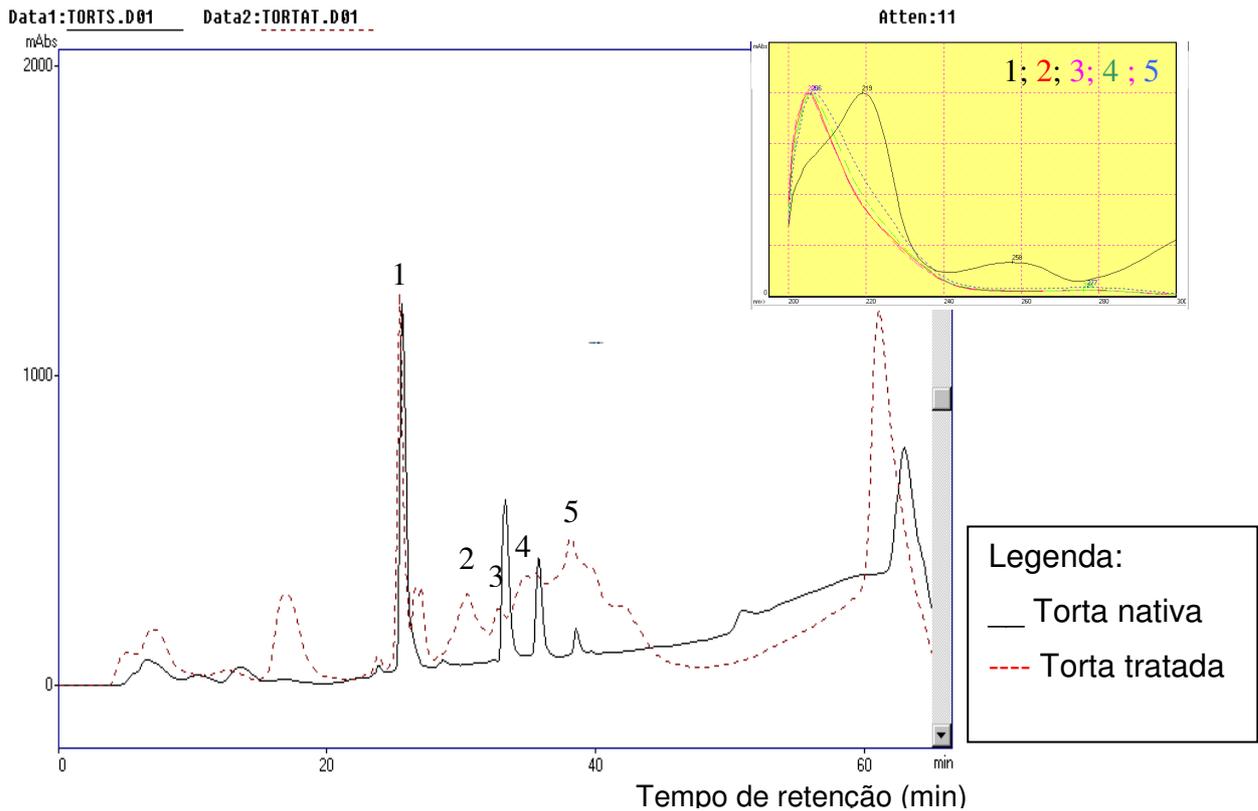


Figura 26: Sobreposição dos perfis cromatográficos e espectros de absorção da torta de mamona tratada com hidróxido de cálcio, após cromatografia de fase reversa em coluna C-18. Para eluição foi empregado um gradiente de hidrofobicidade formado por ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (solução A), e acetonitrila 80% contendo TFA 0,1% (solução B). O fluxo de eluição empregado foi de 0,7 mL/min, e o gradiente utilizado foi: 10 minutos de solução A; de 0 a 80% de solução B de 10 a 40 minutos; nos 5 minutos finais com solução A.

A fim de realizar a avaliação das modificações na torta de mamona promovidas pelo tratamento com hidróxido de cálcio a 4%, decidimos não submeter este material tratado a nenhuma etapa de purificação. Desta forma, amostras de torta de mamona bruta tratada foram utilizadas nos ensaios de caracterização biológica através da desgranulação de matócitos.

4.3.2- Análise por espectrometria de massas:

A fim de avaliar as modificações promovidas na proteína alergênica pelo tratamento com o cálcio, a albumina 2S de mamona foi tratada com óxido de cálcio (8%) e, posteriormente, analisada pelo espectrômetro de massa Synapt G2-S MS da Waters. O perfil da amostra obtido após o tratamento foi comparado ao perfil da albumina 2S nativa. Observamos que antes do tratamento as massas moleculares dos picos principais da albumina 2S eram de 11127 e 11484 Dalton (Figura 27).

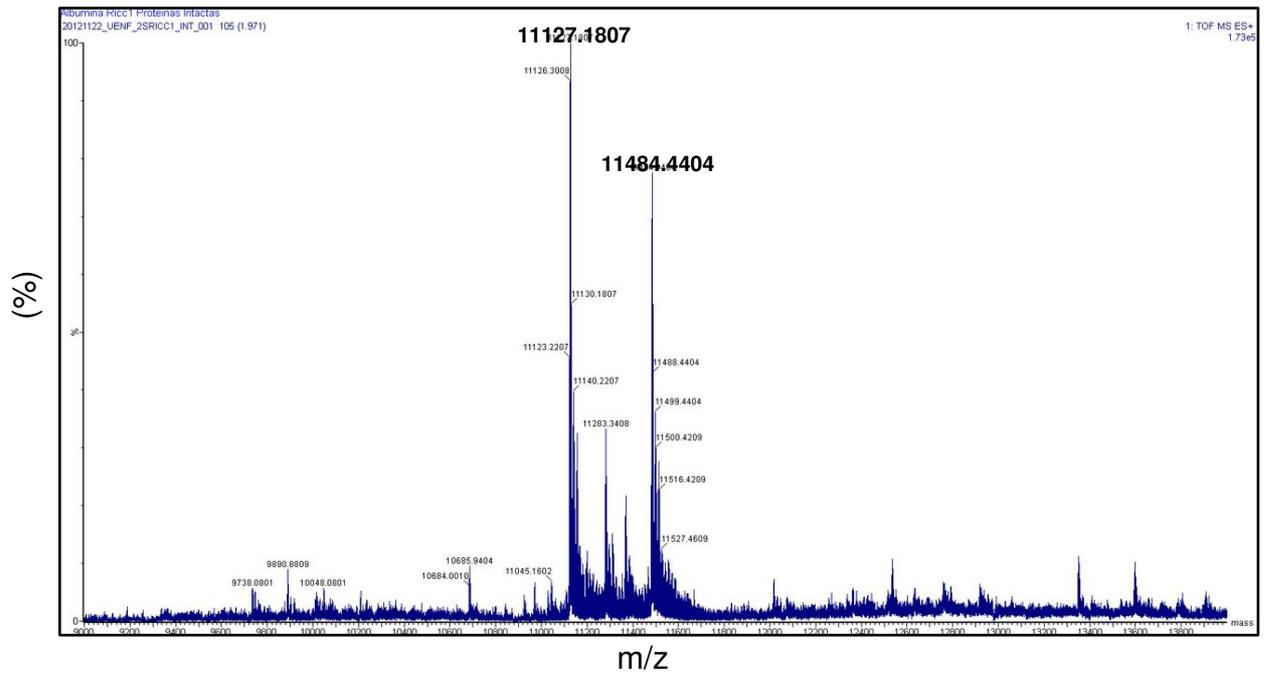


Figura 27: Espectro de massas de albumina 2S mamona nativa.

Após o tratamento da albumina 2S de mamona com óxido de cálcio podemos observar diversos fragmentos com massa molecular de 2281 a 7196 Dalton (Figura 28). A ampliação da figura da amostra tratada com cálcio na região de massa molecular abaixo de 1249 Da pode ser acompanhada na figura 29.

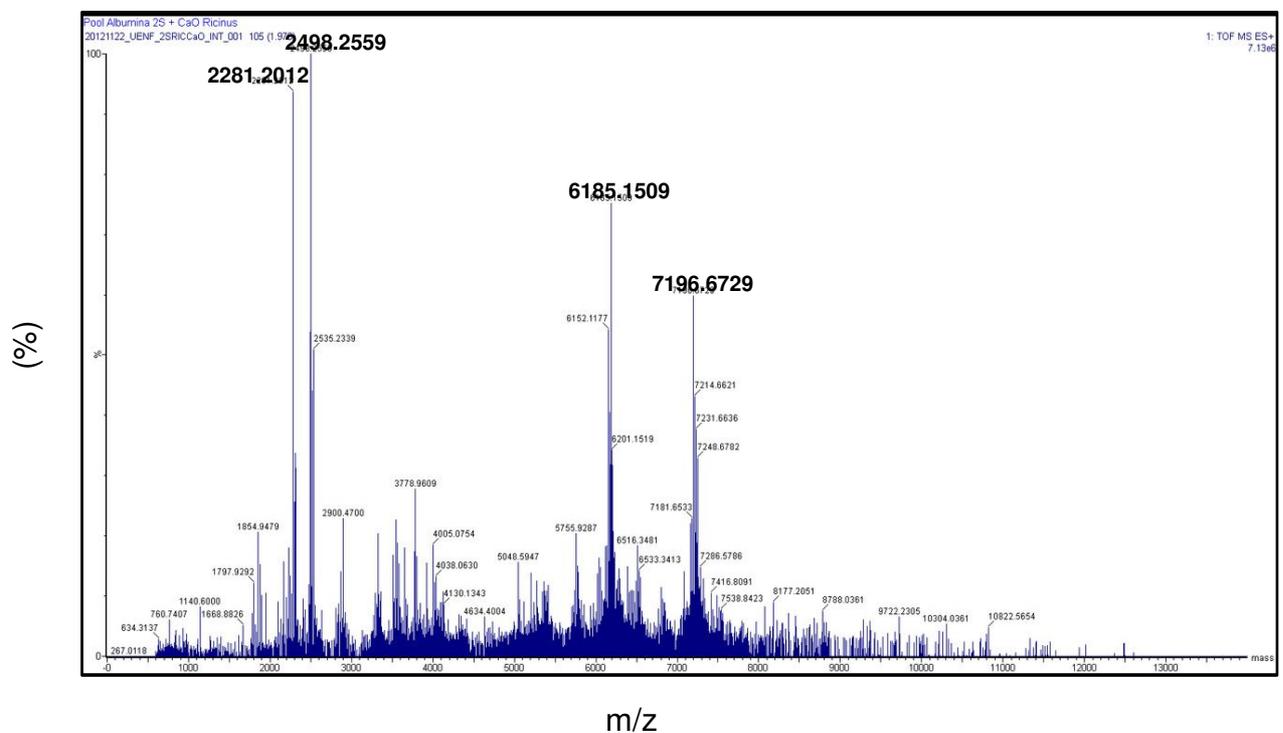


Figura 28: Espectro de massas de albumina 2S mamona tratada com óxido de cálcio (8%).

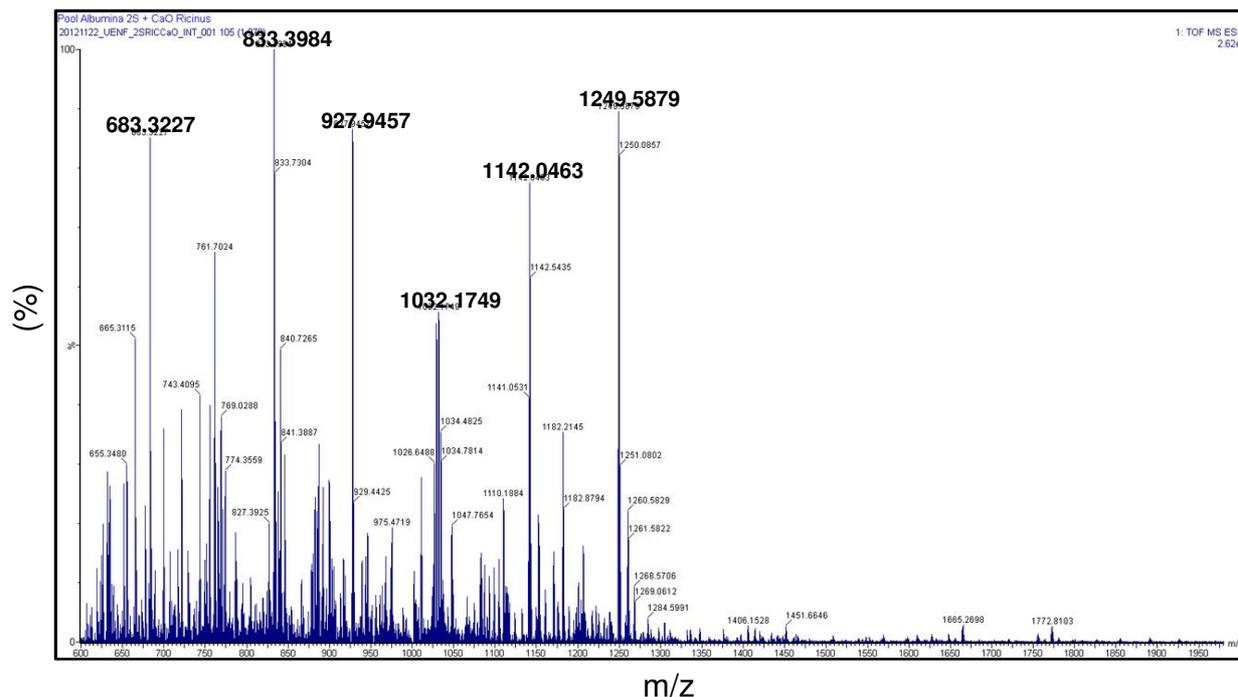


Figura 29: Ampliação do espectro de massas de albumina 2S mamona tratada com óxido de cálcio (8%).

4.4- Avaliação da alergenicidade do material tratado:

4.4.1- Observação da morfologia das células por microscopia óptica:

Os mastócitos isolados da cavidade peritoneal de ratos Wistars foram incubados em duas diferentes condições. Condição (A): incubação de mastócitos somente com DMEM e na ausência de soro imune (células não-estimuladas) ou na condição (B): mastócitos incubados com “pool” de soro de ratos (RA/Thor) anti-albumina 2S seguido de exposição a albumina 2S de mamona (células estimuladas). As células provenientes destas duas incubações foram coradas por azul de toluidina e, a morfologia das mesmas foi avaliada por microscopia óptica, seguindo a metodologia descrita no item 3.5.2.1.

Todas as células observadas na figura 30(A) foram consideradas mastócitos íntegros enquanto, os mastócitos apresentados na figura 30(B) são considerados células desgranuladas, com seus grânulos metacromáticos corados.

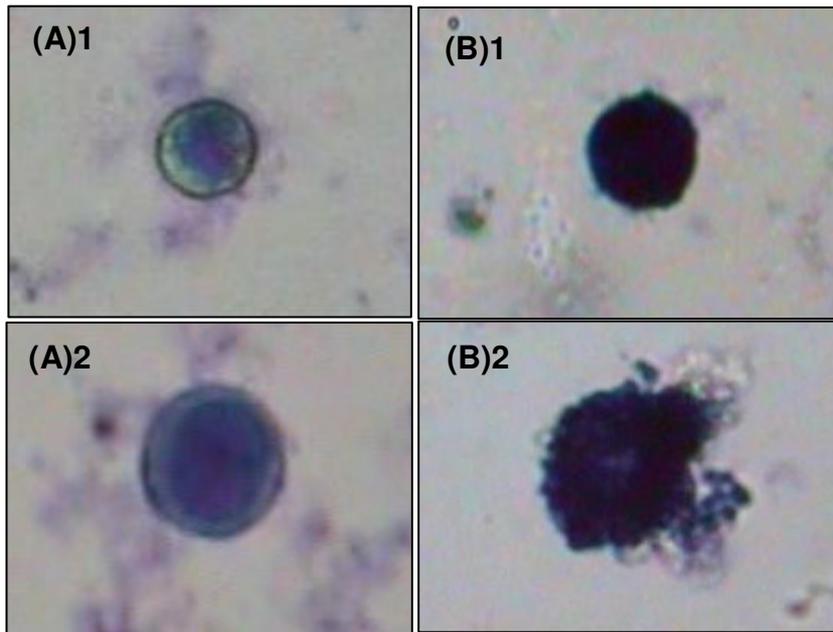


Figura 30: Morfologia de mastócitos do lavado peritoneal de rato corados por azul de toluidina. **(A)** Células não-estimuladas do lavado peritoneal de rato (células íntegras); **(B)** Células estimuladas após exposição à albumina 2S na presença de soros como fonte de IgE (células desgranuladas). Aumento de 400X.

4.4.2- Ensaios de desgranulação dos mastócitos:

Primeiramente, avaliamos o possível percentual de desgranulação inespecífica promovido pelos compostos propostos para o tratamento químico quando incubados com os mastócitos obtidos do lavado peritoneal de rato. Nesse sentido, os compostos de cálcio, hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio e óxido de cálcio, nas concentrações de 4 e de 8%, foram incubados com os mastócitos de rato. A figura 31 apresenta os resultados obtidos após estas incubações.

Podemos observar que esses compostos na presença ou na ausência de IgE específica anti-albumina 2S são incapazes de ativar as células ao nível do controle positivo (albumina 2S + IgE específica) e desencadear uma resposta celular. A desgranulação das células frente aos compostos de cálcio foi de, aproximadamente, 40%. Esta etapa foi fundamental para podermos afirmar que o tratamento químico proposto e, conseqüentemente, o produto obtido não interfere biologicamente nos mastócitos de rato utilizados nos ensaios para caracterizar a atividade alergênica *in vitro*.

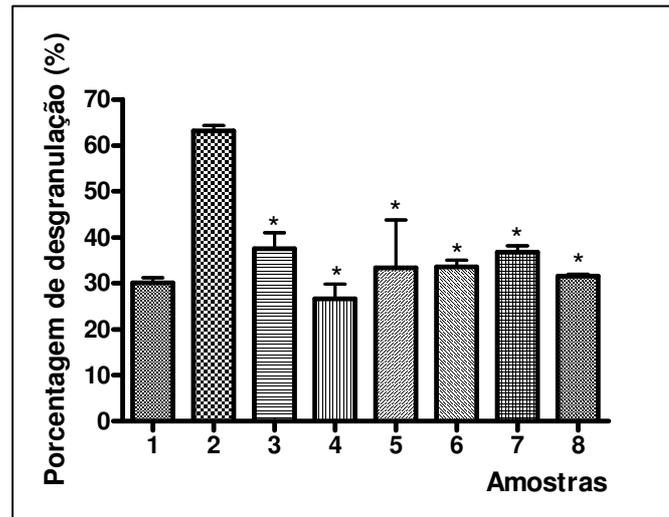


Figura 31: Desgranulação de mastócitos do lavado peritoneal de rato incubados com compostos de cálcio (experimento controle). (1): Células-controle não estimuladas; (2): Albumina 2S + soro anti-albumina 2S; (3): Ca(OH)_2 4%; (4): Ca(OH)_2 8%; (5): CaCO_3 4%; (6): CaCO_3 8%; (7) CaO 4%; (8): CaO 8% (n=3, média \pm D.P.; * $P < 0,001$ em comparação com o controle positivo, pelo one way ANOVA, teste de comparação múltipla de Tukey).

Num segundo momento, realizamos ensaios de desgranulação utilizando amostras de albumina 2S e torta de mamona tratadas com os compostos de cálcio, como descrito no item 3.3 acima. Para tanto, as células obtidas do lavado peritoneal de rato foram submetidas a incubação com as amostras tratadas na presença de soro anti-albumina 2S de mamona. A figura 32 quantifica a desgranulação de mastócitos promovida pelas amostras de albumina 2S após os tratamentos com os compostos de cálcio.

Podemos observar que todos os tratamentos, hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio ou óxido de cálcio, nas duas concentrações (4 ou 8%), promoveram a redução da alergenicidade das amostras de albumina 2S, quando comparado ao controle positivo. Esta redução, demonstrada pelos ensaios de desgranulação de mastócitos de rato, mostrou-se significativa, apresentando-se próxima aos valores observados no controle negativo.

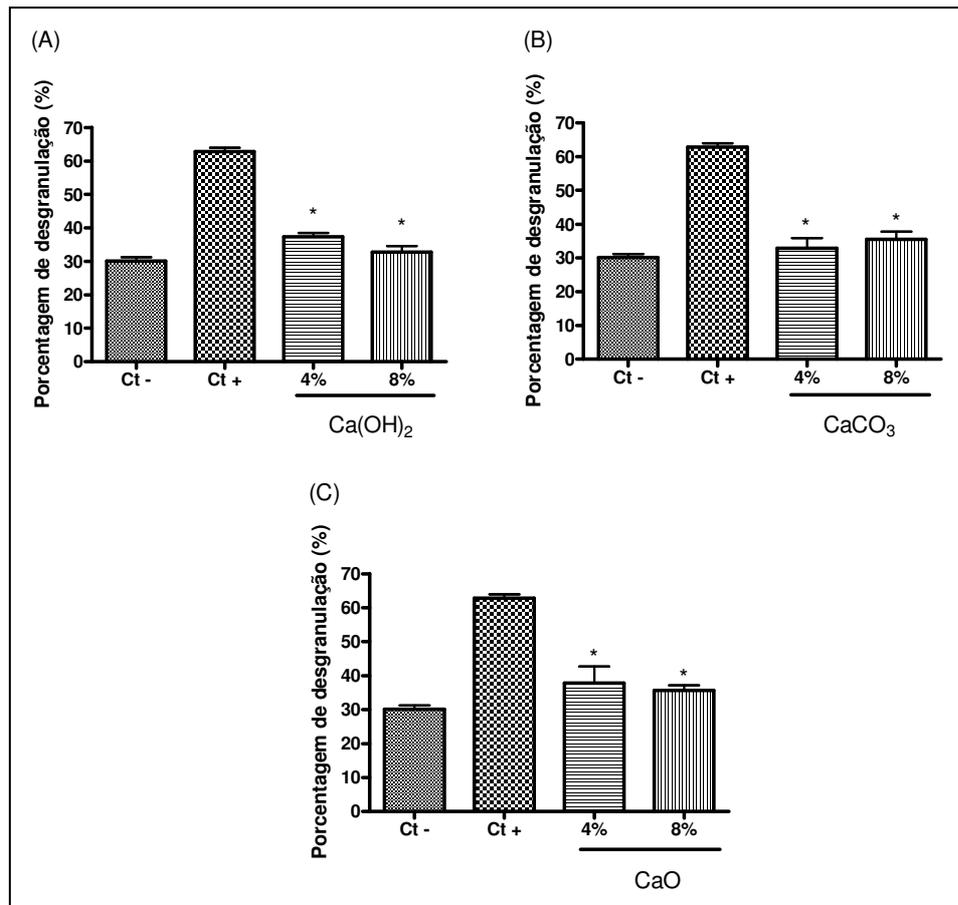


Figura 32: Desgranulação de mastócitos do lavado peritoneal de rato frente as amostras de albumina 2S tratadas, na presença do soro anti-albumina 2S. (Ct -) controle negativo: células não-estimuladas; (Ct +) controle positivo: células + albumina 2S sem tratamento; (A) Albumina 2S tratada com Ca(OH)₂ a 4 ou 8%; (B) Albumina 2S tratada com CaCO₃ a 4 ou 8%; (C) Albumina 2S tratada com CaO a 4 ou 8%; (n= 3, média ± D.P.; * P<0,001 em comparação com o controle positivo, pelo one way ANOVA, teste de comparação múltipla de Tukey).

O ensaio de desgranulação também foi utilizado para avaliar a atividade alérgica das amostras de torta de mamona submetidas aos tratamentos com os compostos de cálcio (Figura 33).

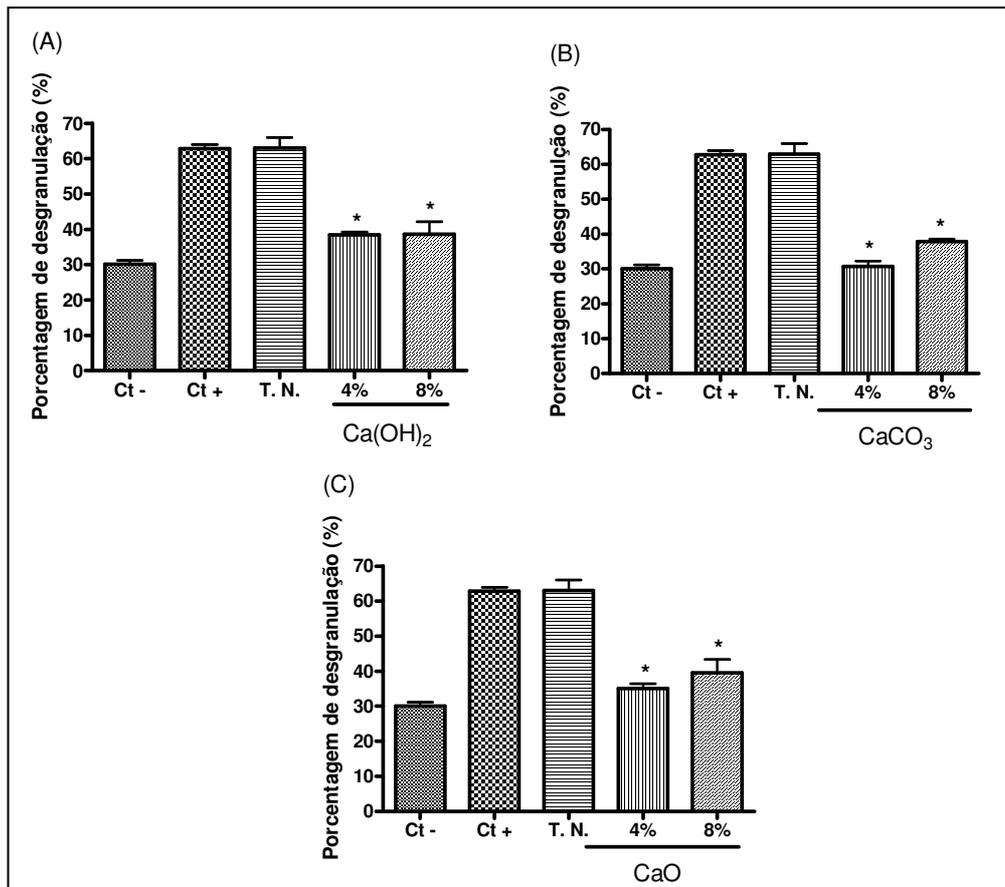


Figura 33: Desgranulação de mastócitos do lavado peritoneal de rato frente as amostras de torta de mamona tratadas, na presença do soro anti-albumina 2S. (Ct -) controle negativo: células não-estimuladas; (Ct +) controle positivo: células + albumina 2S sem tratamento; (T.N.) Torta Nativa: células + torta de mamona sem tratamento; (A) Torta de mamona tratada com Ca(OH)_2 a 4 ou 8%; (B) Torta de mamona tratada com CaCO_3 a 4 ou 8%; (C) Torta de mamona tratada com CaO a 4 ou 8%; (n=3, média \pm D.P.; * $P < 0,001$ em comparação com o controle positivo, pelo one way ANOVA, teste de comparação múltipla de Tukey).

Pode-se observar que os tratamentos, hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio ou óxido de cálcio, nas duas concentrações, promoveram a redução da alergenicidade das amostras de torta de mamona, assim como observado nas amostras do alérgeno isolado (dado mostrado anteriormente – Figura 32). Esta redução promovida pelas amostras de torta de mamona tratadas, demonstrada pelos ensaios de desgranulação de mastócitos de rato, também se mostrou significativa, apresentando-se próxima aos valores observados no controle negativo.

4.5- Avaliação da toxicidade do material tratado:

Para analisar as propriedades tóxicas da ricina presente nas amostras de torta de mamona submetidas ao tratamento com os compostos de cálcio realizamos

ensaios biológicos utilizando células Vero. Os ensaios de viabilidade celular e de dosagem da enzima LDH foram realizados, como descrito no item 3.6.

A figura 34 abaixo apresenta os resultados da viabilidade celular observada após incubação das células na presença da torta de mamona sem tratamento e após tratamento com compostos de cálcio (carbonato, óxido e hidróxido de cálcio) em duas concentrações, a 4 e a 8%.

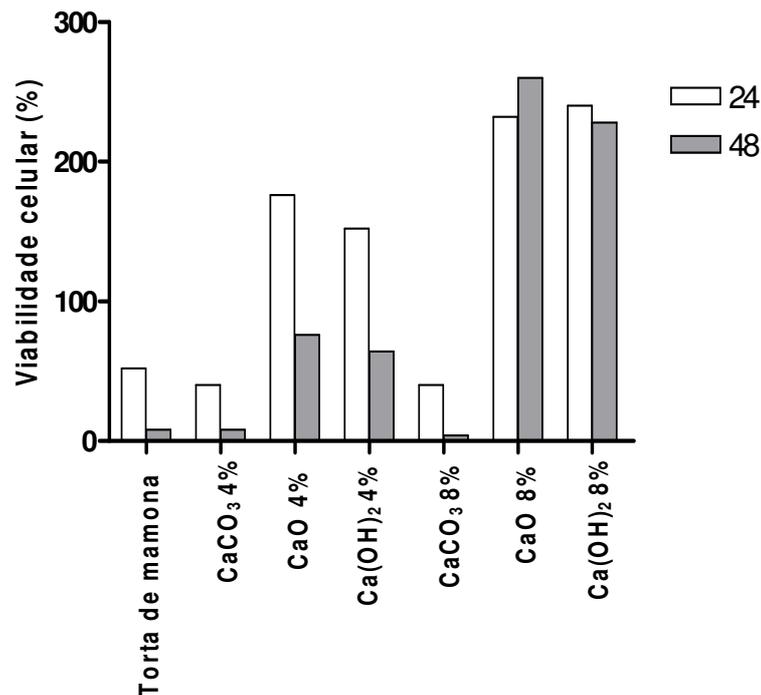


Figura 34: Viabilidade de células Vero após 24 e 48 horas de incubação com amostras de torta de mamona tratada quimicamente com compostos de cálcio. A concentração inicial de células foi de $1,6 \times 10^5$ células/poço (100%). PBS, pH 7,0, foi utilizado como um controle negativo e, extrato bruto de torta de mamona sem tratamento como um controle positivo.

Observamos a partir dos resultados apresentados na figura acima que o tratamento com carbonato de cálcio, nas duas concentrações, não foi eficaz para destoxificar a ricina presente na torta de mamona. As células morreram na presença da torta tratada com este composto. Por outro lado, a proliferação das células Vero foi observada quando estas células foram incubadas com torta de mamona tratada com óxido de cálcio ou com hidróxido de cálcio, ambos a 8%.

Para confirmar os resultados quanto a sobrevivência das células, ensaios de dosagem da enzima LDH foram realizados no sobrenadante. Os resultados referentes a dosagem desta enzima são apresentados na na figura 35 abaixo. Os dados do ensaio de LDH são complementares a contagem de células apresentadas na figura 34 acima.

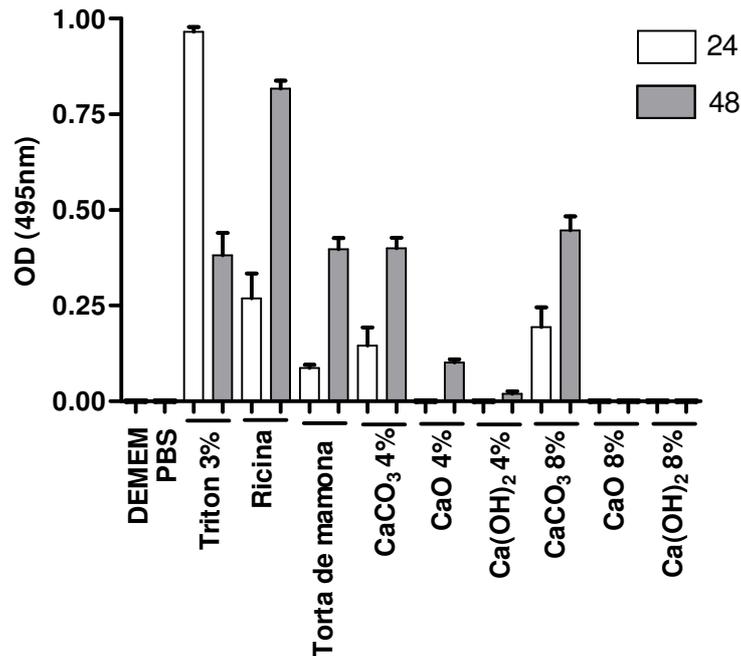


Figura 35: Atividade da enzima lactato desidrogenase liberada de células Vero incubadas por 24 a 48 horas com torta de mamona tratada com CaCO₃, CaO, ou Ca (OH)₂, 4 ou 8%, na proporção de 1:1 (v/v). Os dados representam experimentos realizados em triplicata.

4.6- Determinação de proteínas alergênicas retidas nos filtros:

4.6.1- Padronização do solvente para extração:

Antes de submetermos o material dos filtros coletados na área de plantio a qualquer extração proteica, realizamos a padronização da etapa de extração, segundo a metodologia apresentada no item 3.7.2.1 para determinarmos o melhor solvente a ser empregado.

Papéis de filtro foram incubados com 100 pg/ul de albumina 2S de sementes de mamona. Estes filtros contendo a proteína padrão foram submetidos a diferentes solventes, de acordo com a metodologia apresentada no item 3.7.2.1. Neste ensaio utilizamos os valores de 1,2 ng/ul a 73 pg/ul como curva-padrão (barras de 1 a 5) de albumina 2S de mamona para servir como fator de comparação ao teor de proteína extraído após cada solvente empregado. A figura 36 mostra o resultado do ensaio imuno-enzimático realizado para quantificar a eficiência dos solventes empregados para extração de proteínas do papel de filtro.

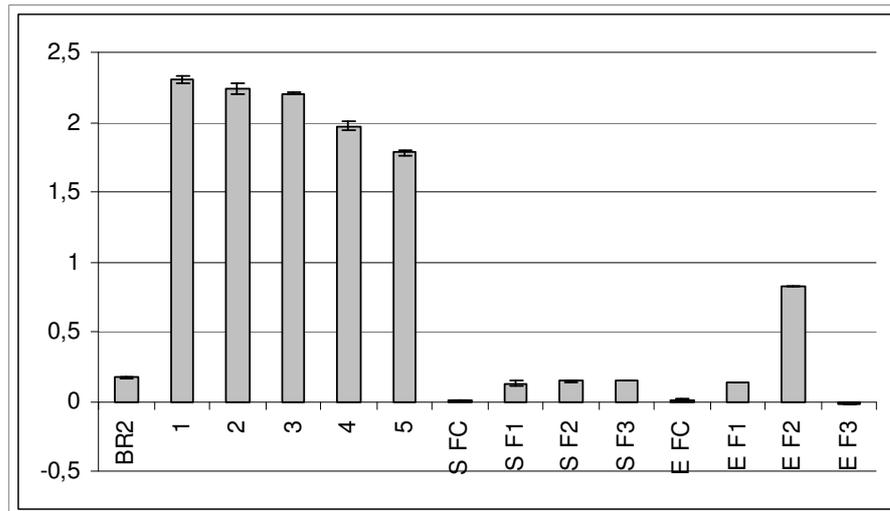


Figura 36: Ensaio imuno-enzimático (ELISA) entre o anticorpo policlonal anti-Albumina 2S (1:500) de sementes de mamona produzido em coelho e as proteínas presentes nos filtros submetidos a diferentes técnicas de extração. **(Br2):** Branco do tampão; **(1 a 5):** Curva padrão de albumina 2S de mamona 1,2 ng/ul a 73,1 pg/ul; **(SFC):** Sobrenadante do filtro controle sem proteína; **(SF1 a SF3):** Sobrenadantes dos filtros incubados com 100 pg/ul de albumina 2S de mamona; **(EFC):** Filtro controle, sem proteína, extraído com água; **(EF1):** Filtro extraído com água; **(EF2):** Filtro extraído com Tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6 ; **(EF3):** Filtro extraído com Tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0.

De acordo com os resultados apresentados na figura 36 acima, o tampão carbonato/bicarbonato foi o mais eficiente para extração de albumina 2S do papel de filtro, barra denominada EF2. Desta forma, este solvente foi escolhido para ser empregado na extração de proteínas retidas nos filtros coletados na região de plantio de pinhão-manso.

4.6.2- Quantificação de albumina 2S nos extratos de filtros:

Os papéis de filtro contendo amostra de proteínas coletados na ausência e na presença de inflorescência na plantação de pinhão-manso foram submetidas a ensaio imuno-enzimático. Neste ensaio utilizamos o anticorpo policlonal anti-albumina 2S de pinhão-manso (1:500) produzido em coelho a fim de determinar a presença da proteína alergênica retida nos filtros.

A figura 37 apresenta o resultado da quantificação de albumina 2S a partir das amostras extraídas do papel de filtro e um esquema representativo do papel de filtro que apresenta área total de 50,24 cm². O esquema foi montado para demonstrar duas regiões presentes no papel de filtro que foram extraídas separadamente. Uma região denominada halo central (H.C.), correspondendo a uma área de 3,14 cm² e outra região denominada filtro (F), correspondendo a uma área

de 47,1 cm². As duas regiões foram separadas, pois observamos que o halo central (H.C.) apresentou maior concentração de pigmentos após a exposição do papel ao período da coleta.

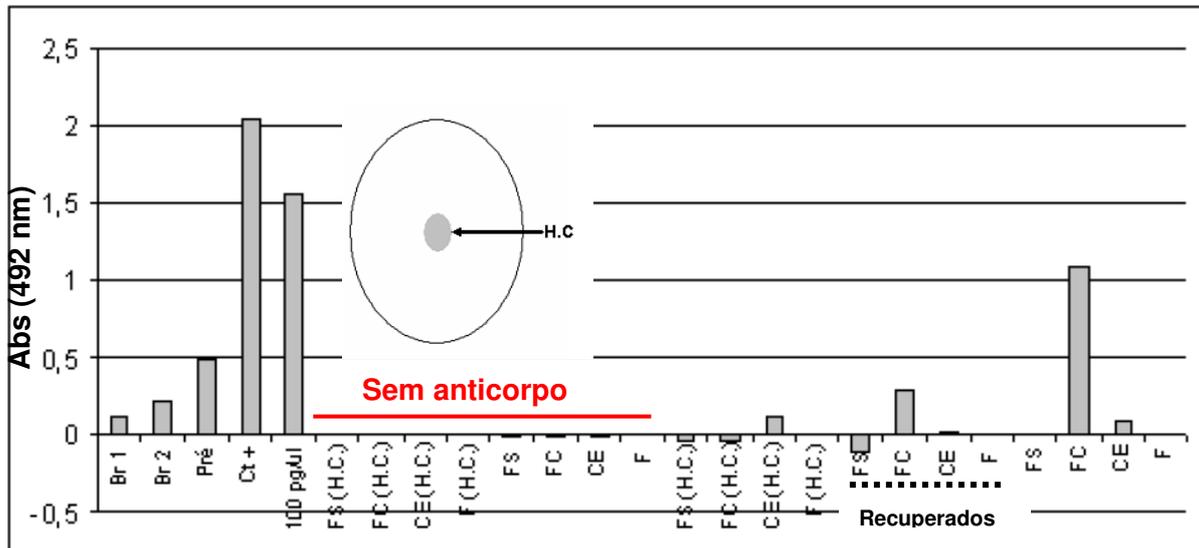


Figura 37: Quantificação de albumina 2S de pinhão-mansão em amostras de papel de filtro coletado no município de Viana-ES utilizando ensaio imuno-enzimático (ELISA). **(Br1):** Branco da amostra; **(Br2):** Branco do tampão; **(Pré):** Soro pré-imune; **(Ct+):** Controle positivo com 0,01 ug/ul de albumina 2S de pinhão-mansão; **(100 pg/ul):** concentração de albumina 2S de pinhão-mansão; **(F.S.):** Filtro coletado sem inflorescência; **(F.C.):** Filtro coletado na presença de inflorescência; **(F.):** Somente o papel de filtro. Recuperados: líquido obtido após a prensagem da amostra do filtro após a extração com tampão carbonato/bicarbonato.

As amostras extraídas do filtro com o tampão carbonato/bicarbonato, halo central (H.C.) e o restante da área do filtro (F.), foram separadas e, posteriormente extraídas e submetidas a ensaios imuno-enzimáticos para verificarmos a presença de proteínas da classe das albuminas 2S de pinhão-mansão neste material. O teste imuno-enzimático com os extratos obtidos, foi realizado na ausência e na presença de anticorpos primário (1:500) e secundário (1:2000), como demonstrado pela linha vermelha apresentada na figura 37 acima.

A partir deste ensaio observamos que somente as amostras provenientes de extratos de filtros coletados na presença da inflorescência (F.C.) de pinhão-mansão apresentaram-se positivas para a presença de albumina 2S de pinhão-mansão. Nenhuma marcação para albumina 2S foi observada em extratos de filtros coletados sem inflorescência (F.S.) ou somente no extrato do filtro (F.).

Extratos obtidos de amostras de inflorescência de pinhão-manso ainda fechadas ou inflorescência com flores abertas foram testadas quanto a presença de albuminas 2S. Estas amostras foram obtidas da mesma plantação onde as amostras aerobiológicas foram coletadas. Apesar de obtermos resultados positivos quanto a quantificação de albumina 2S coletadas de amostras aerobiológicas, não detectamos a presença de albuminas 2S a partir dos extratos das inflorescências de pinhão-manso.

4.7- Avaliação da resposta imunológica no modelo animal:

No primeiro protocolo de imunização, injeções intraperitoneais com 50 µg de albumina 2S de mamona na presença de adjuvante (2,0 mg de hidróxido de alumínio), observamos que os animais (n=3) imunizados morreram antes do período previsto para o reforço. A morte foi detectada após 15 dias após a primeira dose do antígeno. Desta forma, o soro destes animais não foi avaliado e, um novo protocolo de imunização, com concentrações de antígenos alteradas, foi iniciado.

4.7.1- Imunização com 10 µg de albumina 2S de mamona:

Para o segundo protocolo de imunização realizamos algumas alterações, a concentração de proteína foi reduzida para 10 µg de albumina 2S de mamona e a quantidade de adjuvante utilizada foi de 5,0 mg de hidróxido de alumínio/inoculação. Neste protocolo também utilizamos camundongos Balb/c (n= 3 fêmeas de 5 a 6 semanas) imunizados em intervalos de, aproximadamente, 20 dias, como mostra o modelo experimental apresentado no item 3.9.1.

Os animais submetidos a este novo protocolo de imunização apresentavam-se saudáveis e, os soros pré-imune, após a segunda e terceira imunizações foram avaliados quanto a produção de IgG/IgM específica, padrão de resposta Th1 ou Th2 e produção de anticorpos IgE específicos no decorrer do experimento.

4.7.1.1- Resposta humoral (IgG/IgM) específica:

A produção de IgG/IgM específica nos soros obtidos dos animais imunizados com 10 µg de albumina 2S de mamona/inoculação foi acompanhada por ensaios imuno-enzimáticos utilizando anticorpo secundário anti-IgG/IgM de camundogo. O resultado da avaliação do estímulo humoral pode ser observado na figura 38.

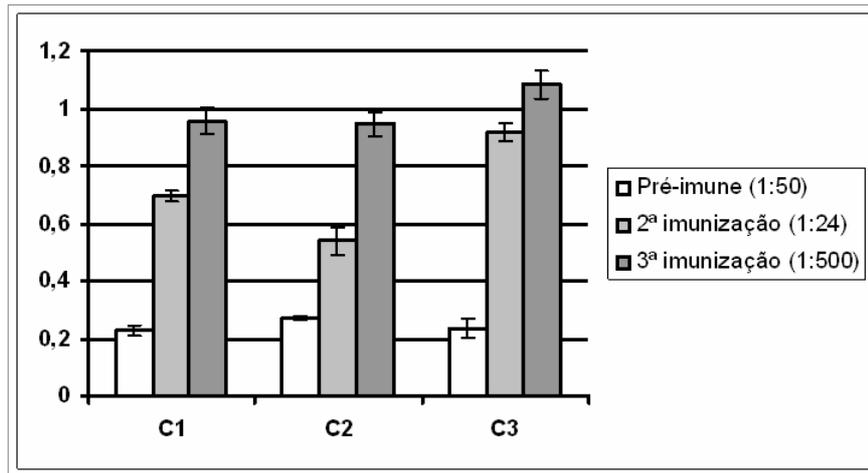


Figura 38: Produção de IgG/IgM específica nos camundongos submetidos a imunização com 10 μ g de albumina 2S de mamona. C1, C2, C3= camundongos.

Este resultado demonstra que animais imunizados com 10 μ g de albumina 2S de mamona estão sendo estimulados para a produção de anticorpos IgG/IgM anti-albumina 2S de mamona ao longo da procedimento experimental.

Após a verificação do estímulo humoral desencadeado nos camundongos pela dose de 10 μ g albumina 2S, o tipo de padrão de resposta humoral decorrente da participação de linfócitos T helper (auxiliares), ou seja, do tipo Th1 ou do tipo Th2, desencadeado nestes animais após a terceira dose do antígeno, também foi avaliado.

4.7.1.2- Padrão de resposta Th1 ou Th2:

Para a caracterização do padrão de resposta Th1 ou Th2 realizamos a dosagem de imunoglobulinas características de cada padrão de resposta, IgG2a para o padrão Th1 e IgG1 e IgE para o padrão Th2. Esta pesquisa foi realizada por ensaios de ELISA utilizando anticorpos secundários contra cada uma das imunoglobulinas a ser pesquisada. O resultado do ensaio pode ser observado na figura 39.

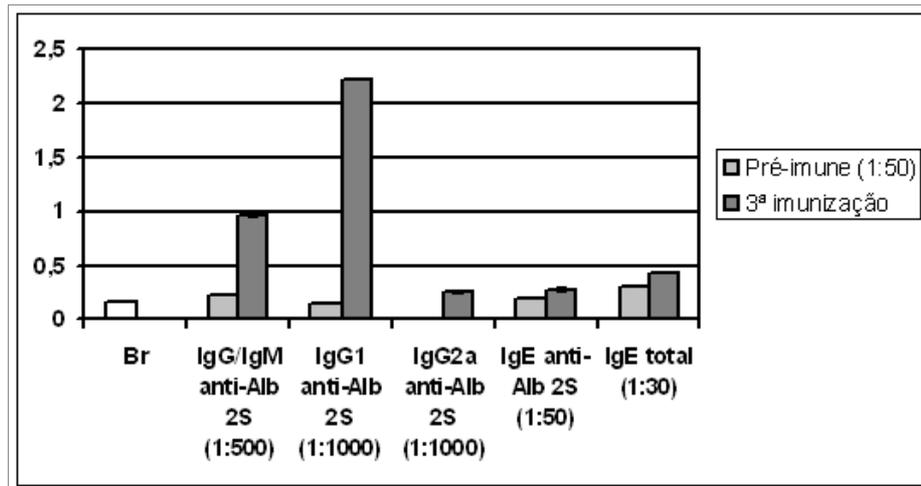


Figura 39: Perfil de imunoglobulinas após a 3ª imunização nos camundongos sensibilizados contra albumina 2S de mamona. Br: Branco. Os títulos indicados abaixo de cada anticorpo referem-se ao anticorpo primário (soro do camundongo).

Observamos através da análise da figura 40 que o soro dos camundongos imunizados apresentam altos títulos de IgG1 específica (O.D. \geq 2,0), caracterizando um padrão do tipo Th2 porém, não conseguimos observar altos níveis de IgE específica ou total no soro desses animais.

Com a finalidade de detectar IgE específica e total no soro dos animais imunizados com a dose de 10 μ g albumina 2S de mamona ensaios de imunoadsorção utilizando proteína A foram realizados.

4.7.1.3- Imunoadsorção do soro com proteína A:

A cromatografia de afinidade em batelada utilizando proteína A-agarose 6MB foi utilizada como estratégia para separar IgG e IgE presentes no soros dos animais imunizados. A figura 40 apresenta o resultado obtido após a imunoadsorção do soro do camundongo T3G1C1 utilizando a proteína A-agarose.

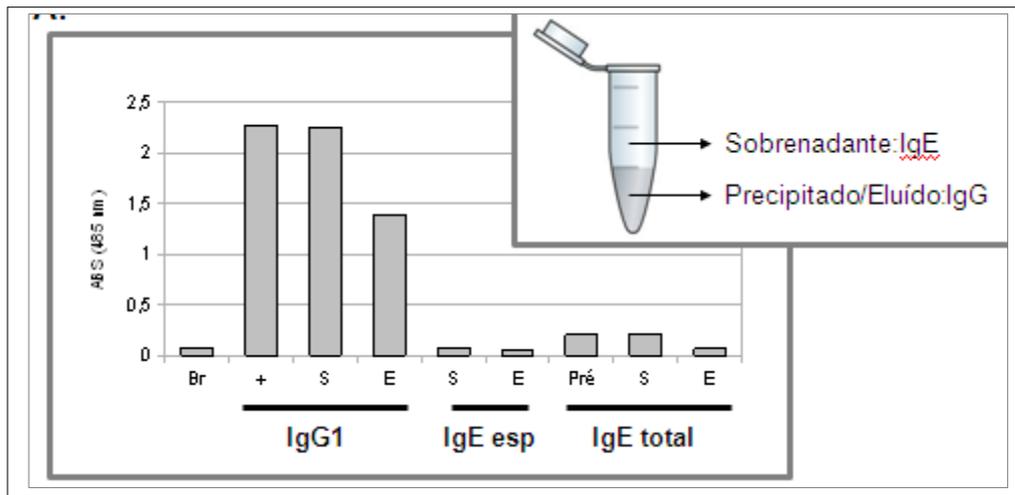


Figura 40: Ensaio imuno-enzimático do soro submetido a cromatografia de afinidade com proteína A-agarose 6MB. **(Br):** Branco do ensaio. **(+):** Controle positivo, soro antes da imunoadsorção. **(S):** Sobrenadante obtido após a imunoadsorção. **(E):** Eluído da resina após a imunoadsorção. **(Pré):** Soro pré-imune. Título dos soros/anticorpo a ser detectado: IgG1= 1:1000; IgE= 1:30.

A partir da observação dos resultados apresentado na figura acima, podemos verificar a presença de IgG1 específica, absorvância acima de 1,0, tanto no sobrenadante quanto no precipitado/eluído obtido após a cromatografia de afinidade. Já para a pesquisa da presença de IgE específica ou total nas frações obtidas do soro pós-cromatografia verificamos pequenos valores de absorvância, menor que 0,5, após a leitura do ensaio a 485 nm.

4.7.2- Imunização com 0,01 µg, 0,1 µg ou 1,0 µg de albumina 2S de mamona:

Avaliamos a produção humoral em animais imunizados com outras concentrações do antígeno na presença de 4 mg de hidróxido de alumínio/inoculação, caracterizando o terceiro protocolo de imunizações. Utilizamos 0,01 µg, 0,1 µg ou a 1,0 µg de albumina 2S de mamona para imunizar animais organizamos em grupos denominados T1, T2 e T3, respectivamente. As concentrações do antígeno empregados neste protocolo de imunização são menores se comparadas aos protocolos experimentais descritos anteriormente, que utilizaram 50 µg ou 10 µg de albumina 2S de mamona.

Os soros de todos os animais de cada grupo submetidos a cada uma das doses descritas foram coletados e, guardados para análises futuras. Para

acompanharmos a resposta imune induzida nos camundongos, submetidos a estes novos protocolos de imunização, realizamos um ensaio imuno-enzimático com alguns soros dos animais escolhidos aleatoriamente.

Primeiramente, avaliamos a produção de IgG1 específica nos animais sensibilizados com 0,01 μg , 0,1 μg ou a 1,0 μg de albumina 2S de mamona. A microplaca foi sensibilizada com 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de albumina 2S de mamona e, posteriormente utilizamos como anticorpo 1^o (1:500) o soro dos animais imunizados, seguido do anticorpo secundário anti-IgG1 de camundongo HRP (1:5000).

A figura 41 mostra os resultados do acompanhamento da produção de IgG1 após as doses de imunização nos animais imunizados por tratamento. A figura 42A representa o perfil da produção de IgG1 nos animais inoculados com somente PBS, já as figuras 39B, 39C e 39D representam os resultados referentes a produção de IgG1 nos animais que receberam inoculações com 0,01 μg , 0,1 μg ou a 1,0 μg de albumina 2S de mamona, respectivamente.

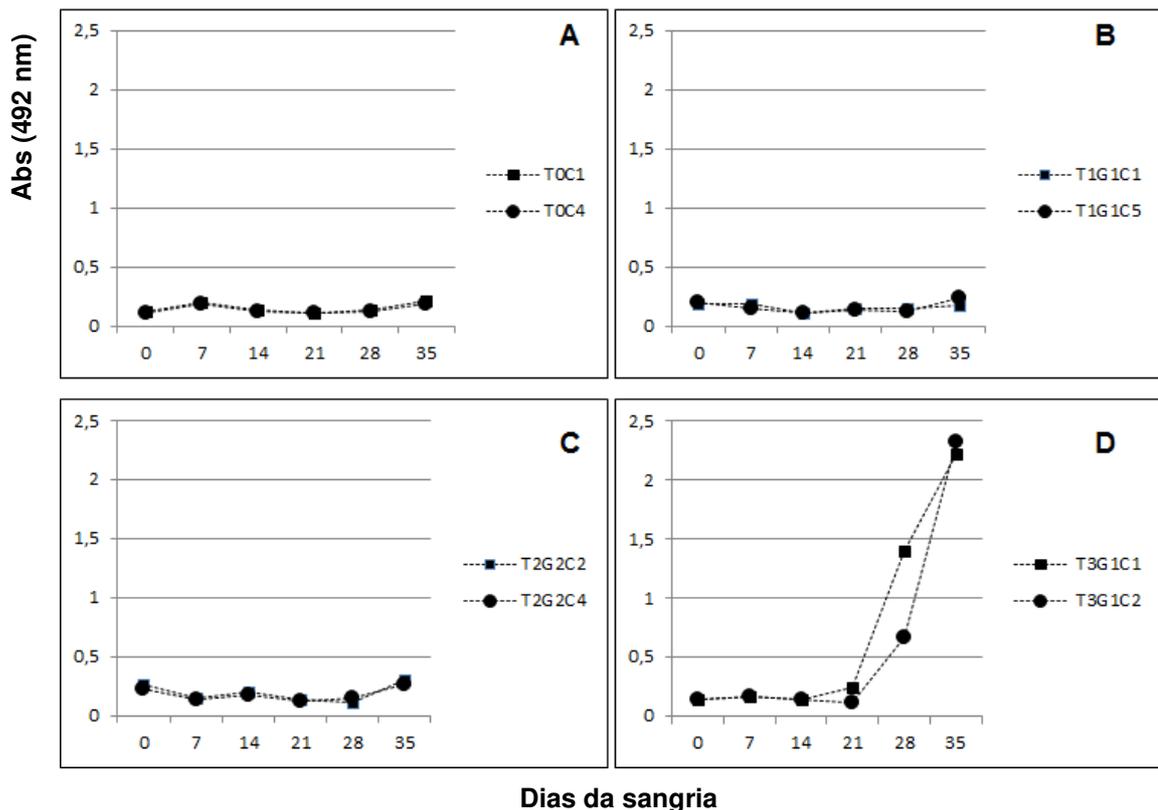


Figura 41: Produção de IgG1 específica em camundongos Balb/c após intervalos de imunizações (i.p.) com PBS (A), 0,01 μg (B), 0,1 μg (C) ou 1,0 μg (D) de albumina 2S de mamona. Legenda: T= Tratamento; G= Grupo; C= Camundongo.

A partir da observação dos gráficos podemos observar uma elevação na produção de IgG1 após a última dose do antígeno, nos animais imunizados com 1,0

μg de albumina 2S de mamona (Figura 41D), enquanto nenhuma alteração significativa na produção deste anticorpo pode ser visualizada no soro dos animais que foram inoculados com PBS, 0,01 μg ou 0,1 μg do antígeno (Figuras 41A, B e C, respectivamente).

Posteriormente a avaliação da produção de IgG1 específica nos animais sensibilizados, partimos então para a detecção da presença de IgE total no soro desses camundongos. Para avaliarmos a presença de IgE total, realizamos um ELISA de captura no qual a microplaca foi sensibilizada com 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do anticorpo monoclonal anti-IgE de camundongo. Neste ensaio, utilizamos o soro dos animais imunizados (1:50), seguido do anticorpo secundário anti-IgE de camundongo biotinizado (1:5000). O resultado para avaliação da produção de IgE total nos animais estimulados com 0,01 μg , 0,1 μg ou a 1,0 μg de albumina 2S de mamona, até o 28º dia de sangria, pode ser observado na figura 42 abaixo.

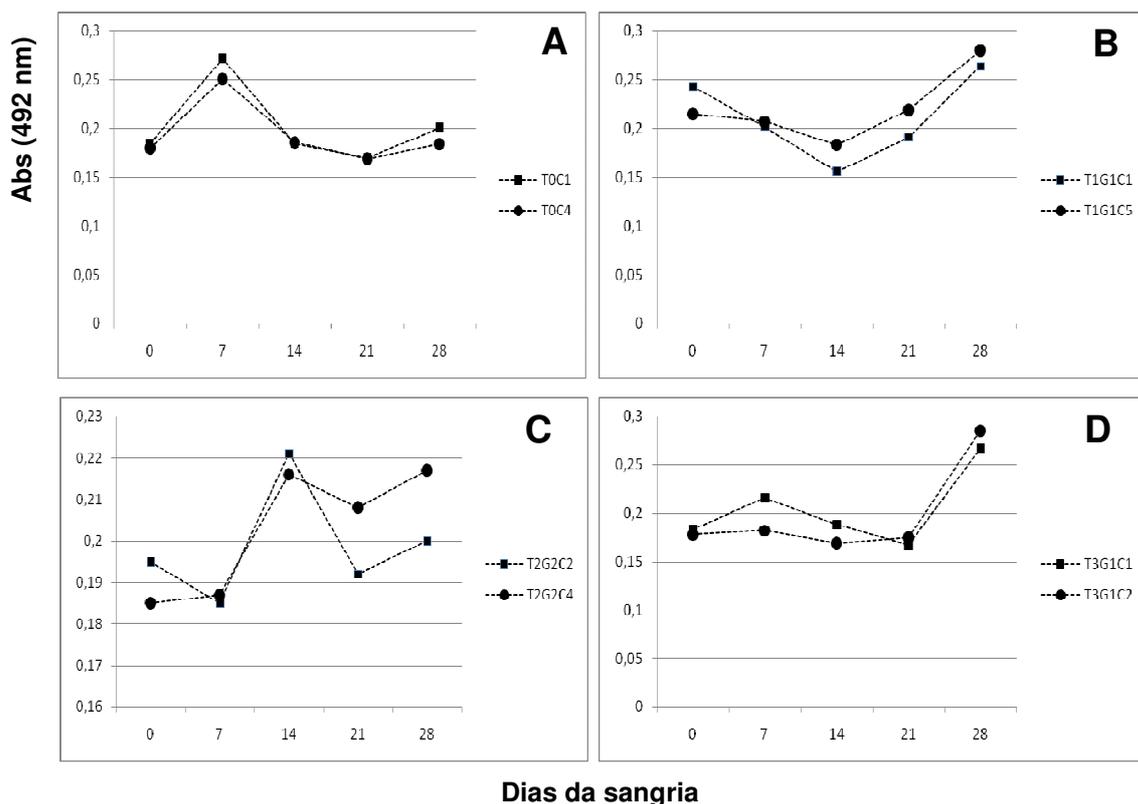


Figura 42: Produção de IgE total em camundongos Balb/c após intervalos de imunizações (i.p.) com PBS (A), 0,01 μg (B), 0,1 μg (C) ou 1,0 μg (D) de albumina 2S de mamona. Legenda: T= Tratamento; G= Grupo; C= Camundongo.

Podemos observar a partir da figura 42 que valores abaixo de 0,3 de absorbância foram quantificados pelo ELISA de captura utilizado para detecção da

presença de IgE total nos soros dos animais sensibilizados com PBS, 0,01 μg , 0,1 μg ou 1,0 μg de albumina 2S de mamona.

Após a realização do ensaio para quantificar IgE total, realizamos outro ensaio imuno-enzimático com a finalidade de detectar a presença de IgE específica no soros dos animais imunizados com albumina 2S. A microplaca foi sensibilizada com 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de albumina 2S de mamona e, utilizamos como anticorpo 1^o (1:50) o soro dos animais imunizados, seguido do anticorpo secundário anti-IgE de camundongo biotilado (1:5000). O resultado deste ensaio pode ser observado na figura 43 abaixo que apresenta o perfil de produção desta imunoglobulina até a 4^a imunização.

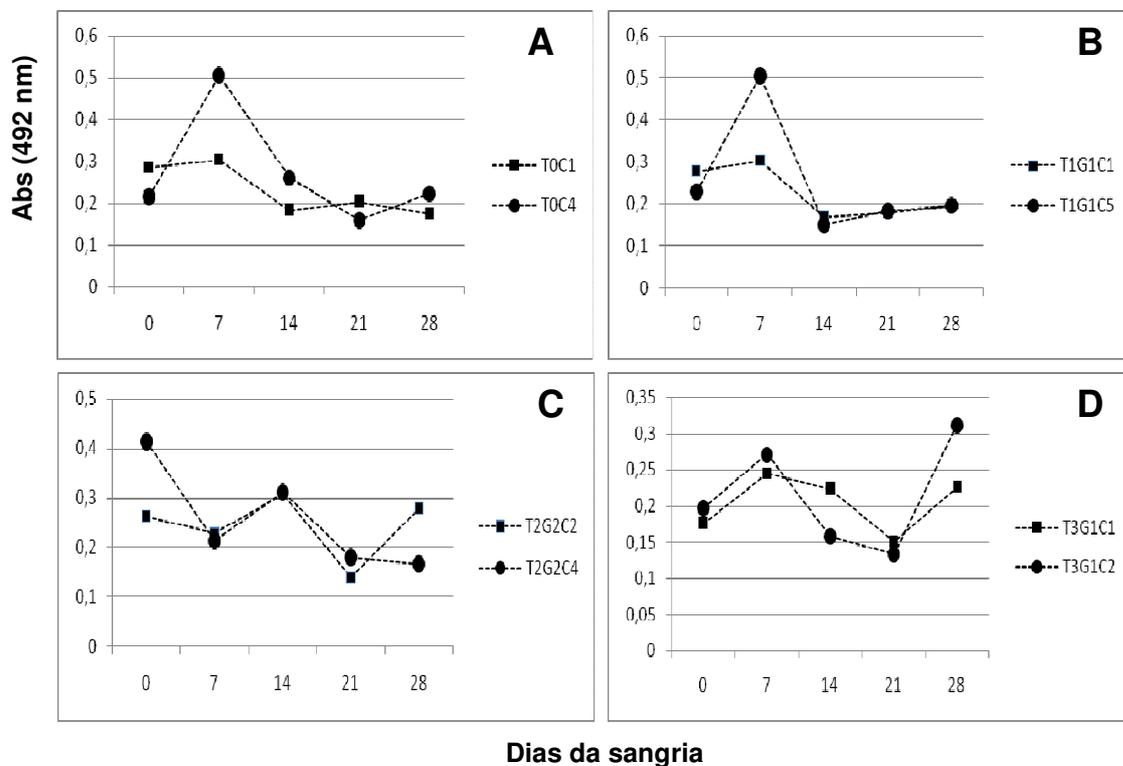


Figura 43: Produção de IgE específica em camundongos Balb/c após intervalos de imunizações (i.p.) com PBS (A), 0,01 μg (B), 0,1 μg (C) ou 1,0 μg (D) de albumina 2S de mamona. Legenda: T= Tratamento; G= Grupo; C= Camundongo.

Os resultados do perfil de produção de IgE específica nos animais imunizados mostram valores baixos, absorvância menor que 0,5, para as amostras dos soros dos animais organizamos nos grupos T0, T1, T2 e T3, figura 43A, B, C e D.

Outros fatores também foram observados e documentados nos animais que participaram deste terceiro protocolo de imunizações. Dentre os fatores observados, o comportamento e algumas características corporais foram avaliados, além do registro dos óbitos ocorridos ao longo das imunizações realizadas.

Sobre o comportamento de alguns animais imunizados notamos que alguns aparentavam uma apatia não condizente com o comportamento de camundongos Balb/c sadios e não imunizados. Com relação as características corporais, observamos que alguns animais apresentaram inchaço do peritônio, caracterizando uma ascite, perda de pelos, além do não desenvolvimento/ganho de peso com o passar dos dias. As características morfológicas dos animais podem ser observadas na figura 44 abaixo.

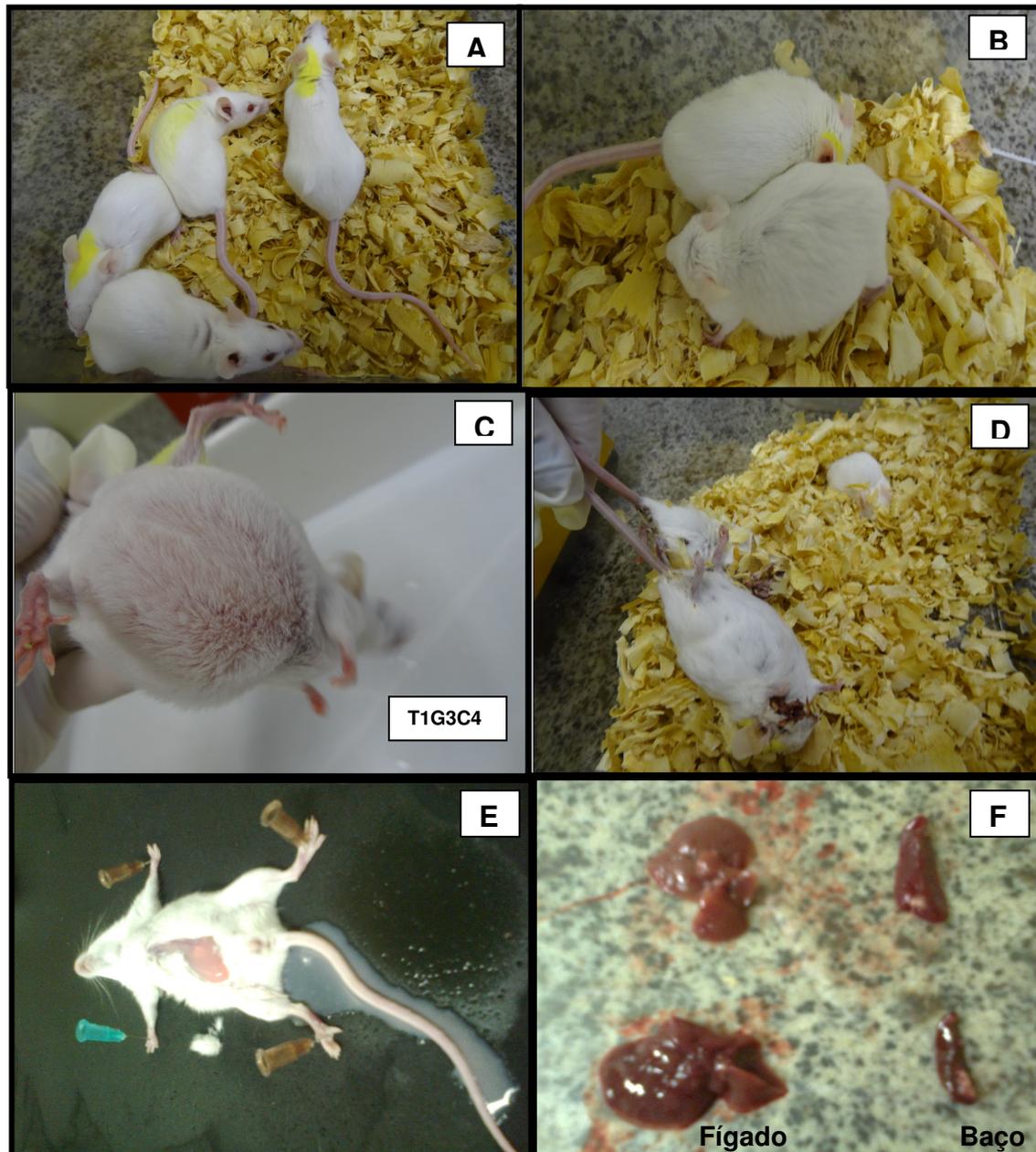


Figura 44: Características morfológicas documentadas nos camundongos submetidos ao terceiro protocolo de imunizações. (A) Grupo T0, animais imunizados com PBS; (B) Comparação entre um animal imunizado e, aparentemente, normal, com um animal imunizado e com inchaço do peritônio; (C) Animal com inchaço do peritônio, imunizado com 0,01 µg de proteína; (D) Retirada de dois animais que vieram a óbito; (E) Líquido extravasado após incisão no peritônio do camundongo com inchaço abdominal; (F)

Comparação entre órgãos de animais imunizados com o alérgeno (superior) e órgãos de animais imunizados com PBS (inferior).

Ao todo, foram utilizados 50 camundongos Balb/c neste protocolo experimental e, para determinar a relação de morte dos animais/amostra inoculada um esquema representativo, tabela IV, foi construído. Nesta tabela constam os óbitos de cada animal/grupo, marcados com preenchimento em cinza, registrados após o período do experimento.

Tabela IV: Esquema representativo dos óbitos dos animais/grupos T0, T1, T2 e T3 observado após o terceiro protocolo experimental.

	0,01 µg (T1)			0,1 µg (T2)			1 µg (T3)		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3
C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4
C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5

Legenda: T= Tratamento/inoculação; G= Grupo; C= Camundongo;
Preenchimento cinza= animal morto

O percentual de óbito dos animais registrado/calculado após 26 dias da última inoculação foi de 20% para o grupo de animais que recebeu inoculações com PBS (T0), de 66,66% para o grupo T1, de 73,33% para o grupo T2 e de 73,33% para o grupo T3 que receberam doses de 0,01 µg, 0,1 µg ou a 1,0 µg de albumina 2S de mamona, respectivamente.

Além da quantificação do percentual dos óbitos dos animais submetidos a este protocolo experimental, o tamanho (da base do rabo até o focinho) e o peso dos camundongos que sobreviveram também foram registrados (tabela V).

Tabela V: Relação de tamanho e peso dos animais/grupos T0, T1, T2 e T3 observado após o terceiro protocolo experimental.

T0 (PBS)		
	P. (g)	T. (cm)
C1	24,1	9
C2	26,1	9
C3	31,8	10
C4	x	x
C5	26,8	10

T1 (0,01 ug de albumina 2s de mamona)								
G1			G2			G3		
	P. (g)	T.(cm)		P.(g)	T. (cm)		P. (g)	T. (cm)
C1	x	x	C1	x	x	C1	28,4	10
C2	25,5	9	C2	x	x	C2	x	x
C3	x	x	C3	x	x	C3	x	x
C4	27,9	9,5	C4	x	x	C4	38,4	9
C5	x	x	C5	18,34	8	C5	x	x

T2 (0,1 ug de albumina 2s de mamona)								
G1			G2			G3		
	P. (g)	T.(cm)		P.(g)	T. (cm)		P. (g)	T. (cm)
C1	x	x	C1	26,1	9,5	C1	x	x
C2	x	x	C2	x	x	C2	x	x
C3	x	x	C3	24	9	C3	29,7	10
C4	x	x	C4	35,2	9	C4	x	x
C5	x	x	C5	x	x	C5	x	x

T3 (1,0 ug de albumina 2s de mamona)								
G1			G2			G3		
	P. (g)	T.(cm)		P.(g)	T. (cm)		P. (g)	T. (cm)
C1	x	x	C1	26,1	9,5	C1	x	x
C2	x	x	C2	x	x	C2	x	x
C3	x	x	C3	24	9	C3	29,7	10
C4	x	x	C4	35,2	9	C4	x	x
C5	x	x	C5	x	x	C5	x	x

4.7.3- Ensaios de bloqueio com aminoácidos livres:

Para avaliarmos a eficácia do bloqueio de IgG1 desencadeado pela incubação do soro imune do camundongo com os aminoácidos livres descritos no item 3.9.2 realizamos ensaio imuno-enzimático. A figura 45 abaixo apresenta os resultados observados após o ensaio de ELISA utilizando o soro (camundongo T3G2C1) após a terceira imunização na presença do agente bloqueador.

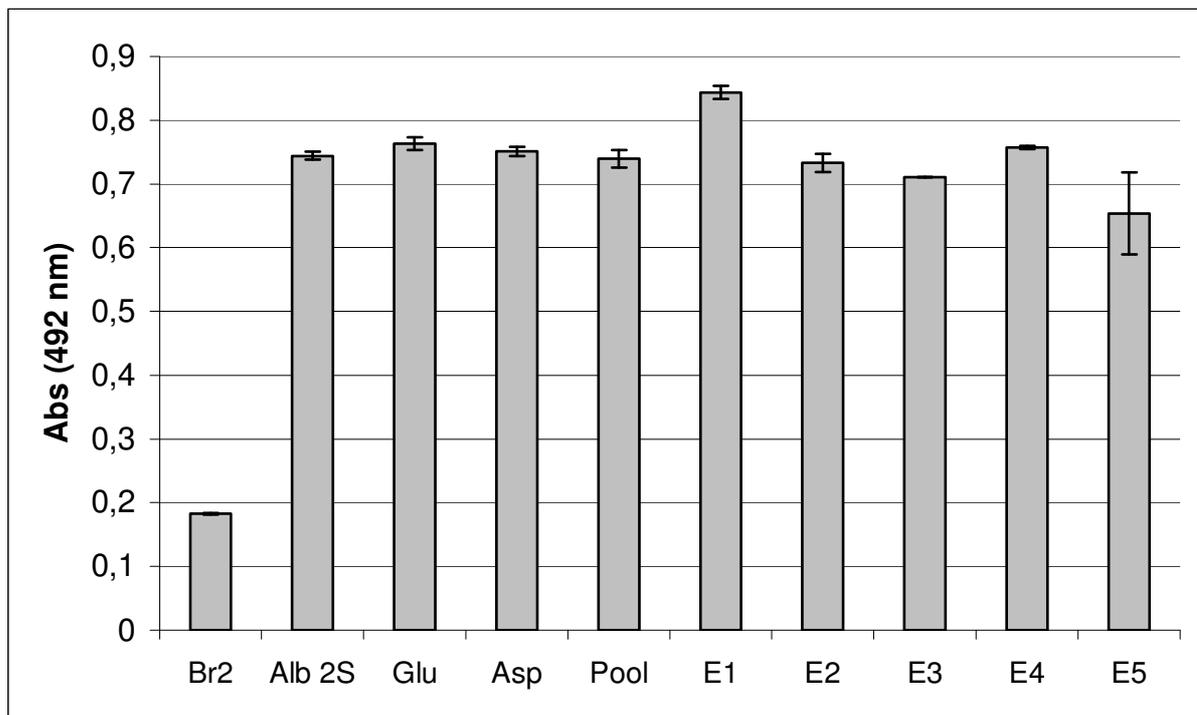


Figura 45: Ensaio imuno-enzimático para avaliar o bloqueio de IgG1 pelos aminoácidos livres. **(Br2):** Branco do ensaio/tampão carbonato-bicarbonato. **(Alb 2S):** Controle positivo: Albumina 2S + soro de camundongo SEM bloqueador. **(Glu):** Soro bloqueado com L-ácido glutâmico. **(Asp):** Soro bloqueado com L-ácido aspártico. **(Pool):** Soro bloqueado com pool de aminoácidos. **(E1):** Soro bloqueado com D- ácido glutâmico. **(E2):** Soro bloqueado com N-metil-L-ácido glutâmico. **(E3):** Soro bloqueado com N-acetil-L-ácido glutâmico. **(E4):** Soro bloqueado com N-(4-nitrobenzoil)-L- ácido glutâmico. **(E5):** Soro bloqueado com N-carbamil-L- ácido glutâmico. Sensibilização da microplaca= 0,2 ug/uL de albumina 2S de mamona; Anticorpo primário= 1:5000; Anticorpo secundário= 1:5000.

Podemos notar, através da figura 45 acima, nenhum bloqueio desencadeado pelos aminoácidos no sítio da IgG1, visto que alterações entre a ligação entre o antígeno (albumina 2S) e o anticorpo (IgG1) presente no soro não foram detectadas. Observamos valores acima de 0,6 de absorvância para todos os soros previamente bloqueados e, em comparação ao controle positivo (Albumina 2S + Soro sem bloqueio) podemos inferir que o bloqueio do sítio da IgG1 não foi ocupado pelos agentes bloqueadores propostos.

5- Discussão:

A primeira proposta deste trabalho foi baseada no tratamento químico do alérgeno isolado e do alérgeno presente na torta de mamona, utilizando compostos de cálcio (hidróxido, carbonato ou óxido de cálcio) a 4 e a 8% com o objetivo de promover modificações químicas nos resíduos de ácidos glutâmicos e, desta forma, reduzir e/ou impedir a capacidade destes epitopos de se ligarem as moléculas de IgE.

Primeiramente, avaliamos as alterações promovidas pelo tratamento na estrutura da albumina 2S por cromatografia de fase reversa (sistema HPLC-C18) e por espectrometria de massas (Synapt G2-S MS). Os resultados das alterações podem ser acompanhados nas figuras 25 e 26. Na figura 25, os perfis obtidos demonstram que a cromatografia da albumina 2S nativa resulta em dois picos majoritários, correspondendo as isoformas Ric c 3 e Ric c 1, respectivamente. Quando a amostra de albumina 2S após o tratamento com hidróxido de cálcio a 4% foi submetida a cromatografia, quatro frações foram geradas, indicando alterações na estrutura da proteína. Resultados similares também foram observados após a comparação dos cromatogramas das amostras de torta de mamona nativa e tratada com hidróxido de cálcio a 4%, figura 26.

As alterações na proteína também foram avaliadas por espectrometria de massas, figuras 27, 28 e 29. Na figura 27, podemos os picos com massas de 11127,1807 e 11484,4404 Da obtidos a partir da amostra da proteína nativa. Em contraste, na amostra tratada quimicamente com óxido de cálcio (solução a 8%) vários fragmentos peptídicos são gerados, figura 28 e 29, picos com massas variando de 683,3227 a 7196,6729 Da. Podemos sugerir, através deste resultado, que houve hidrólise alcalina da proteína, mas, não sabemos se, somente houve a hidrólise da proteína ou se, ocorreu a hidrólise e, concomitante interação eletrostática do ligação do cátion (Ca^{++}) aos aminoácidos ácidos dicarboxílicos presentes nos epitopos de Ric c 1 e de Ric c 3, como era nossa hipótese, figura 46. Esta interação promoveria a ocupação dos radicais dos ácidos carboxílicos e, desta forma, impediria a ligação-cruzada entre o alérgeno e as moléculas de IgE específicas pré-fixadas e, assim, protegeria a ativação e desgranulação de mastócitos e basófilos. No entanto, esta hipótese precisa de mais dados experimentais para ser validada.

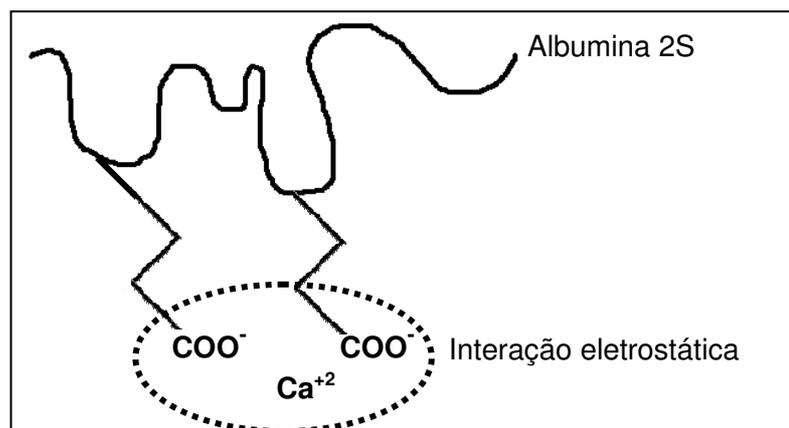


Figura 46: Esquema da interação eletrostática entre o cálcio e as carboxilas dos ácidos glutâmicos (epitopo) presentes na estrutura da albumina 2S de mamona.

Para realizar a caracterização biológica do material tratado a fim de verificar se as alterações promoveram redução do potencial alergênico da albumina 2S de mamona, ensaios biológicos utilizando mastócitos isolados do peritônio de rato foram realizados. Nestes ensaios, os mastócitos foram submetidos a incubação com as amostras tratadas com hidróxido, carbonato ou óxido de cálcio, em duas concentrações (4 ou 8%) na presença de soro anti-albumina 2S de mamona. O resultado da avaliação da alergenicidade foi obtido por microscopia óptica através de contagem diferencial entre células íntegras e desgranuladas, figura 32 e 33. Desta forma, observamos que as amostras do alérgeno isolado ou presente na torta de mamona, após os tratamentos com os compostos de cálcio, quando incubados com mastócitos de rato, apresentaram redução na desgranulação destas células de 70% para valores observados no controle negativo, aproximadamente 30%. Podemos concluir que todos os tratamentos com compostos de cálcio, promoveram a redução da alergenicidade das amostras de albumina 2S, mostrando-se eficazes.

Além da caracterização da atividade alergênica, também avaliamos as alterações promovidas na toxicidade da torta de mamona pelo tratamento químico com os compostos de cálcio. Desta forma, realizamos a caracterização da atividade tóxica da ricina por ensaio de citotoxicidade usando células Vero. Neste ensaio, a viabilidade celular e a dosagem da enzima LDH foram realizadas, como pode ser observado nos resultados apresentados nas figuras 34 e 35, respectivamente. Observamos que as células quando incubadas com as amostras tratadas com carbonato de cálcio, nas duas concentrações, morriam e liberavam, conseqüentemente a enzima LDH, representando um tratamento não eficaz para

destoxificar a ricina presente neste material. Em contrapartida, células incubadas com torta de mamona tratada com óxido ou com hidróxido de cálcio, ambos a 8%, proliferavam e, a LDH não pode ser detectada no sobrenadante celular, mostrando-se um tratamento eficaz para destoxificar este material. Comprovando os resultados *in vitro* dos ensaios de toxicidade do material após o tratamento com os compostos de cálcio, Almagro em 2013 realizou um trabalho *in vivo* com lambari (*Astyanax bimaculatus*) com o objetivo de avaliar o uso da torta de mamona tratada como componente da ração. Para isso, foram testados rações contendo 7, 14, 21 ou 28% de torta de mamona tratada com 8% de óxido de cálcio. Realizou-se o pré-teste, seguido de validação em viveiros, no qual, após 70 dias, alguns animais foram retirados para determinações gravimétricas (peso e tamanho), dosagens das enzimas transaminases (TGP e TGO e creatino quinase), além da análise morfológica de tecidos hepático, adiposo e intestinal. Como resultados, observou-se que os alevinos alimentados com rações contendo torta de mamona cresceram de forma similar aos alevinos alimentados com ração padrão (controle), atingindo tamanho e pesos adequados para o abate após 70 dias. Observou-se também que não houve alterações nos valores das enzimas investigadas e, no aspecto dos tecidos hepáticos, adiposo e intestinais. Esses resultados indicam que a torta de mamona destoxificada pode ser incluída na alimentação de lambaris sem prejuízo para o seu cultivo em sistema semi-intensivo de produção.

De maneira geral, estratégias que agreguem valor à torta e aumentem o número de aplicações têm sido propostas na literatura. Muitas pesquisas estão sendo realizadas em todas as partes do mundo visando eliminar fatores, como a toxina ricina e o alérgeno CB-1A, que impedem a sua plena utilização. Alguns trabalhos apresentam (Perrone e colaboradores em 1966 e Kling em 1974) metodologias, já testadas e patenteadas em diversos países, demonstrando a possibilidade de destoxificar a torta de mamona pelo seu cozimento. Em 1940, Pertrozyan e Ponomarev (citados por Kling, 1974) apontaram um processo de destoxificação que consistia em ferver a torta repetidamente, por curtos períodos de tempo, com mudança de água após cada fervura. Do mesmo ano até 1942 algumas patentes foram concedidas para processos de destoxificação da torta de mamona em diferentes partes do mundo.

Em 1960, Gardner e colaboradores testaram diferentes processos para destoxificação da torta de mamona combinando diferentes temperaturas, adição de

produtos químicos e outros processos, desde a adição de produtos alcalinos à fermentação aeróbia, não levando em consideração a viabilidade industrial nem econômica e tampouco as características nutricionais e a palatabilidade do produto obtido. Este foi um primeiro relato sobre a tentativa de desenvolver um método para destoxificação e, ao mesmo tempo, a desalergenização da torta de mamona. As metodologias desenvolvidas por estes pesquisadores foram eficazes, mas ainda precisavam de avaliação quanto ao custo e a palatibilidade do produto obtido. De maneira análoga, Freitas, em 1974, avaliou a destoxificação e desalergenização da torta de mamona pelo uso de radiação ionizante, concluindo que o processo foi capaz de eliminar ambos os fatores antinutricionais.

Gandhi e colaboradores em 1994 propuseram um novo método para destoxificação que consistia na mistura da torta de mamona com a torta da planta *Shorea robusta* que também é tóxica devido ao alto teor de tanino o qual precipita a ricina.

Não existem processos industriais viáveis de destoxificação da torta de mamona, porém em processos experimentais de pequena escala, como na área acadêmica, a destoxificação é obtida por tratamento térmico, como a autoclavagem (FREIRE *et al.*, 2007). Poucas metodologias visando à desativação dos alérgenos presentes na torta de mamona foram propostas, e nenhuma delas realmente atingiu resultados satisfatórios que possibilitasse o emprego industrial.

Em 2006, a inativação do alérgeno de mamona (CB-1A) foi descrita por KIM, pela utilização de aquecimento conjugado a tratamentos químicos (NaOH e NaOCl). Segundo o autor, o alérgenos demonstrou um decréscimo drástico em sua atividade alergênica, desaparecimento de bandas na eletroforese, quando a temperatura (70°C) foi associada aos compostos químicos. No ano de 2008, GODOY promoveu estudos experimentais das condições de cultivo do fungo *Penicillium simplicissimum* para produção de lipases em rejeito de mamona e, de forma indireta, obteve, após a fermentação em estado sólido submetida ao rejeito, um produto destoxicado, ou seja, sem a presença da ricina.

Por fim, podemos citar algumas vantagens da utilização dos compostos de cálcio para modificarn alérgenos e toxinas: esses compostos são amplamente utilizados como suplementos alimentares (Guéguen *et al.*, 2000; Water *et al.*, 2000) e, se constituem reagentes economicamente viáveis para serem utilizados em escala industrial.

Sabendo da importância de pesquisar a dispersão de alérgenos pelo ar, realizamos a coleta material aerobiológico em regiões de cultivo de oleaginosas para verificar a presença/dispersão de alérgenos da classe das albuminas 2S. Para tanto, equipamento de coleta de material particulado para pequenos volumes foi mantido na plantação de pinhão-manso, funcionando por 6 horas diárias durante cinco dias, na ausência ou na presença de inflorescência. Podemos notar que somente as amostras provenientes de extratos de filtros coletados na presença da inflorescência (F.C.) de pinhão-manso apresentaram-se positivas para a presença de albumina 2S de pinhão-manso, figura 37. Podemos ainda discutir que, quando comparado ao controle positivo, contendo 100 pg/uL de albumina 2S (O.D. = 1,5 nm) de pinhão-manso, as amostras extraídas do filtro na presença de inflorescência (F.C.) apresentaram valores de absorvância (O.D. = 1,084 nm) que indicam uma quantidade maior que 50 pg/uL de albumina 2S extraída deste material. Este resultado comprova que proteínas alergênicas da classe das albuminas 2S estão sendo dispersas no ar e, podem ser deflagradoras de sensibilização da população.

A exposição ao alérgeno determina a sensibilização e os sintomas alérgicos desencadeados pelo contato com o alérgeno. Entendendo que o estudo aerobiológico consiste de pesquisas que possibilitem a adoção de estratégias de prevenção/tratamento da população, várias pesquisas aerobiológicas a fim de quantificar/identificar a distribuição e prevalência de pólenes são realizadas em países da Europa (BUTERS *et al.*, 2013; ZIELLO *et al.*, 2012; FERNANDEZ-LLAMAZARES *et al.*, 2012), da Ásia (XIAO *et al.*, 2013; HAO *et al.*, *al.*, 2013; MANDAL *et al.*, 2012), da Oceania (ERBAS *et al.*, 2013.) e das Américas (DARROW *et al.*, 2012; EFSTATHIOU *et al.*, 2011; MURRAY *et al.*, 2010).

Nesse sentido, o estudo publicado em 2013 por Buters e colaboradores, apresenta a exposição ao pólen do principal componente alergênico de bétula - Bet v 1 (*Betula verrucosa*). Neste trabalho, os autores demonstram a pesquisa realizada em cinco países europeus (França, Reino Unido, Alemanha, Itália e Finlândia) monitorando as concentrações atmosféricas de grãos de pólen e do alérgeno de bétula através do projeto financiado pela União Européia, denominado HIALINE (*Health Impacts of Airborne Allergen Information Network*). A média de dispersão do pólen de bétula foi de 3,2 pg de Bet v 1/pólen e, esta concentração não variou muito entre os países europeus. Como conclusão, os autores afirmam que monitorar os

alérgenos em associação ao pólen disperso no ambiente poderia ser uma melhor estratégia para avaliação de exposição ao alérgeno.

O trabalho de Ziello e colaboradores (2012) que apresenta a avaliação das alterações à contagem de pólen presente na atmosfera em toda a Europa. Os autores analisaram 1221 tipos diferentes de pólenes, em 97 locais, distribuídos em 13 países europeus em um período de 10 a 28 anos entre 1977 a 2009. Este estudo realizou uma análise em escala continental e revelou uma tendência ao aumento no valor anual das taxas de pólen no ar na Europa, sendo mais acentuada nas áreas urbanas do que nas áreas semi-rural/rural. Não foram identificados motivos/relações claras para o aumento na distribuição de pólen na atmosfera. Desta forma, os autores apontam a necessidade de mais pesquisas aerobiológicas visto que, as alterações climáticas podem resultar em aumentos das quantidades de pólenes que conduzem a uma maior exposição de seres humanos a alérgenos presentes nos mesmos, com consequências potencialmente graves para a saúde pública.

Efstathiou e colaboradores em 2011 apresentam um sistema de modelagem utilizado para estimar a dinâmica de emissões e de transporte de pólen nos Estados Unidos. Este estudo incluiu a simulação de níveis de pólen no ar da planta *Betula verrucosa* (Bet v 1) durante o mês de abril de 2002 e, dos níveis do pólen de ervas durante o mês de setembro de 2002, de acordo com os correspondentes períodos de polinização. Este estudo apresentou o desenvolvimento de um novo sistema de modelagem para investigar a dinâmica de emissão e transporte de pólen. Sabendo que o aeroalérgeno Bet v 1 é a principal causa de alergias do tipo I observado no início da primavera na Europa e América do Norte, pesquisas que avaliam o grau de dispersão são de extrema importância pois, permitem estimar de forma simultânea a distribuição de vários alérgenos e outros poluentes do ar.

Com relação a sensibilização frente às albuminas 2S presentes em sementes e pólen de mamona sabe-se que o primeiro relato de alergia causada em uma comunidade por uma indústria de extração de mamona foi feito no ano de 1928 em Toledo, Ohio, EUA. Após este caso, diversos relatos foram feitos: Alemanha (1942), Figline Valdarno, Itália (1949), Tchecoslováquia (1949), Hungria (1950), Bauru, no estado de São Paulo (1953), África do Sul (1953) e outros (ICOA, 1989).

Na tentativa de caracterizar albuminas 2S no pólen de pinhão-mansão, nos propomos neste trabalho a determinar a presença de proteínas alergênicas em extratos de inflorescências de pinhão-mansão. Porém, ao realizarmos a extração

proteica de toda a inflorescência, aberta ou fechada, não obtivemos sucesso na detecção desta classe de proteínas no material, nem por SDS-PAGE 15% corado por comassie ou por prata, nem por ensaios específicos como ELISA-IgG e dot-blotting. Com relação a este fato, podemos discutir que a etapa de extração não foi satisfatória, a concentração das proteínas alergênicas em relação ao montante de todas as outras proteínas presentes na inflorescência é muito pequena e, mais material deveria ser acumulado para a detecção destas proteínas neste material. Além disso, outras técnicas, mais eficientes, para isolamento e extração devem ser empregadas para resolver este problema, como a imunolocalização, visto que o grão de pólen é bem pequeno.

Considerando que o conhecimento da estrutura dos alérgenos concomitante com a elucidação dos epitopos alergênicos é um passo fundamental para o tratamento imunoterápico, diversos grupos têm se envolvido neste desafio utilizando várias estratégias metodológicas. Desta forma, o nosso grupo de pesquisa estuda, há alguns anos, a estrutura da albumina 2S de mamona demonstrando a importância de ácidos glutâmicos na formação dos epitopos de ligação à IgE. A metodologia empregada para comprovar esta teoria foi a utilização do bloqueio do sítio de ligação da IgE ao antígeno usando aminoácidos livres, ácido glutâmico ou ácido aspártico, como agentes bloqueadores. Esta hipótese foi confirmada através do trabalho realizado por Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011 (Apêndice), que demonstrou por ensaios de bloqueio *in vitro*, resultados positivos quando incubava-se a IgE anti-albumina 2S com estes agentes bloqueadores. Sendo assim, a última proposta deste trabalho foi verificar a funcionalidade do bloqueio da molécula de IgE com os agentes bloqueadores em ensaios *in vivo*.

Neste sentido, testes preliminares com animais a fim de estabelecer estratégias de imunizações que permitiriam a realização dos ensaios de bloqueio, com os aminoácidos livres anteriormente descritos foram realizados. Para alcançarmos esta meta, três diferentes protocolos de imunizações foram empregados com conseqüente acompanhamento da resposta imunológica dos animais. No primeiro protocolo de imunização, ao estimularmos camundongos com 50 µg de albumina 2S purificada de sementes de mamona na presença de adjuvante (2,0 mg de hidróxido de alumínio) observamos que os animais morreram antes da dose de reforço. A partir deste fato, alterações na dose do antígeno a ser aplicada nos próximos ensaios *in vivo* foram propostas, além de novas alternativas para

melhorar as imunizações. Desta forma, um segundo protocolo de imunização, com concentrações de antígenos alteradas, foi iniciado. Neste protocolo utilizamos 10 µg de albumina 2S de mamona com 5,0 mg de hidróxido de alumínio como adjuvante. Observamos que nestas condições os animais apresentavam-se saudáveis. Os soros foram, primeiramente, avaliados quanto a produção de IgG/IgM específica, nos quais, observamos que os animais submetidos a este protocolo experimental estavam sendo estimulados ao longo do protocolo de imunizações (Figura 39). Desta forma, nosso próximo passo foi avaliar o padrão de resposta para detectarmos a presença de IgE específica, visto que, todo nosso conhecimento com relação ao bloqueio usando aminácidos livres era realizado com epitopos de IgE. Nesse sentido, o padrão de resposta foi avaliado através da pesquisa de imunoglobulinas características de cada padrão. Podemos observar através da análise da figura 39 que o soro dos camundongos imunizados com 10 µg do antígeno apresentam altos títulos de IgG1 específica, caracterizando um padrão do tipo Th2 porém, não conseguimos observar altos níveis de IgE específica ou total no soro desses animais através deste ensaio. Desta forma, acreditamos que os níveis de IgG1 eram tão elevados no soro destes animais que estariam mascarando/inibindo a ligação da IgE específica, impossibilitando assim a sua detecção. Para tentar comprovar esta hipótese e solucionar nossos problemas de detecção de IgE específica, realizamos ensaios de imunoabsorção do soro utilizando proteína A-agarose 6MB. A realização da separação da IgE da IgG foi um etapa importante pois, o princípio dos ensaios de bloqueio com albumina 2S de mamona se baseiam no conhecimento dos epitopos de IgE. Podemos observar através da figura 38, os resultados do ensaio imunoenzimático realizado no material obtido após a imunoabsorção. Nesta figura, notamos que não houve a separação da IgG1 presente no soro a partir desta técnica, sendo detectada tanto no sobrenadante quanto no precipitado/eluído obtido após a cromatografia de afinidade. Quando pesquisamos a presença de IgE específica ou total no material obtido após cromatografia observamos pequenos valores de absorbância < que 0,5, após a leitura do ensaio a 485 nm. Estes resultados indicam que os animais submetidos a este segundo protocolo de imunização não estavam produzindo IgE anti-albumina 2S mas, outras classes de imunoglobulinas. Sabendo que o switching de classe somente ocorre uma vez, decidimos coletar o sangue desses animais para obtermos

o soro rico em IgG1 anti-albumina 2S e, posteriormente sacrificá-los, além de iniciar um novo protocolo de imunização.

Os resultados do segundo protocolo de imunização demonstraram que os animais submetidos a imunização não foram estimulados para produção de IgE específica. Desta forma, buscamos na literatura dados que dirigissem alterações no nosso protocolo de imunização e, encontramos um trabalho de 2010 intitulado “Antigen dose-dependent suppression of murine IgE responses is mediated by CD4⁺ CD8⁻ double-negative T cells.” (Barwig et al., 2010). Neste trabalho, os autores evidenciam a importância da dose do antígeno para produção de IgE específica, ou seja, observou-se que o uso de pequenas concentrações do antígeno induzem maior produção de IgE específica quando comparada a doses elevadas.

Partindo dos resultados apresentados por Barwig e colaboradores em 2010, elaboramos uma nova estratégia para as imunizações dos camundongos com o intuito de reduzir a concentração do antígeno e, acompanhar a resposta imune indizada nos animais. Nesse sentido, o terceiro, e último, protocolo de imunização aplicado neste trabalho consistiu da utilização de maior número de animais separados em grupos, como pode ser observado na tabela 2. Cada animal do grupo, denominado T1, T2 e T3, recebeu a concentração de 0,01 µg, 0,1 µg ou com 1,0 µg de albumina 2S de mamona na presença de 4 mg de de hidróxido de alumínio como adjuvante, respectivamente. Utilizamos também animais controle negativo que receberam somente injeções contendo PBS, enquadrados no grupo T0. Neste protocolo realizamos cinco imunizações em intervalos de 14 dias, com coletas de sangue realizadas antes da primeira imunização (pré-imune) e após cada inoculação, com intervalos de 7 dias após cada inoculação.

Primeiramente observamos neste terceiro protocolo de imunizações a produção de IgG1 específica nestes animais. O acompanhamento da produção deste anticorpo foi necessário, pois a concentração desta imunoglobulina apresentou-se majoritária nos protocolos de imunizações aplicados anteriormente. Desta forma, podemos observar através da análise dos gráficos apresentados na figura 41 uma elevação na produção de IgG1 após a última dose do antígeno, nos animais imunizados com 1,0 µg de albumina 2S de mamona (Figura 41D), enquanto nenhuma alteração significativa na produção deste anticorpo pode ser detectada no soro dos animais que foram imunizados com PBS, 0,01 µg ou 0,1 µg do antígeno (Figuras 41A, B e C, respectivamente). Estes resultados nos incentivaram a

continuar a pesquisa de IgE total e específica no soro dos animais que estavam sendo submetidos a este terceiro protocolo de imunização, visto que, a não produção de IgG1 específica em alguns grupos (T0, T1 e T2) sugere a produção de outras classes de imunoglobulinas. A figura 42 apresenta os resultados observados para a produção de IgE total. Pudemos observar que valores abaixo de 0,3 de absorvância foram detectados para a presença de IgE total nos soros dos animais sensibilizados com PBS, 0,01 µg, 0,1 µg ou 1,0 µg de albumina 2S de mamona através de ensaios de ELISA. Resultados similares foram observados quando pesquisamos IgE específica no soros dos animais, figura 43. Observamos valores de absorvância menor que 0,5, para a pesquisa de IgE específica nas amostras dos soros dos animais organizamos nos grupos T0, T1, T2 e T3, figura 43A, B, C e D. Além da não indução da produção de IgE específica nesses animais, observamos alterações comportamentais (apatia, inchaço peritônio, etc.) e, alta porcentagem (acima de 60%) de óbitos entre os grupos de animais que receberam as doses do alérgeno.

Por fim, o soro imune dos animais, contendo IgG1 anti-albumina 2S de mamona, foi incubado com agentes bloqueadores a fim de verificar o bloqueio do sítio de ligação da IgE ao antígeno usando aminoácidos livres. Realizamos ensaios de bloqueio utilizando o soro incubado, separadamente, com oito diferentes aminoácidos livres [L-ácido glutâmico, L-ácido aspártico, pool de aminoácidos, D-ácido glutâmico, N-metil-L-ácido glutâmico, N-acetil-L-ácido glutâmico, N-(4-nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico ou com N-carbamil-L-ácido glutâmico]. Observamos através da figura 45 que nenhum bloqueio pode ser detectado após a incubação do soro com os agentes bloqueadores e, em comparação ao controle positivo (Albumina 2S + Soro sem bloqueio) podemos inferir que o bloqueio do sítio da IgG1 não foi ocupado pelos agentes bloqueadores propostos. Este resultado sugere que a eficácia da nossa proposta de terapia utilizando aminoácidos livres só funciona para bloquear epitopos de IgE, não funcionando para a classe de IgG1.

Sabemos que vários trabalhos experimentais utilizam camundongos Balb/c como modelo animal em ensaios de alergia, pois os mesmos desenvolvem resposta do tipo Th2 e produção de IgE (OEFNER *et al.*, 2012, BAILÓN *et al.*, 2012, SHIBAMORI *et al.*, 2006, KIMBER *et al.*, 2003, ADEL-PATIENT *et al.*, 2000). Porém, os resultados obtidos com os protocolos experimentais aplicados neste trabalho não foram condizentes com a literatura, ou seja, não observamos indução de produção

de IgE. De acordo com dados obtidos neste trabalho, podemos discutir que as estratégias de imunizações dos animais, etapa preliminar para a realização dos ensaios de bloqueio *in vivo*, precisam ser melhor estudadas/conduzidos. Vários fatores podem interferir na produção de IgE específica num organismo imunizado e, desta forma, precisamos aprimorar os ensaios com relação à indução de IgE específica em camundongos utilizando como antígeno albumina 2S. Algumas mudanças no protocolo experimental de imunização devem ser realizadas para melhorar os resultados de produção de IgE, por exemplo, alterações na via de inoculação, na dose do antígeno e/ou nos adjuvantes empregados.

6- Conclusão:

- Modificações nos epítopos alergênicos das albuminas 2S foram observadas após o tratamento com os compostos de cálcio. Este tratamento também promoveu alterações na atividade biológica da proteína tóxica de mamona. Essas alterações foram confirmadas por ensaios de atividade biológica que revelaram a redução da alergenicidade e da toxicidade dos materiais tratados. Através da desativação de alérgenos e toxinas por tratamento químico com compostos de cálcio um produto mais seguro para a manipulação humana e, com maiores aplicações econômica (alimentação animal) pode ser obtido.
- Proteínas da classe das albuminas 2S de pinhão-mansão estão sendo dispersas pelo ar e, estes alérgenos podem ser deflagradores de sensibilização da população.
- Animais imunizados com albumina 2S de mamona apresentaram padrão de resposta Th2 (altos títulos de IgG1 anti-albumina 2S). Alterações nos protocolos de imunizações precisam ser realizadas, pois observamos baixos título de IgE total ou específica e, alta porcentagem (60%) de óbito dos animais. Aminoácidos livres não bloquearam a molécula de IgG1, sugerindo que a eficácia da nossa proposta de terapia utilizando aminoácidos livres só funciona para bloquear epítopos de IgE.

Referências Bibliográficas

Aalberse, R.C. (2000) Structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106: 228-238.

Adel-patient, K., Créminon, C., Bernard, H., Clément, G., Négroni, L., Frobert, Y., Grassi, J., Wal, J., Chatel, J. (2000) Evaluation of a high IgE-responder mouse model of allergy to bovine b-lactoglobulin _BLG/: development of sandwich immunoassays for total and allergen-specific IgE, IgG1 and IgG2a in BLG-sensitized mice. *Journal of Immunological Methods*. 235: 21–32.

Aggizio, A.P., Carvalho, A.O., Ribeiro, S.F.F., Machado, O.L.T., Aves, E.W., Bloch J.R.C., Okorokov, L.A., Samarao, S.S., Prates, M.V., Gomes, V.M. (2003) A 2S albumin homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the médium by *Fusarium oxisporum*. *Archives of Biochemistry and Biophics* 46: 188-195.

Ahn, Y.J., Chen, G.Q. (2007) Temporal and Spatial Expression of 2S Albumin in Castor (*Ricinus communis* L.) *Journal Agricultural and Food Chemistry* 55: 10043–10049.

Albertini, R., Ugolotti, M., Peveri, S., Valenti, M.T., Usberti, I., Ridolo, E., Dall'Aglio, P. (2012) Evolution of ragweed pollen concentrations, sensitization and related allergic clinical symptoms in Parma (northern Italy) *Aerobiologia* 28: 347-354

Alekseeva, L., Nekrasov, A., Marchenko, A., Shevchenko, M., Benevolenskii, S., Sapozhnikov, A., Kurup, V.P., Svirshchevskaya, E. (2007) Cryptic B-cell epitope identification through informational analysis of protein sequences. *Vaccine* 25: 2688–2697.

Anadan, S., Anil Kumar, G. K., Ghosh, J., Ramachandra, K. S., (2005) Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. *Animal Feed Science and Technology*. 120: 159–168.

Anand, P., Singh, B., Jaggi, AS., Singh, N. (2012) Mast cells: an expanding pathophysiological role from allergy to other disorders. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 385:657–670

Arshad, S. H., Bateman, B., Sadeghnejad, A., Gant, C. E Matthews, S. M. (2007) Prevention of allergic disease during childhood by allergen avoidance: the Isle of Wight prevention study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 307–313.

Azevedo, D.M.P., Lima, E.F. (2001) *O agronegócio da mamona no Brasil*. 1ª ed. Editora Embrapa, 504p.

Bailón, E., Cueto-sola, M., Utrilla, P., Rodríguez-ruiz, J., Garrido-mesa, N., Zarzuelo, A., Xaus, J., Gálvez, J., Comalada, M. (2012) A shorter and more specific oral sensitization-based experimental model of food allergy in mice. *Journal of Immunological Methods*. 381:41–49.

Bandeira, D.S., Cartaxo, W.V., Severino, L.S., Beltrão, N.E.M. (2004) *Resíduo industrial da mamona como fonte alternativa na alimentação animal*. I Congresso Brasileiro de Mamona. Campina Grande – PB

Barnwal, B.K., Sharma, M.P. (2005) Prospects of biodiesel production from vegetable oils in Índia. *Renewable & sustainable energy reviews* 9: 363-378.

Basciano, L.K., Berenstein, E.H., Kmak, L., Siraganian, R.P. (1986) Monoclonal-antibodies that inhibit IgE binding. *Journal of Biological Chemistry* 261: 1823- 1831.

Bax, H.J., Keeble, Gould, H.J. (2012) Cytokinergic IgE action in mast cell activation. *Frontiers in Immunology* 3:1-16.

Beltrão, N. E. M., Azevedo, D. M. P. Fitologia. In: Azevedo, D. M. P.; Beltrão, N. E. M. (2007) *O agronegócio da mamona no Brasil*. 2ª ed. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 504p.

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. (2007) *O agronegócio da mamona no Brasil*. 2ª ed. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 504p.

Bewley, J.D.; Black, M. (1994) *Physiology of development and germination*. New York: Plenum Press.

Bist, A., Pandit, T., Bhatnagar, A.K., Singh, A.B. (2004) Variability in protein content of pollen of Castor bean (*Ricinus communis*) before and after exposure to the air pollutants SO₂ and NO₂. *Grana*. 43: 94-100

Bom, J.H. (1977) *Solubilização das proteínas da mamona por enzimas proteolíticas*. Dissertação de Mestrado. UFRJ, Rio de Janeiro, 136p.

Boyce, J.A. Mast cells: beyond IgE. (2003) *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 11: 25-32.

Bradding, P. (1999) Allergen immunotherapy, mast cell. *Clinical and experimental Allergy* 29:1445-1448.

Brandt, N.N., Chikishev, A.Y., Sotnikov, A.I., Savochkina, Y.A. Agapov, I.I., Tonevitsky, A.G. (2005) Ricin, ricin agglutinin, and the ricin binding subunit structural comparison by Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*. 735: 293-298.

Breiteneder, H., Mills, E.N.C. (2005) Plant food allergens – structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology Advances* 23: 395-399

Breiteneder, H., Radauer, C. (2004) A classification of plant food allergens. *Journal Allergy and Clinical Immunology* 113: 821-30.

Brito, M. F., Tokarnia, C. H. (1996) Intoxicação experimental pelas sementes trituradas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) em coelhos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 16: 1-7.

Buters, J.T.M, Thibaudon, M., Smith, M., Kennedy, R., Rantio-Lehtimäki, A., Albertini, R., Reese, G., Weber, B., Galan, C., Brandao, R., Antunes, C.M., Jäger, S., Berger, U., Celenk, S., Grewling, Q., Jackowiak, B., Sauliene, I., Weichenmeier, I., Pusch, G., Sarioglum, H., Ueffingm, M., Behrendt, H., Prank, M., Sofiev, M., Cecchi, L. (2012) Release of Bet v 1 from birch pollen from 5 European countries. Results from the HIALINE study. *Atmospheric Environment* 55, 496e505

Carrielo-Gama, C. (2006) *Desenvolvimento de uma tecnologia para desativar epítomos alergênicos de Ricinus communis (mamona)*. Monografia - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil.

Cartaxo, W.V., Beltrão, N.E. de M., Silva, O.R.R.F. da, Severino, L.S., Suassuna. N.D., SOARES, J.J. (2004) *Cultivo da mamona no semi-árido brasileiro*. Campina Grande: EMBRAPA/CNPA, 20p. (EMBRAPA Algodão. Circular Técnica, 77)

Carvalho, L.O. de. (1988) *Cultura da mamoneira*. Campinas: CATI, 3p. (CATI. Comunicado técnico, 73).

Chierice, G. O., Neto, S. C. Aplicação industrial do óleo. In: Azevedo, D. M. P.; Beltrão, N. E. M. (2007) *O agronegócio da mamona no Brasil*. 2^o ed. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 504p.

Cohon, A., Porto Neto, A.C., Galvão, C., Marcelino, F., Guedes, H., Tebyriçá, J.N., Barros, M.A.M.T., Rosário Filho, N.A., Rubini, N.P.M., Belluco, P., Pitchon, R., Borges, W., Vieira, S.E. *Autoria: Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia Sociedade Brasileira de Pediatria Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina*. Imunoterapia Alérgeno-Específica, 15 de julho de 2011

Cook, D. L., David, J., Griffiths, G. D. (2006) Retrospective identification of ricin in animal tissues following administration by pulmonary and oral routes. *Toxicology* 223: 61-70

Corry, D.B., Kheradmand, F. (1999) Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 402: B18-23.

Darrow, L.A., Hess, J., Rogers, C.A., Tolbert, P.E., Mitchel Klein, M., Sarnat, S.E. (2012) Ambient pollen concentrations and emergency department visits for asthma and wheeze *J Allergy Clin Immunol*, 130:630-8.

Deus-de-Oliveira, N., Machado, O. L. T. (2011). Allergens and Toxins from Oleaginous Plants: Problems and Solutions, Environmental Impact of Biofuels, Dr. Marco Aurelio Dos Santos Bernardes (Ed.), ISBN: 978-953-307-479-5, InTech, DOI: 10.5772/18020. Available from: <http://www.intechopen.com/books/environmental-impact-of-biofuels/allergens-and-toxins-from-oleaginous-plants-problems-and-solutions>

Directorate Of Oilseeds Research. (2004) *Diversified uses of Castor*. In: International Seminar on Castor Seed, Castor Oil and its Value Added Products. *Proceedings...* Ahmedabad: The Solvent Extractors Association of India, p.50-57.

Dorota, M. (2013) Prediction of the birch pollen season characteristics in Cracow, Poland using an 18-year data series. *Aerobiologia* 29: 31-44

Dunn, B.M., Anfinsen, C.B. (1974) Kinetics of Woodward's Reagent K Hydrolysis and Reaction with Staphylococcal Nuclease. *J Biol Chem* 249:3717–3723.

Efstathiou, C., Isukapalli, S., Georgopoulos, P. (2011) A mechanistic modeling system for estimating large-scale emissions and transport of pollen and co-allergens. *Atmospheric Environment* 45: 2260-2276

El-Agamy, E.I. (2007) The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research* 68: 64–72.

Erbas, B., Lowe, A.J., Lodge, C.J., Matheson, M.C., Hosking, C.S., Hill, D.J., Vicendese, D., Allen, K.J., Abramson, M.J., Dharmage, S.C. (2013) Persistent pollen

exposure during infancy is associated with increased risk of subsequent childhood asthma and hayfever. *Clinical & Experimental Allergy*, 43: 337–343

Felix, S. P. (2007) *Identificação de epitopos alergênicos de albumina 2S de Ricinus communis utilizando como modelos roedores e pacientes atópicos: reações cruzadas com alérgenos alimentares e inalantes e bloqueio através da ocupação dos sítios de reconhecimento*. Tese (mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro Brasil.

Felix, S. P., Mayerhoffer, R. O., Damatta, R. A., Verícimo, M. A., Nascimento, V. V., Machado, O.L.T. (2008) Mapping IgE-binding epitopes of Ric c 1 and Ric c 3, allergens from *Ricinus communis*, by mast cell degranulation assay. *Peptides*. 2: 497 – 504.

Felix, S.P. (2006) *Caracterização de epitopos ligantes de IgE em alérgenos de Ricinus communis e investigação de respostas cruzadas entre alérgenos*. Monografia – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil.

Fernandes, K. V. (2008) *Análise dos níveis de albuminas 2S e de ricina em sementes de diferentes cultivares e linhagens de mamona (Ricinus communis L.)*. Monografia - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil.

Fernandes, K.V., Machado, O.L.T. (2012). *Approaches for the Detection of Toxic Compounds in Castor and Physic Nut Seeds and Cakes*. Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications, Zhen Fang (Ed.), ISBN: 978-953-51-0910-5, InTech, DOI: 10.5772/52332. Available from: <http://www.intechopen.com/books/biodiesel-feedstocks-production-and-applications/approaches-for-detection-of-toxic-and-allergenic-compounds-present-in-castor-and-physic-nut-seeds-an>

Fernandes, K.V., DEUS-DE-OLIVEIRA, N., Godoy, M.G., Guimarães, Z.A.S., Nascimento, V.V., Melo, E.J.T. de, Freire, D.M.G., Dansa-Petretski, M., Machado,

O.L.T. (2012) Simultaneous allergen inactivation and detoxification of castor bean cake by treatment with calcium compounds. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research on line*. 45:1002-1010.

Fernandez-Llamazares, A., Belmonte, J., Alarcon, M., Lopez-Pacheco, M. (2012) Ambrosia L. in Catalonia (NE Spain): expansion and aerobiology of a new bioinvader. *Aerobiologia* 28: 435-451

Fornazieri Júnior, A. (1986) *Mamona: uma rica fonte de óleo e de divisas*. São Paulo: Ícone, 71p.

Freire, R.M.M. (2007) *Ricinoquímica*. In: Azevedo, D. M. P.; Beltrão, N. E. M. O agronegócio da mamona no Brasil. 2^o ed. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 504p.

Freitas, J. (1974) *Efeito da radiação ionizante sobre as proteínas da torta de mamona*. Dissertação de Mestrado. UFRJ, Rio de Janeiro, 77p.

Gandhi, V.M., Cherian, K.M., Mulky, M.J. (1994) Detoxification of castor seed meal by interaction with sal seed meal. *Journal of the American Oil Chemists Society* 71: 827- 831.

García-González, J. J., Bartolomé -Zavala, B., Del Mar Trigo-Pérez, M., Barceló-Muñoz, J. M., Fernández-Meléndez, S., Negro-Carrasco, M. A., Carmona-Bueno, M. J., VEGA-CHICOTE, J. M., MUÑOZ-ROMÁN, C., Palacios-Peláez, R., Cabezudo-Artero, B., Martínez-Quesada, J. (1999) Pollinosis to *Ricinus communis* (castor bean): an aerobiological, clinical and immunochemical study. *Clinical and Experimental Allergy*. 29: 1265-1275

Gardner Jr., H.K., D'aquin, E.L., Koulturn, S.P., McCourtney, E.J., Vix, H.L.E., Gastrock, E.A. (1960) Detoxification and deallergenization of Castor beans. *Journal of the American Oil Chemists Societ* 37: 142- 148.

Gieras, A., Focke-Tejkl, M., Ball, T., Verdino, P., Hartl, A., Thalhamer, J., Valenta, R. (2007) Molecular determinants of allergen-induced effector cell degranulation. *Journal Allergy Clinical Immunology* 119: 384-390.

Godoy, M. G. (2008) *Produção de lipase microbiana e detoxificação simultânea de rejeitos agroindustriais*. Tese de mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.

Gould, H.J., Sutton, B.J. (2008) IgE in allergy and asthma today. *Nature Reviews Immunology* 8: 205-217.

Guéguen, L., MsScAgr, Pointillart, A. (2000) The Bioavailability of Dietary Calcium. *Journal of the American College of Nutrition*. 19:119S–136S.

Hao, G.D., Zheng, Y.W., Gjesing, B. Kong, X.A., Wang, J.Y., Song, Z.J.,Lai, X.X., Zhong, N.S., Spangfort, M.D. (2013) Prevalence of sensitization to weed pollens of *Humulus scandens*, *Artemisia vulgaris*, and *Ambrosia artemisiifolia* in northern China. *Journal Of Zhejiang University-Science B* 14: 240-246

Holgate, S.T., Polosa, R. (2008) Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature* 8: 218- 230.

Horton, J., Williams, M.A. (1989) A cooker-extruder for deallergenation of castor bean meal. *Journal of the American Oil Chemists Society* 66: 227- 231.

Icoa.(1989) *The processing of castor meal for detoxification and deallergenation*. Ridgewood (Technical Bulletin, 1), 75p.

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002) *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença*. 5 ed. Artmed.

Jolliffe, N.A., Brown, J.C., Neumann, U., Vicre´, M., Bachi, A., Hawes, C., Ceriotti, A., Roberts, L.M., Frigerio, L. (2004) Transport of ricin and 2S albumin precursors to the

storage vacuoles of *Ricinus communis* endosperm involves the Golgi and VSR-like receptors. *The Plant Journal* 39: 821–833.

Junqueira, L. C., Carneiro, J. (2004) *Histologia Básica*. 10^aed. Editora Guanabara Koogan.

Kambayashi, T., Koretzky, G. A. (2007) Proximal signaling events in FcεRI-mediated mast cell activation. *Journal Allergy Clinical Immunology* 119: 544- 552.

Khalil, C.N. (2004) Processo de produção de biodiesel a partir de semente de mamona. I congresso brasileiro de mamona. Campina grande – PB.

Kierzembraum, A.L. (2004) *Histologia e Biologia celular: uma introdução à patologia*. Editora Elsevier.

Kim, B. K. (2006) Inactivation of castor bean allergen CB-1A by heating and chemical treatment. *Food Science and Biotechnology* 15: 441-446.

Kimber, I., Dearman, R.J., Penninks, A.H., Knippels, L.M.J., Buchanam, R.B. (2003) Assessment of protein allergenicity on the basis of immune reactivity: animal models. *Environmental Health Perspectives*. 111: 1125-1130.

Kirshenbaum, A.S., Kessel, S.W., Goff, J.P., Metralfe, D.D. (1991) Demonstration of the origin of human mast cells from CD34⁺ bone marrow progenitor cells. *The Journal of Immunology* 146: 1410-1415.

Kling, S.H. (1974) *Estudo da solubilidade das proteínas da mamona*. Dissertação de Mestrado. UFRJ, Rio de Janeiro, 67p.

Knol, E.F., Olszewski, M. (2011) Basophils and mast cells: Underdog in immune regulation? *Immunology Letters* 138: 28–31.

Knothe, G. (2001) Historical perspectives on vegetable oil-based diesel fuels. *Journal of the American Oil Chemists' Society Inform* 12: 103-1107.

- Konnur, R., Subbarao, E.C. (2004) *Biogás form de oiled castor cake*. In: International Seminar on Castor Seed, Castor Oil and its Value Added Products. *Proceedings...* Ahmedabad: The Soplvent Extractors Association of India, p.31-35.
- Kumar, R.K., Herbert, C., Foster, P.S. (2008) The “classical” ovalbumin 10. challenge model of asthma in mice. *Curr Drug Targets*.9:485-494.
- Li, S.S.L., Lin, T.T.S., Ford, M.D.. (1977) Isolation and characterization of a low molecular weight seed protein from *Ricinus communis*. *Biochimica et Biophysica, Acta*. 492: 364-369.
- Lichtenstein, L.M. (1993) Allergy and the immune system. *Scientific American* 269: 85-93.
- Lord, J.M., Roberts, L.M., Robertus, J.D. (1994) Ricin: structure, mode of action and some current applications. *The FASEB Journal* 8: 201-208.
- Luo, C.W., Li, K., Chen, X.M.,Huang, Z.Y. (2012) Ants Contribute Significantly to the Pollination of a Biodiesel Plant, *Jatropha curcas*. *Environmental Entomology*, 41(5):1163-1168.
- Maciel, F.M.; Laberty, M.A.; Oliveira, N.D.; Felix, S.P.; Soares, A.M.S.; Verícimo, M.A. & Machado, O.L.T. (2009). A new 2S albumin from *Jatropha curcas* L. seeds and assessment of its allergenic properties. *Peptides*. 30:2103-2107.
- Machado, O.L.T.; Marcondes, J.A.; Souza-Silva, F. de; Hansen, E.; Ribeiro, P.D.; Veríssimo, M.; Kanashiro, M.; Kipnis, T.L.; Da Silva J.R., Dos Santos, M.F., Costa e Silva, M.C. (2003) Characterization of allergenic 2S albumin isoforms from *Ricinus communis* seeds. *Allergologie* 26: 45-51.
- Machado, O.L.T.; Silva, J.G. (1992) An allergenic 2S storage protein from *Ricinus communis* seeds which is part of the albumin precursor predict by c-DNA data. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 25: 567-582.

Maintz, L.; Novak, N. (2007) Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 85: 1185–96.

Mandal, J., Chakraborty, P., Roy, I., Gupta-Bhattacharya, S. (2012) Aerobiological, clinical and immunobiochemical studies on *Lantana camara* pollen and cross-reactivity with other Verbenaceae pollen species. *Aerobiologia* 28: 107-119.

Mayerhoffer, R.D.O. (2002) *Peptídeos isolados de moléculas de MHC de classe II de macrófagos murinos pulsados com albumina 2S de sementes de Ricinus communis*. Monografia - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro Brasil.

Mayerhoffer, R.D.O. (2004) *Identificação de peptídeos alergênicos de Albumina 2S de Ricinus communis (Mamona)*. Tese (mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro Brasil.

Meneghettia, S. M. P.; Meneghettia, M. R.; Wolf C, R.; Silva, E. C.; Gilvan E.S. Lima, G. E. S.; Coimbra, M. A.; Soletti, J. I.; Carvalho, S. H. V. (2006) Ethanolysis of Castor and Cottonseed Oil: A Systematic Study Using Classical Catalysts. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83: 819-822.

Min, B., Brown, M.A. Legros, G. (2011) Understanding the roles of basophils: breaking dawn. *Immunology* 135:192–197.

Mohapatra, S.S., Qazi, M., Hellermann, G. (2010) Immunotherapy for allergies and asthma: present and future. *Current Opinion in Pharmacology* 10: 276–288.

Moreno, A.N., Jamur, M.C., Oliver, C., Roque-Barreira, M.C. (2003) Mast cell degranulation induced by lectins: Effect on neutrophil recruitment. *International Archives of Allergy and Immunology* 132: 221- 230.

Moshkin, V. A. (1986) *Castor*. New Delhi: Oxonian Press, 315p.

Mottola, A.C., Mackey, B., Hering, V. (1971) Castor meal antigen deactivation – pilot plant steam process. *Journal of the American Oil Chemistry Society* 48: 510-513.

Murray, M., Galán, C., Villamil, C. (2010) Airborne pollen in Bahía Blanca, Argentina: seasonal distribution of pollen types. *Aerobiologia*. 26:195-207.

Murray, M., Scofield, R.L., Galán, C., Villamil, C.B. (2007) Airborne pollen sampling in a wildlife reserve in the south of Buenos Aires province, Argentina. *Aerobiologia*. 23:107–117.

Na, D.H., Cho, C.K., Youn, Y.S., Choi, Y.; Lee, K.R., Yoo, S.D., Lee, K.C. (2004) Capillary electrophoresis to characterize ricin and its subunits with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Toxicon*. 43: 329–335.

Nascimento, V.V., Castro, H.C., Abreu, P.A., Oliveira, A.E.A., Fernandez, J.H. Araújo, J.S. Machado, O.L.T. (2011) In Silico Structural Characteristics and r-Amylase Inhibitory Properties 2 of Ric c 1 and Ric c 3, Allergenic 2S Albumins from *Ricinus communis* Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59:4814–4821.

Nass, L.L., Pereira, P.A.A., Ellis, D. (2007) Biofuels in Brazil: An Overview. *Crop Science* 47: 2228- 2237.

Nuchsuk, C., Wetprasit, N., Roytrakul, S. Ratanapo, S. (2012) Larvicidal activity of a toxin from the seeds of *Jatropha curcas* Linn. against *Aedes aegypti* Linn. and *Culex quinquefasciatus* Say. *Tropical Biomedicine* 29(2): 286–296.

Oefner, C.M., Winkler, A., Hess, C., Lorenz, A.K., Holecska, V., Huxdorf, M., Schommartz, T., Petzold, D., Bitterling, J., Schoen, A., Stoehr, A.D., Van, D.V., Darcan-nikolaisen, Y., Blanchard, V., Schmudde, I., Laumonier, Y., Ströover, H.A., Hegazy, A.N., Eiglmeier, S., Schoen, C.T., Mertes, M.M.M., Loddenkemper, C., Löhning, M., König, P., Petersen, A., Luger, E.O., Collin, M., Köhl, J., Hutloff, A., Hamelmann, E., Berger, M., Wardemann, H., Ehlers, M. (2012) Tolerance induction with T cell-dependent protein antigens induces regulatory sialylated IgGs. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*. 1647-1655.

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

Oliveira, N. D. (2006) *Desenvolvimento de uma tecnologia para desativar epitopos alergênicos de Ricinus communis (mamona)*. Monografia - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil.

Olsnes, S. (2004) The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon* 44: 361 – 370.

Olsnes, S., Fernandez-Puentes, C., Carrasco, L., Vazquez, D. (1975) Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymic activity of the toxin A-chain. *Europe Journal of Biochemistry* 60: 281-288.

Olsnes, S., Kozlov, J. (2001) Ricin. *Toxicon*. 39: 1723-1728.

Palosuo, T., Panzani, R.C., Singh, A.B., Ariano, R., Alenius, H., Turjanmaa, K. (2002) Allergen cross-reactivity between proteins of the latex from *Hevea brasiliensis*, seeds and pollen of *Ricinus communis*, and pollen of *Mercurialis annua*, members of the Euphorbiaceae family. *Allergy and Asthma Proceedings* 23: 141-147.

Parente, E.J.S. (2004) Minicurso do Congresso brasileiro de mamona. Campina Grande. CD-ROM.

Parui, S., Mondal, A.K., Mandal, S. (1999) Identification and partial characterization of the allergenic proteins of *Ricinus communis* L. pollen - a new approach. *Grana* 38: 311-315.

Perrone, J.C., Iachan, A., Domont, G.B., Disitzer, L.V., Castro, V.R.O., Roitman, R., Gomes, S.M. (1966) *Contribuição ao estudo da torta de mamona*. Rio de Janeiro: Departamento de Imprensa Nacional, 51 p.

Pierini, L., Holowka, D., Baird, B. (1996) FcεRI-mediated Association of 6-1xm Beads with RBL-2H3 Mast Cells Results in Exclusion of Signaling Proteins from the

Forming Phagosome and Abrogation of Normal Downstream Signaling. *The Journal of Cell Biology* 134: 1427-1439.

Regente, M., La Canal, L. (2001) Are storage 2S albumins also defensive proteins? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 275-276.

Rivera, J., Gilfillan, A. M. (2006) Molecular regulation of mast cell activation. *Journal Allergy Clinical Immunology* 117: 1214-1225.

Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (2003) *Imunologia*. 6ª ed. Editora Manole, Cap. 21- 24 p. 324-378.

Santos, R. F.; Kouri, J.; Barros, M. A. L.; Marques, F. M.; Firmino, P. T.; Requião, L. E. G. (2007) *Aspectos econômicos do agronegócio da mamona*. In: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M. O agronegócio da mamona no Brasil. 2º ed. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 504p.

Savy Filho, A.; Banzato, N.V.; Barboza, M. Z.; Miguel, A.M.R.O.; Davi, L.O. de C.; Ribeiro, F.M. (1999) *Mamona*. In: COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL. Oleaginosas no estado de São Paulo: análise e diagnóstico. Campinas, 39p. (CATI. Documento Técnico, 107).

Schein, C.H., Ivanciuc, O., Braun, W. (2005) Common Physical-Chemical Properties Correlate with Similar Structure of the ige Epitopes of Peanut Allergens. *Journal Agricultural Food Chemistry* 53: 8752-8759.

Sehgal, P., Khan, M. Kumar, O. Vijayaraghavan, R. (2010) Purification, characterization and toxicity profile of ricin isoforms from castor beans. *Food and Chemical Toxicology* 48: 3171–3176.

Severino, L.S. (2005) *O que sabemos sobre a torta da mamona*. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 31p.

Sharief, F.S., Li, S.S. (1982) Aminoacid sequence of small and large subunits of seed storage protein from *Ricinus communis*. *Journal of Biological Chemistry* 257:14753-14759.

Shewry, P.R., Napier, J.A., Tatham, A.S. (1995) Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell*. 7: 945-56.

Shibamori, M., Ogino, K., Kambayashi, Y., Ishiyama, H. (2006) Intranasal mite allergen induces allergic asthma-like responses in NC/Nga mice. *Life Sciences*. 78:987–994.

Sicherer, S.H., Leung, D.Y.M. (2009) Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2008. *Journal Allergy Clinical Immunology* 123: 319-327.

Silva JR., J.G., M.A.T., Machado, O.L.T., Izumi, C., Pandovan, J.C., Chait, B.T., Mirza, U.A., Greene, L.J. (1996) Aminoacid sequence of New 2S Albumin from *Ricinus communis* whith is Part of 29-Kda Precursor Protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 336: 10-18.

Silva, D. da; Mota, I. (2003) *Imunologia Básica e aplicada*. 5ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A. p. 156-164

Singh, A., Panzani, R.C., Singh, A.B.(1997) Specific IgE to castor bean (*Ricinus communis*) pollen in the sera of clinically sensitive patients to seeds. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 7: 169-174.

Singh, A.B., Kumar, P. (2003). Aeroallergens in clinical practice of allergy in India. An overview. *Annals of Agricultural And Environmental Medicine* 10: 131-136.

Singh, A.B., Malik, P., Gangal, S.V., Babu, C.R. (1992) Intraspecific Variations In Pollen Extracts Of *Ricinus-Communis* (Castor Bean) Prepared From Different Source Materials. *Grana* 31: 229-235.

Singh, B.P., Verma, J., Sridhara, S. Rai, D., Makhija, N., Gaur, S.N., Gangal, S.V. (1997) Immunobiochemical characterization of *Putranjiva roxburghii* pollen extract and cross-reactivity with *Ricinus communis*. *International Archives of Allergy and Immunology* 114: 251-257.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem* 150:76-86.

Solèr, M. (2002) Anti-IgE-antibodies in the treatment of allergic diseases. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 42:45-49.

Spies, J.R., Coulson, E.J. (1943) The chemistry of allergens VIII. Isolation and properties of an active protein-polysaccharidic fraction, CB-1A, from castor bean. *Journal of American Chemical Society* 65: 1720- 1725.

Srivastava, M., Sgupta, S.K., Abhilash, P.C., Singh, N. (2012) Structure prediction and binding sites analysis of curcin protein of *Jatropha curcas* using computational approaches. *Journal of Molecular Modeling* 18:2971–2979.

Thorpe, S.C., Kemedly, D.M., Panzani, R.C., MC Gulr, B., Lord, M. (1988) Allergy to castor bean II - Identification of the major allergens in castor bean seeds. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 82: 67-72.

Tsujimura, Y., Obata, K., Mukai, K., Shindou, H., Yoshida, M., Nishikado, H., Kawano, Y., Minegishi, Y., Shimizu, T., Karasuyama, H. (2008) Basophils Play a Pivotal Role in Immunoglobulin-G-Mediated but Not Immunoglobulin-E-Mediated Systemic Anaphylaxis. *Immunity*. 28:581–589.

Vallverdu, A., Garcia-Ortega, P., Martinez, J., Martinez, A., Esteban, M.I., Demolina, M., Fernandez-Tavora, L., Fernandez, J., Bartolome, B., Palacios, R. (1997) *Mercurialis annua*: Characterization of main allergens and cross-reactivity with other species. *International Archives of Allergy and Immunology* 112: 356-364.

Van Beek, A.A., Knol, E.F., de Vos, P., Smelt, M.J., Savelkoul, H.F.J., van Neerven, R.J.J. (2013) Recent developments in basophil research: do basophils initiate and perpetuate type 2 T-helper cell responses? *Int Arch Allergy Immunol* 160:7–17

Vieira, M.R. (2002) *Desgranulação de mastócitos por isoformas de albumina 2S de sementes de R. communis*. Monografia - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro Brasil.

Vieira, R.M.; Lima, E.F.; Batista, F.A.S. (1998) *Diagnóstico e perspectivas da mamona no Brasil*. In: REUNIÃO TEMÁTICA DE MATÉRIAS-PRIMAS OLEAGINOSAS NO BRASIL: DIAGNÓSTICO, PERSPECTIVAS E PRIORIDADES DE PESQUISA, 1997, Campina Grande. *Anais...* Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, p.139-150.

Visser, E. M., Oliveira Filho, D., Martins, M.A., Steward, B.L. (2011) Bioethanol production potential from Brazilian biodiesel co-products. *Biomass and bioenergy*. v. 35, p. 489-494.

Walter, A., Rimbach, G., Most, E., Pallauf, J. (2000) Effect of Calcium Supplements to a Maize—Soya Diet on the Bioavailability of Minerals and Trace Elements and the Accumulation of Heavy Metals in Growing Rats. *Journal of Veterinary Medicine*. 47: 367–377.

Wang, Q, Nakamura, S., Lu, S., Xiu, G., Nakajima, D., Suzuki, M., Sakamoto, K., Miwa, M. (2012) Release behavior of small sized daughter allergens from *Cryptomeria japonica* pollen grains during urban rainfall event. *Aerobiologia* 28: 71-81

Wolff, N., Yannai, S., Karin, N., Levy, Y., Reifen, R., Dalal, I., Cogan, U. (2004) Identification and characterization of linear B-cell epitopes of β -globulin, a major allergen of sesame seeds. *Journal Allergy Clinical Immunology* 114: 1151-1158.

Woo, B.H., Lee, J.T., Lee, K.C. (1998) Purification of Sepharose-unbinding ricin from Castor Beans (*Ricinus communis*) by hydroxyapatite chromatography. *Protein Expression and Purification* 13: 150-154.

Woodcock, A., Forster, L., Matthews, E., Martin, J., Letley, L., Vickers, M., Britton, J., Strachan, D., Howarth, P., Altmann, D., Frost, C., Custovic, A. (2003) Control of exposure to mite allergen and allergen-impermeable bed covers for adults with asthma. *N. Engl. J. Med.* 349, 225–236.

Xiao, X., Fu, A., Xie, X.J., Kang, M.X., Hu, D.S., Yang, P.C., Liu, Z.G. (2013) An Investigation of Airborne Allergenic Pollen at Different. *International Archives Of Allergy And Immunology* 160: 143-151

Xiong, H., Dolpady, J., Wabl, M., Lafaille, M.A.C., Lafaille, J.J. (2011) Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *The Journal of Experimental Medicine* 209: 353-364.

Yamada, P., Hatta, T. , Du, M. ,Wakimizu, K., Han, J. , Taichi, M., Isoda, H. (2012) Inflammatory and degranulation effect of yellow sand on RBL-2H3 cells in relation to chemical and biological constituents. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 84: 9–17

Yli-Panula, E., (2012) Birch pollen allergen exposure: profiles, sources and characteristics. Settled dust and aeroallergens in indoor and outdoor environments of Finnish homes. *Aerobiologia* 28: 453-465

Youle, R.J., Huang, A.H. (1978) Evidence that the castor bean allergens are the albumin storage proteins in the proteins bodies of castor bean. *Plant Physiology* 61: 1040-1042.

Ziello, C., Sparks, T.H., Estrella, N., Belmonte, J., Bergmann, K.C., Bucher, E., Brighetti, M.A., Damialis, A., Detandt, M., Galán, C., Gehrig, R., Grewling, L., Bustillo, A.M.G., Hallsdóttir, M., Kockhans-Bieda, M.C., Linares, C. de, Myszkowska, D., Pàldy, A., Sánchez, A., Smith, M., Thibaudon, M., Travaglini, A., Uruska, A.,

Valencia-Barrera, R.M., Vokou, D., Wachter, R., Weger, L.A. de, Menzel, A. (2012) Changes to Airborne Pollen Counts across Europe. *Plos One* 7(4): e34076.

APÊNDICE

ANEXOS

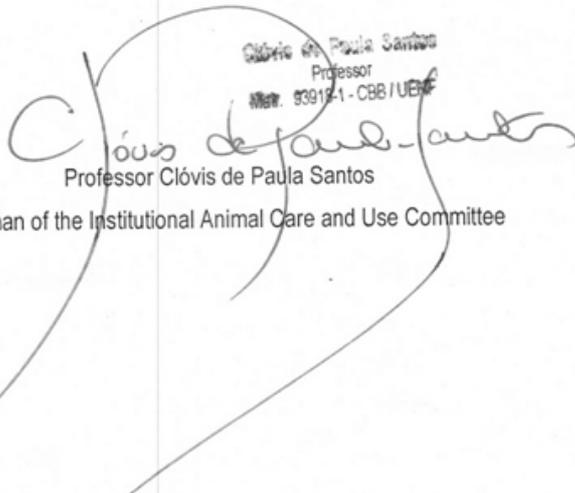
Anexo 1:



Reitoria
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICATION

We certify that the Protocol nº 112, entitled "CHARACTERIZATION OF ALLERGENIC PROTEINS FROM OLEAGINOUS" under the responsibility of Dr Olga Lima Tavares Machado, Center for Bioscience and Biotechnology /UENF is consistent with the ethical principles for animal experimentation adopted by Brazilian Society of Laboratory Animal Science / Brazilian College of Animal Experimentation (SBCAL / COBEA) and Federal law number 11,794. It is therefore approved and authorized. This program is licensed in this format and is valid until 21/12/2014.


Clóvis de Paula Santos
Professor
Matr. 83912-1 - CBB / UENF
Professor Clóvis de Paula Santos
Chairman of the Institutional Animal Care and Use Committee