



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

VINICIUS RODRIGUES DE CASTRO E SILVA

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA CURCINA (UMA RIP TIPO 1) DURANTE O
ARMAZENAMENTO DA TORTA RESIDUAL DE SEMENTES DE PINHÃO-MANSO
(*Jatropha curcas* L.)

FORTALEZA

2018

VINICIUS RODRIGUES DE CASTRO E SILVA

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA CURCINA (UMA RIP TIPO 1) DURANTE O
ARMAZENAMENTO DA TORTA RESIDUAL DE SEMENTES DE PINHÃO-MANSO
(*Jatropha curcas* L.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C353a Castro e Silva, Vinicius Rodrigues de.
Avaliação da integridade da curcina (uma RIP tipo 1) durante o armazenamento da torta residual de sementes de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) / Vinicius Rodrigues de Castro e Silva. – 2018.
84 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.
1. RNA-N-glicosidase. 2. RIP tipo 1. 3. Conformação estrutural. 4. Atividade biológica. I. Título.

CDD 660.6

VINICIUS RODRIGUES DE CASTRO E SILVA

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA CURCINA (UMA RIP TIPO 1) DURANTE O
ARMAZENAMENTO DA TORTA RESIDUAL DE SEMENTES DE PINHÃO-MANSO
(*Jatropha curcas* L.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Fabrício Eulálio Leite Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Álvaro Marcos Pereira Lima
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN)

Prof. Dr. Luiz Ferreira Aguiar Ponte
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Aos meus pais, exemplos de amor,
perseverança e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus pai, que me proporcionou a vida e oportunidade de crescimento, amadurecimento e concedendo a oportunidade de inserir mais conhecimento a luz da ciência.

Ao meu orientador, amigo, companheiro e professor Dr. André Luis Coelho da Silva, pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade e amor durante todos os anos do meu doutorado. Levo seu exemplo de ser humano, profissional e ético para minha vida.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará que compartilharam seus conhecimentos e técnicas para o aprimoramento da equipe.

Aos membros da banca de defesa da tese, pelas as correções e importantes sugestões de melhoria desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal do Ceará pela estrutura concedida na realização dos experimentos e aulas.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol) Mário, Vanessa, Talita, Samara e Wallady pelo aprendizado, companheirismo, apoio e troca de conhecimento e força no dia-a-dia e nas experimentações.

Aos meus pais Maristela e Hélio que foram e são exemplos de retidão, luta e trabalho, que apesar da pouca instrução sempre se preocuparam com a nossa educação como principal alternativa de transformação.

A minha esposa Juliana, pelas palavras de incentivo e carinho em todos os momentos, por me apoiar nas dificuldades e tornar possível a realização de um sonho, sendo o pilar fundamental de nossa família e aos meus pequenos (Theo e Pedro), que inconscientemente me fortaleceram e me motivaram todos os dias.

A todos as pessoas que de alguma forma contribuíram para este trabalho, para meu amadurecimento e formação.

“Não confunda jamais conhecimento com sabedoria. Um o ajuda a ganhar a vida; o outro a construir uma vida”. (Sandra Carey).

RESUMO

As proteínas inativadoras de ribossomos do tipo 1 (RIPs tipo 1) são enzimas monoméricas de massa molecular variando entre 25 e 30 KDa, com um domínio RNA-*N*-glicosidase, que não possuem uma cadeia ligante a glicoconjugados e apresentam baixa toxicidade quando comparada com RIPs do tipo 2. A curcina é uma RIP do tipo 1 obtida da semente de *Jatropha curcas* com vários relatos na literatura com potencial biotecnológico. O objetivo desse trabalho foi monitorar a presença da curcina na torta de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) durante 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de armazenamento, avaliando sua integridade físico-química, conformacional e atividades biológicas *in vivo* e *in vitro*. Desta forma, foram utilizadas tortas de semente de pinhão-manso, armazenadas por diferentes períodos, onde para cada período foi realizado a extração, purificação e quantificação da curcina, sendo posteriormente verificada a pureza, preservação de atividade conformacional e biológica através de metodologias *in vivo* e *in vitro*; além de uma avaliação de atividade anti-helmíntica. Os estudos mostraram que a curcina obtida até 90 dias de armazenamento da torta de pinhão-manso permanecia estável sobre sua quantidade, com atividade biológica e conformacional, não havendo diminuição de sua atividade RNA-*N*-glicosidase, apresentando toxicidade sob cistos de *Artemia salina*, e adultos de *Ascaridia galli* com taxa de mortalidade semelhante ao do medicamento comercial. Desta forma, concluiu-se que a curcina obtida de torta de pinhão-manso até 90 dias de armazenamento apresenta estabilidade conformacional e biológica podendo ser utilizada como ferramenta biotecnológica.

Palavras-chave: RNA-*N*-glicosidase. RIP tipo 1. Conformação estrutural. Atividade biológica.

ABSTRACT

Type 1 Ribosome Inactivating Proteins (RIPs) are monomeric enzymes with molecular mass between 25 to 30 KDa. Type 1 RIPs have an RNA-*N*-glycosidase domain, but do not have glycoconjugate ligand domain characteristic of type 2 RIPs. Because of that, type 1 are less toxic than type 2 RIPs. Curcin is a type 1 RIP isolated from *Jatropha curcas* seeds and has several reports suggesting its biotechnological potentials. The aim of this thesis was to monitor the presence of curcin into the residual cake derived from *J. curcas* seeds during 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days of storage. The samples were evaluated according to its physicochemical and conformational aspects and also its *in vivo* and *in vitro* biological activities. For these tests, *J. curcas* seeds cake stored for different periods were used. With each cake was performed extraction and purification of curcin. After each purification, it was performed tests to assess purity, conformational aspects, *in vivo* and *in vitro* biological activities and anti-helminth effect of each purification batch. These tests showed that curcin obtained after 90 days of stored *J. curcas* cake did not show difference in its purification yield and maintained its biological effects and conformational aspects. It did not show decrease of RNA-*N*-glycosidase activity preserving its high toxicity against *Artemia salina* cists and *Ascaridia galli* with similar effects of commercial medicines. In conclusion, curcin purified from *J. curcas* seeds cake stored for 90 days still presenting high structural stability and biological activities and can be used as biotechnological tool.

Key words: RNA-*N*-glycosidase. Type 1 RIP. Structural conformation. Biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alinhamento esquemático das RIPs representando uma comparação entre suas estruturas primárias.....	16
Figura 2 - Transporte da ricina em células de mamíferos.....	18
Figura 3 - Representação esquemática da ação enzimática de proteínas inativado rãs de ribossomos no rRNA.....	19
Figura 4 - Dosagem de proteínas solúveis dos extratos brutos das sementes quiescentes (Sq), dos extratos brutos e das frações proteicas (precipitadas com 80% de sulfato de amônio) das tortas de sementes de pinhão-manso armazenadas por 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias.....	46
Figura 5 - Purificação da curcina de sementes de pinhão-manso (<i>J. curcas</i>).....	48
Figura 6 - Isolamento da curcina das frações proteicas 0-80% das tortas de sementes de pinhão-manso obtidas após diferentes dias de armazenamento.....	51
Figura 7 - SDS-PAGE (15%) sob condições redutoras das curcinas isoladas das tortas de sementes de <i>J. curcas</i>	53
Figura 8 - <i>Western blotting</i> das curcinas isoladas das frações proteicas das tortas de sementes de <i>J. curcas</i>	54
Figura 9 - Espectro de CD da curcina obtida de sementes e das frações proteicas das tortas de pinhão-manso (FTP) armazenadas por 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias.....	56
Figura 10 - Espectros de emissão de fluorescência da curcina obtida de sementes e das frações proteicas da torta de pinhão-manso (FTP) armazenadas por 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias.....	58
Figura 11 - Análise da atividade RNA <i>N</i> -glicosidase <i>in vitro</i> da curcina de sementes de <i>J. curcas</i> e das curcinas das tortas de sementes de <i>J. curcas</i> obtidas em diferentes dias de armazenamento.....	60
Figura 12 - Ensaio de inibição da síntese proteica promovida pela curcina obtida de sementes e das frações proteicas da torta de pinhão-	

	manso (FTP) em sistema livre de células (TNT® <i>Coupled Reticulocyte Lysate System</i>).....	62
Figura 13 -	Toxicidade da curcina isolada das sementes e das frações proteicas (FTPs) das tortas armazenadas por 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias sobre cistos de <i>Artemia salina</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compilado sobre RIPs tipo 1 com suas respectivas fontes e atividades descritas.....	24
Tabela 2 - Características físico-químicas de amostras de sementes de pinhão-manso.....	27
Tabela 3 - Composição química (% de matéria-prima) de tortas de sementes de pinhão-manso.....	29
Tabela 4 - Estratégias de destoxificação presentes na literatura.....	30
Tabela 5 - Fatores tóxicos de torta de pinhão manso proveniente de vários países.....	33
Tabela 6 - Toxicidade da torta obtida por diferentes métodos de extração de óleo.....	34
Tabela 7 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a toxicidade da torta de pinhão manso.....	34
Tabela 8 - Degradação ruminal de proteínas, teores de IT, saponina, lectina e fitato.....	35
Tabela 9 - Desintoxicação da torta de sementes de <i>Jatropha curcas</i> usando cepas de <i>Enterobacter</i> Z11 em fermentação em estado sólido.....	35
Tabela 10 - Rendimento das curcinas isoladas das tortas de sementes de <i>J. curcas</i> obtidas após diferentes dias de armazenamento.....	49
Tabela 11 - Predição da estrutura secundária da curcina de sementes e da curcina da fração proteica da torta armazenada por 90 dias.....	57
Tabela 12 - Percentual médio de mortalidade <i>in vitro</i> da <i>Ascaridia galli</i> ao longo de 72 horas de tratamento com a curcina da torta de sementes armazenadas por 90 dias.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

28 S	Índice de sedimentação (S) 28 do RNA ribossomal
A ₄₃₂₄	Adenina localizada na posição 4324 do RNA ribossomal
ADP	Adenosina difosfato
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência adquirida
BSA	Albumina sérica bovina
CD	Dicroísmo circular
CD4	<i>Cluster of differentiation</i>
ConA	concanavalina A
DBBM	Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
DL ₅₀	Dose letal suficiente para matar 50% da população
DNA	Ácido desoxiribonucleico
D.O. 280 nm	Densidade optica a 280 nanômetro
DT	Toxina diftérica
EB	Extrato bruto proteico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FE	Fator de alongação
FTP	Fração proteica de torta de pinhão-manso
HIV	Vírus da Imunodeficiência adquirida
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i>
kDa	Quilodaltons
LabBMol	Laboratório de Biotecnologia Molecular
M	Molar
MAP30	<i>Mormodica Anti-HIV protein</i>
mM	Milimolar
µL	Microlitros
mL	Mililitros
nM	Nanomolar
PAP	Proteína antiviral do <i>pokeweed</i>
PBS	Tampão fosfato de sódio
PDB	<i>Protein Data Base</i>
PE	<i>Pseudomonas</i> exotoxina

PEG	Polietileno-glicol
PMA	<i>Protein Mirabilis Antiviral</i>
RE	Retículo endoplasmático
RIP	<i>Ribosome-Inactivating Protein</i>
RTA	Ricina
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
Sq	Semente quiescente
TCS	Tricosantina
TGN	Rede trans-Golgi
TRIS	Tris-(aminometilidenotrimetanol)
TS	Toxina <i>Shiga</i>
UH	Unidade de hemaglutinação
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
URL	Unidade relativa de luz
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 O que são Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs)?.....	15
1.2 Mecanismos de ação das RIPs.....	17
1.3 Distribuição das RIPs na natureza.....	20
1.4 Atividades e potencial biotecnológico das RIPs.....	20
1.5 Curcina: uma RIP tipo 1 de pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i>).....	24
1.6 Aproveitamento dos resíduos da produção de oleaginosas e da extração de óleo.....	27
2. OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3. MATERIAIS.....	38
3.1 Vegetal.....	38
3.2 Animal.....	38
3.3 Reagentes.....	38
4. MÉTODOS.....	39
4.1 Preparação da torta residual das sementes de pinhão-manso e armazenagem.....	39
4.2 Delipidação química e preparo das farinhas da torta residual das sementes de pinhão-manso.....	39
4.3 Obtenção do extrato proteico a partir das farinhas das tortas de pinhão-manso armazenados por diferentes períodos.....	39
4.4 Precipitação das proteínas dos extratos brutos das tortas (EB_{ts}) com sulfato de amônio.....	40
4.5 Dosagem de proteínas das frações proteicas das tortas de pinhão-manso (FTP)	40
4.6 Purificação da curcina das FTPs por cromatografia de exclusão molecular.....	40
4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	41
4.8 Ensaio de imunodeteção da curcina das FTPs utilizando anticorpos policlonais anti-curcina.....	41

4.9	Dicroísmo circular.....	42
4.10	Fluorescência.....	42
4.11	Atividade RNA <i>N</i> -glicosidase <i>in vitro</i>	42
4.12	Inibição da síntese proteica em sistema livres de células.....	43
4.13	Bioensaio com <i>Artemia salina</i> para avaliar toxicidade das frações de curcina purificada das FTPs.....	44
4.14	Atividade anti-helmíntica.....	44
4.15	Análise estatística.....	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
5.1	Dosagem de proteínas das frações proteicas das tortas de pinhão-manso (FTP)	46
5.2	Purificação da curcina das FTPs por cromatografia de exclusão molecular.....	48
5.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	53
5.4	Ensaio de imunodeteção da curcina das FTPs utilizando anticorpos policlonais anti-curcina.....	53
5.5	Dicroísmo circular.....	55
5.6	Fluorescência.....	57
5.7	Atividade RNA <i>N</i> -glicosidase <i>in vitro</i>	59
5.8	Inibição da síntese proteica em sistema livres de células.....	61
5.9	Bioensaio com <i>Artemia salina</i> para avaliar toxicidade das frações de curcina purificada das FTPs.....	63
5.10	Atividade anti-helmíntica.....	65
6	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 O que são proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs)?

Proteínas inativadoras de ribossomos (do termo em inglês *Ribosome Inactivating Proteins*) são enzimas que promovem a depurinação de uma adenina específica (A_{4324}), situada em uma alça exposta do RNA ribossomal (rRNA) 28S em estudos realizados em células hepáticas de rato (BARBIERI *et al.*, 1993), através do rompimento da ligação glicosídica entre a base e a ribose. Com isso, sua atividade foi caracterizada como de RNA-*N*-glicosidase (ENDO *et al.*, 1987; ZAMBONI *et al.*, 1989).

As RIPs promovem uma inibição irreversível da síntese proteica, ocasionando morte celular (SCHORT *et al.*, 2015). Podendo inativar um grande número de ribossomos em uma única célula, levando a hipótese de que apenas uma única molécula de RIP seja capaz de provocar morte celular (WENG *et al.*, 2012). Devido a essa característica de provocar morte celular, ocorre uma investigação sobre o seu domínio de toxina, inclusive como domínio direcionado para células tumorais, com potencial ação antitumoral (GILABERT-ORIOLO *et al.*, 2014).

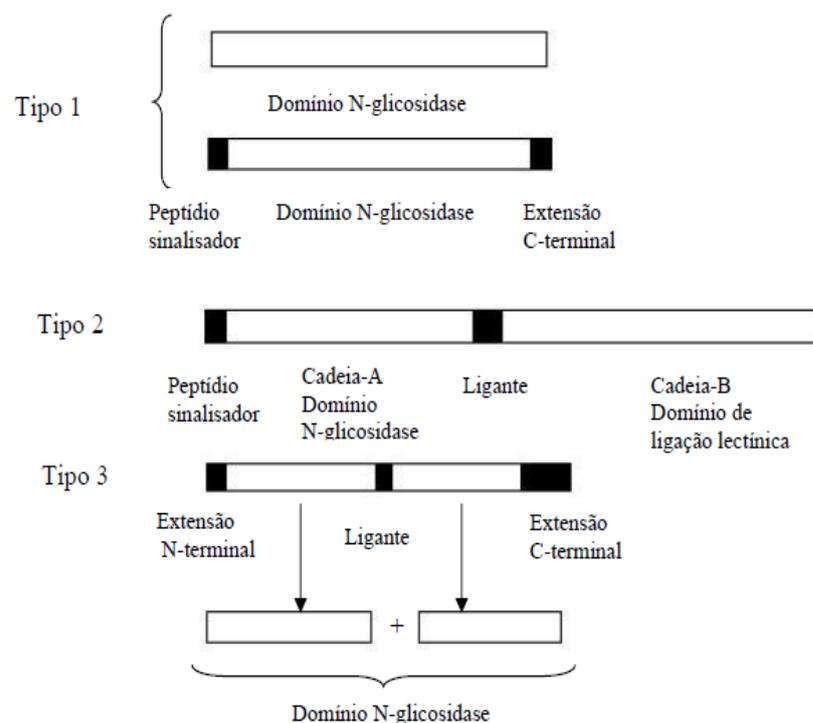
A atuação das RIPs está direcionada a uma alça do rRNA que está relacionada a interações com fatores de alongação (EFs) 1 e 2 (BRIGOTTI *et al.*, 1989). A clivagem dessa adenina específica impede essa interação, resultando em um decréscimo da síntese de proteínas (ENDO *et al.*, 1991). A diminuição da síntese proteica nas células afetadas pelas RIPs, comumente resulta em morte celular (NIELSEN e BOSTON, 2001).

Segundo Mundy e colaboradores (1994), as RIPs podem ser classificadas em 3 tipos de acordo com suas propriedades físicas e estruturais (Figura 01):

- RIPs tipo 1: são enzimas monoméricas, de massa molecular entre 25 e 30 KDa (LING, LIU e WANG, 1994), com um domínio RNA *N*-glicosidase que não possuem uma cadeia ligante a glicoconjugados e apresentam baixa citotoxicidade. Algumas delas podem entrar na célula através do mecanismo do endocitose fase-fluída. Exemplos: saporina (*Saponaria officinalis*) e a PAP (CAVALLARO, 1995);

- RIPs tipo 2: são proteínas heterodiméricas compostas de duas cadeias polipeptídicas, de massa molecular em torno de 60 kDa (LING *et al.*, 1994). A cadeia A é a porção com atividade enzimática de remover um resíduo de adenina de um *loop* exposto da subunidade 28S do rRNA com isso inibindo a síntese proteica (OLSNES, 2004). A cadeia B é uma cadeia lectínica (STIRPE *et al.*, 1977). A cadeia B pode ligar-se a glicoproteínas ou glicoconjugados presentes na superfície celular (STEEVES *et al.*, 1999) mediando o transporte da cadeia A para o citosol, onde terá acesso aos ribossomos. Exemplos: abrina, ricina e pulchelina (BEAUMELLE *et al.*, 1993).
- RIPs tipo 3: são proteínas sintetizadas como precursoras inativas (proRIPs) que requerem um processamento proteolítico entre os aminoácidos envolvidos na formação do sítio ativo. As RIPs deste grupo foram isoladas no milho e na cevada (BASS *et al.*, 1992).

Figura 1 - Alinhamento esquemático das RIPs representando uma comparação entre suas estruturas primárias



Fonte: NIELSEN e BOSTON (2001).

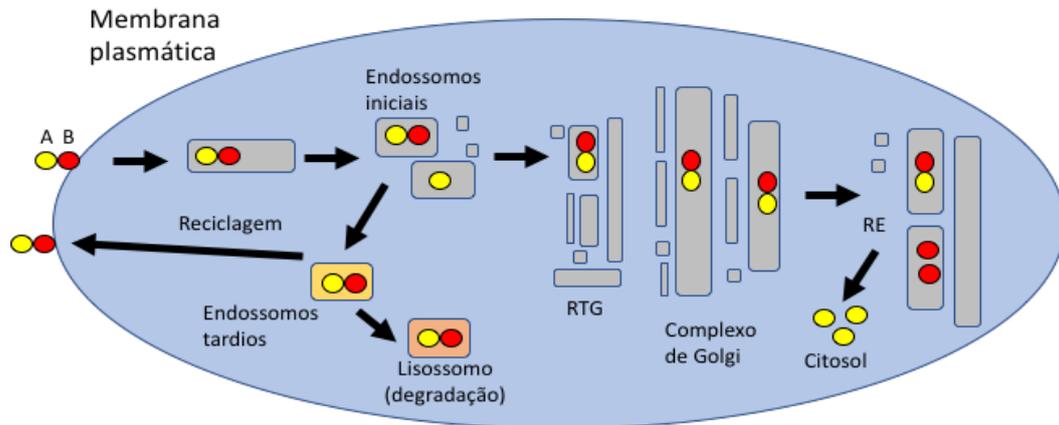
Essa grande toxidez despertou o interesse por uma possível utilização dessas proteínas conjugadas com anticorpos, como imunotoxinas, no tratamento de câncer (LIN *et al.*, 1971; SCADDEN *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1998; FABBRINI *et al.*, 2017). A utilização de RIPs em estudo pré-clínicos já foi liberado, como por exemplo a autorização de teste fase I para uso da viscumina (RIP do tipo 2 de *Viscum album*) acoplada à um anticorpo para tratamento de câncer colo-retal, sarcoma e melanomas (BERGMANN *et al.*, 2008). Estudos para combater o vírus HIV, utilizando imunotoxinas complexadas com RIPs também foram realizados (TILL *et al.*, 1988; WANG *et al.*, 2000; DONAYRE TORRES *et al.*, 2009; BOLOGNESI *et al.*, 2016).

1.2 Mecanismos de ação das RIPs

Hartley e Lord (2004), revisaram o processo de internalização da ricina em células de mamíferos e observaram que a ricina uma vez ligada a superfície celular através da cadeia B, sendo endocitada. Parte da toxina endocitada volta para a superfície celular, ou segue para o lisossomo, onde é degradada. A rota produtiva da intoxicação ocorre para uma pequena porção da toxina, a qual é transportada por vesículas para o endossomo e para a rede transGolgi (TGN) e, via complexo de Golgi, para o lúmen do retículo endoplasmático. As subunidades da ricina são separadas, permitindo que a cadeia A cataliticamente ativa se desloque para o citosol (Figura 2).

As RIPs tipo 2 têm a capacidade de ligar-se a glicoproteínas e glicolipídeos na superfície celular, sendo endocitadas por diferentes processos, clatrina dependentes ou independentes, direcionando as moléculas para vesículas endossomais, onde podem ser encaminhadas para uma rota seguinte, dependendo da natureza do receptor, e serem conduzidos a vários destinos (BARBIERI *et al.*, 1993). Esses endossomas podem chegar ao complexo de Golgi, e depois as proteínas são encaminhadas ao lúmen do retículo endoplasmático (RE), onde as duas cadeias polipeptídicas são separadas por isomerase dissulfídica (SPOONER *et al.*, 2004). A cadeia A livre no lúmen do RE pode ser interpretada como um peptídeo não-ligado e enviada ao citosol pelo sistema de controle de qualidade do RE (LORD e ROBERTS, 1998). As RIPs tipo 2 são retro-translocadas utilizando a via de degradação associada ao RE usualmente seguida por proteínas que no citosol são poliubiquitadas e degradadas por proteases, denominadas proteossomas (TSAI *et al.*, 2002).

Figura 2 - Transporte da ricina em células de mamíferos.



A ricina liga-se à superfície celular através da atividade da lectina da sua cadeia B (círculos vermelhos). Alguma toxina ligada à superfície entra na célula por endocitose. Depois de atingir inicialmente os endossomos iniciais, a maior parte da toxina endocitada se recicla de volta à superfície celular ou prossegue via endossomos tardios para os lisossomos, onde é degradada. A rota produtiva para intoxicação ocorre para uma pequena proporção da toxina que sofre transporte vesicular de endossomos precoces para a rede trans-Golgi (RTG) e, via complexo de Golgi, para o lúmen do RE. Aqui, as subunidades de ricina se separam redutivamente, permitindo que a cadeia A cataliticamente ativa (círculos amarelos) se retro-translocasse para o citosol.

Fonte: modificada de HARTLEY e LORD (2004).

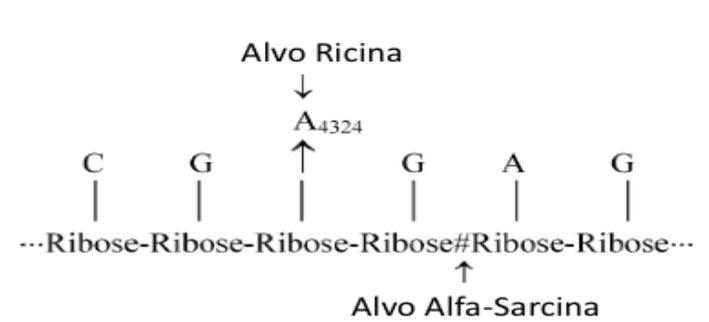
Os Ribossomos de ratos são frequentemente utilizados como modelo de experimentação, onde a RIP se liga no sítio específico A4324 na subunidade 28S do rRNA. Este local é descrito como um *loop* de cadeia simples, chamado de *loop* sarcina/ricina localizada no domínio VII com cerca de 400 nucleotídeos a partir da região 3' do rRNA. Essa região, posteriormente foi identificada como local de atividade *N*-glicosidase comum em RIP tipo 1 e 2 (PEUMANS *et al.*, 2001).

O mecanismo de dano ribossomal foi descoberto por Endo e colaboradores, (1987) que descobriram que a ricina cliva a ligação glicosídica de um único resíduo de adenina (A4324 do rRNA de fígado de ratos). Este resíduo é adjacente ao local de clivagem de rRNA por uma α -sarcina, em um tetranucleotídeo GA4324GA em um *loop* altamente conservado no topo de uma haste, chamado de sarcina/ricina *loop*. Esta observação foi alargada a outras RIPs (STIRPE *et al.*, 1988), que foram oficialmente classificadas como RNA-*N*-glicosidasas.

Embora todas as RIPs exibam atividade de *N*-glicosidase, existem diferenças marcantes variando conforme o substrato. Por exemplo, a ricina é altamente ativa em ribossomos de mamíferos e leveduras, entretanto apresenta pouca atividade ou inatividade em ribossomos de plantas e *Escherichia coli* (BARBIERI *et al.*, 1993).

Observa-se que a maioria das RIPs tipo 1 possui uma atuação bastante diversificada para diferentes tipos celulares, o mesmo não é observado em RIPs do tipo 2 que possuem uma preferência pelos ribossomos de animais. Visto que a estrutura do rRNA alvo é universalmente conservada, as diferenças de sensibilidade ocorrem pelas proteínas ribossomais, permitindo ou impedindo o acesso das RIP ao loop ricina (Figura 03). (PEUMANS *et al.*, 2001).

Figura 3. Representação esquemática da ação enzimática de proteínas inativadoras de ribossomos no rRNA.



Fonte: Autor.

RIPs também depurinam ribossomos de não mamíferos, como insetos (ZHOU *et al.*, 2000; BALLINGER e PERLMAN, 2017), plantas (IGLESIAS *et al.*, 1993; BARBIER e GILLET, 2018), leveduras (ROBERTS e SELITRENNIKOFF, 1986; BARBIER e GILLET, 2018), e bactérias (GIRBE'S *et al.*, 1993; BARBIER e GILLET, 2018).

Além disso, verificou-se que algumas RIPs removem mais de um resíduo de adenina por ribossomo (BARBIERI *et al.*, 1994) e determinadas podem remover resíduos de adenina a partir de DNA e outros polinucleótidos (BARBIERI *et al.*, 1997; NICOLAS *et al.*, 2000). Desta forma, a denominação de polinucleótido adenina glicosidase e mais recentemente, de adenina glicosidase polinucleótido foi proposto para estas proteínas podendo substituir a denominação RNA-*N*-glicosidase (BARBIERI *et al.*, 2001). Além disso, foi observado ainda, que a ricina e outros RIPs podem remover a adenina da cauda de *poli A* (BARBIERI *et al.*, 2003).

1.3 Distribuição das RIPs na natureza

As RIPs são comumente encontradas em plantas, RIPs tipo 1 foram encontrados em várias plantas, incluindo algumas que são consumidas cruas como espinafre (ISHIZAKI *et al.*, 2002), e tomate (BARBIERI *et al.*, 2006). A ocorrência de RIPs tipo 1 é mais elevada quando comparado as RIPs tipo 2 (SCHROT *et al.*, 2015). A RIP tipo 2, Aralina foi encontrada nas partes aéreas da *Aralia eleta* (TOMATSU *et al.*, 2003), mas podem ser consumidas com segurança já que a RIP desnatura ao cozinhar. A Ricina, RIP do tipo 2 está presente apenas nas sementes da planta *Ricinus communis*, enquanto que Saporina está presente em todos os tecidos da erva-saboeira, incluindo folha, caule e raiz (*Saponaria officinalis*) (FERRERAS *et al.*, 1993). Em alguns casos, pode ser encontrado na mesma planta RIPs tipo 1 e tipo 2, como por exemplo, *Sambucus nigra* (FERRERAS *et al.*, 2000) e *Cinnamomum camphora* (LING *et al.*, 1995). Na mamona, observa-se à presença de RIPs tóxicas e não-tóxicas, coexistindo (por exemplo, ricina e aglutinina de *Ricinus*), enquanto Nigrina-B verificou-se ser de dois tipos diferentes de RIPs, diferenciando em sua toxicidade (HARTLEY *et al.*, 1996).

1.4 Atividades e potencial biotecnológico das RIPs

As RIPs apresentam diversas atividades biológicas incluindo atividades de inibição da tradução, N-glicosidases, antimitogênica, imunomoduladora, antiproliferativa, antifúngica. Imunotoxinas baseadas em RIPs têm sido construídas e usadas em terapia de câncer. Plantas transgênicas carregando o gene de RIP são menos susceptíveis às infecções virais (NG e WANG, 2004).

Propriedades anti-tumorais das RIPs contra diversos tipos de cânceres têm sido comprovadas por diversos cientistas. Mosinger (1951), relatou a ação tóxica da ricina contra sarcoma de ratos, enquanto Reddy e Sirsi (1969), reportaram a ação inibitória de extrato de Jequiriti (*A. precatorius*) sobre o crescimento do sarcoma de Yoshida. Segundo Fodstad e colaboradores (1984), os resultados dos testes anti-tumorais em animais, com abrina e ricina, mostraram-se promissores e os estudos clínicos de fase I começaram, mas foram interrompidos porque foram observados efeitos não vistos anteriormente em ratos e também remissões nos pacientes testados. Atualmente,

outra ferramenta contra o câncer utilizando essas toxinas é a produção de imunotoxinas, que consiste em anticorpos monoclonais, contra antígenos de superfície celular, ligados a cadeia A das toxinas (OLSNES *et al.*, 1989; TRAN *et al.*, 2013; BOTTGER *et al.*, 2013; WICAKSONO *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2018).

Além da atividade anti-tumoral, pode-se observar princípio ativo responsável pela atividade abortífera foi purificado e identificado como sendo uma proteína (chamada) tricosantina, a qual induz aborto em camundongos, coelhos e macacos, mas não em ratos e hamsters. Várias outras RIPs testadas apresentaram atividade abortiva similar em camundongos (YEUNG *et al.*, 1988, LI *et al.*, 2017).

Os efeitos da tricosantina sobre a fertilidade foram detalhadamente estudados: 1) causa necrose seletiva sobre o sincitrotrofoblasto placentário; 2) a formação de coágulos na circulação local induz mudanças na área infartada e 3) essas mudanças são acompanhadas por prejuízos das atividades funcionais, como diminuição do hormônio gonadotrofina coriônica humano e dos níveis de hormônios esteroides, danos causados às trocas metabólicas e aumento da síntese de prostaglandinas com a consequente indução de aborto. Esses efeitos são provavelmente devidos a alta toxicidade das RIPs para células de corioncarcinomas e trofoblastos, a qual é consistente com a alta atividade pinocítica dessas células (BARBIERI *et al.*, 1993).

Com o intuito de construir armas biológicas, várias drogas ou moléculas tóxicas têm sido ligadas covalentemente a carreadores que especificamente reconhecem células alvo. Uma variedade de moléculas foi usada para a construção dessas ferramentas biológicas. Os anticorpos monoclonais são os mais frequentemente usados como carreadores, mas também lectinas, hormônios, fatores de crescimento, receptores, substâncias ligantes de receptores e antígenos foram explorados (MOTA *et al.*, 1998).

As RIPs podem ser ligadas quimicamente a anticorpos para formar moléculas híbridas chamadas de imunotoxinas, direcionadas às células alvo do anticorpo usado. A ligação intermolecular entre anticorpo e toxina é feita por uma ligação dissulfeto, e menos frequentemente por ligações tioésteres (BARBIERI *et al.*, 1993). As imunotoxinas não inibem a síntese proteica em sistemas livres de células, a menos que essa ligação seja rompida por redução (MOTA *et al.*, 1998).

O primeiro conjugado com uma RIP tipo 1 foi preparado por uma ligação da gelonina com a Concanavalina A (STIRPE *et al.*, 1988). A cadeia A da ricina foi ligada

ao antígeno CD4 como uma arma na eliminação de células infectadas por HIV (ZARLING *et al.*, 1990). As RIPs ligadas aos antígenos responsáveis por doenças autoimunes são potencialmente usadas em terapia (BARBIERI *et al.*, 1993). Obviamente, um pré-requisito para assegurar o uso de imunotoxinas é a utilização de anticorpos específicos para as células-alvo (MOTA *et al.*, 1998).

Uma possibilidade terapêutica é o uso de imunotoxinas administradas intravesicalmente para a terapia de câncer de bexiga. A saporina contendo imunotoxina pode ser administrada com segurança a pacientes severamente imunodeficientes (FRENCH *et al.*, 1996). RIP contendo imunotoxinas e um fator de crescimento de fibroblastos-saporina conjugado específico para células tumorais de bexiga foram preparados e submetidos a ensaios clínicos (BATTELLI *et al.*, 1996). Imunotoxinas músculo-específicas são potenciais agentes de imunoterapia para o tratamento de espasmo do músculo focal, miastenia gravis e estrabismo, destruindo músculos oculomotores (HOTT *et al.*, 1998). Outras utilizações possíveis de imunotoxinas são para oftalmologia, doença de Alzheimer e para prevenir a proliferação de células da córnea (STIRPE e BATTELLI, 2006).

Estudos demonstraram que RIPs também possuem atividade anti-tumorais e antivirais (NG *et al.*, 1992; BOLOGNESI *et al.*, 2016). Por exemplo, MAP30, uma RIP tipo1 de 30 kDa, verificou-se ser capaz de ser um inibidor de proliferação viral de HSV-2 e HSV-1 (BOURINBAIAR e LEE-HUANG, 1996).

Muitas fontes de RIPs têm mostrado possuir eficaz atividade contra infecções de vírus de plantas e animais. Todos os tipos de RIPs têm atividade antiviral contra vírus de plantas, fungos e animais, exceto o tipo 2 RIPs obtidos a partir *Eranthis hyemalis* (KUMAR *et al.*, 1993) e *Sambucus nigra* (CHEN *et al.*, 2002). A atividade antiviral das RIPs em plantas e animais não é causada por um efeito direto sobre os vírus de células antes da infecção. Esta observação indica que as RIPs antivirais que são frequentemente extracelulares, levam à hipótese de morte em locais onde, RIPs seletivamente entram no citosol de células infectadas e inativam os ribossomos, impedindo assim a replicação do vírus (HARTLEY *et al.*, 1996).

Proteína antiviral de pokeweed (PAP) protege as plantas indicadoras adequadas a partir de infecções virais, que incluem DNA-vírus e RNA-vírus. Ela também impede a replicação em células humanas de vírus da poliomielite, citomegalovírus, vírus influenza, vírus herpes simplex e o HIV (CHEN *et al.*, 1991). A replicação do HIV nas

células foi inibida por RIPs e poderia ser usada em terapia da AIDS (SHAW *et al.*, 2005). RIP ativa em ribossomos de tabaco inibiram a formação de lesões locais provocadas por infecção pelo vírus do mosaico do tabaco em folhas de tabaco (TAYLOR *et al.*, 1994).

Tricosantina da planta *Trichosanthus kirilowii*, inibe seletivamente RNA de HIV e acúmulo de proteína, sem afetar a expressão do gene da célula hospedeira (BARBIERI *et al.*, 1993). A atividade antiviral é específica em relação às características do vírus e, portanto, podem ter aplicações agrícolas e clínicas (HARTLEY *et al.*, 1996).

Outras pesquisas, como as realizadas com a MAP30 também mostraram excelentes atividades anticâncer, além de uma atividade contra múltiplas células cancerosas, tais como leucemia linfóide, linfoma, Cori carcinoma, melanoma, câncer da mama, tumor da pele, câncer da próstata, carcinoma escamoso, carcinomas humano de bexiga, e doença de Hodgkin (SUN *et al.*, 2001; BASCH, GABARDI e ULBRICHT, 2003).

A atividades anticâncer de RIPs são atribuídas principalmente a via apoptótica. Com base nessas características, os pesquisadores estão tentando tirar vantagem das multifunções das RIPs para desenvolver medicamentos à base de RIP com atividade antiviral e anticâncer. No entanto, a forte imunogenicidade de RIPs limita significativamente suas aplicações clínicas (LI *et al.*, 2009).

Estudos estão sendo realizados para melhorar os efeitos adversos e conseqüentemente melhorar a utilização clínica de RIPs, abordagens como mutagênese do sítio e modificações químicas de proteína têm sido empregadas para reduzir a imunogenicidade de RIPs. Entre eles, a PEG-laço foi relatada como sendo a mais eficaz. A ligação química do polietileno-glicol (PEG) para proteínas terapêuticas levou a várias vantagens, como: aumento da meia-vida plasmática, menor toxicidade e maior estabilidade da droga e solubilidade (KOZLOWSKI e HARRIS, 2001).

Foi observado que RIPs possuem maior toxicidade em células tumorais do que para células normais (LIN *et al.*, 1970). É possível que as RIPs sejam mais prejudiciais para as células malignas, porque elas têm uma elevada taxa de síntese de proteínas, enquanto a proliferar ativamente, e também porque elas são mais sensíveis às toxinas (STIRPE e BATTELLI, 2006). Extratos de *Viscum album* e *Ximenia americana*, ambos contendo RIPs tipo 2, viscumina e riproximin, têm sido utilizados como agentes

anticancerígenos. RIPs podem ter algum efeito benéfico sobre doentes com câncer, não só atuando diretamente sobre as células cancerosas, mas também exercendo forte estimulação do sistema imune e induzindo a produção de citocinas nas células sob o efeito de várias RIPs (YAMASAKI *et al.*, 2004; YE *et al.*, 2005; BAYER *et al.*, 2012).

1.5 Curcina: uma RIP tipo 1 de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)

Jatropha curcas pertence à família *Euphorbiaceae*, família vegetal de importância para extração e purificação de RIPs (STIRPE *et al.*, 2007). A presença da curcina foi relatada inicialmente por Mourgue *et al.*, (1961), nas sementes há 57 anos. Posteriormente, Stirpe e colaboradores (1976), indicaram sua capacidade de inibir a síntese de proteínas em um sistema livre de células. A clonagem do gene da curcina e a demonstração da natureza dessa RIP tipo 1 foram ambas realizadas por Lin *et al.*, (2003a). Descobriu-se que a curcina não tinha efeito tóxico para células HeLa e células normais, mas apresentava efeitos inibitórios no crescimento da linhagem de células tumorais SGC-7901, Sp2 / 0 e hepatoma humano (LIN *et al.*, 2003b) e crescimento de células tumorais (NCL-H446, SGC-7901 e S180) (LUO *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2013) e contra receptores de células Her2 (JARAMILLO-QUINTERO *et al.*, 2015).

Wei *et al.*, (2004), demonstraram a atividade antifúngica da curcina contra fungos de interesse da agricultura: *Pyricularia oryzae* Cav., *Pestalotia funerea*, *Rhizoctonia solani* Kuha, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary.

Mohamed *et al.*, (2014), conjugaram curcina a nano partículas de ouro biogênicas para uma abordagem terapêutica multimodal em relação ao câncer cerebral. Em 2005, a existência de curcina 2, o homólogo da curcina, foi relatada por Qin *et al.*, (2005), nas folhas de mudas de *J. curcas* afetadas por seca, estresse de temperatura e infecção fúngica.

Na Tabela 1 pode ser encontrado um compilado das atividades biológicas confirmadas de diversas RIPs do tipo 1, (PURI *et al.*, 2012).

Tabela 1. Compilado sobre RIPs tipo 1 com suas respectivas fontes e atividades descritas.

Fonte	RIP	Massa molecular (kDa)	Atividade
<i>Amaranthus viridis</i>	Amaranthina	30	Atividade <i>N</i> -glicosidase, inibição traducional <i>in vitro</i>
<i>Momordica balsamina</i>	Balsamina	28	Atividade <i>N</i> -glicosidase, inibição traducional <i>in vitro</i>
<i>Bougainvillea spectabilis</i>	Bouganina	26	Adenina polinucleótideo glicosidase, inibição da síntese proteica
<i>Lychnis chalconica</i>	Lychnina	≈30	Adenina polinucleótideo glicosidase, inibição da síntese proteica
<i>Momordica charantia</i>	MAP30	30	Atividade <i>N</i> -glicosidase, anti-HIV e antitumoral, inibição em sistema livre de células;
	α-Momorcharina	30	Abortífera, atividade antitumoral e anti-HIV, imunossupressora;
	β-Momorcharina	29	Abortífera, atividade antitumoral e anti-HIV, imunossupressora.
<i>Momordica cochinchinensis</i>	Cochinina	28	Atividade <i>N</i> -glicosidase, antitumoral, inibição da síntese de proteínas
<i>Gelonium multiflorum</i>	Gelonina	30	Atividade <i>N</i> -glicosidase, antitumoral, inibição da síntese de proteínas, atividade DNase

<i>Hypsizigus marmoreus</i>	Marmorina	10	Inibição em sistema livre de células, inibidor da transcriptase reversa HIV-1, atividade antiproliferativa
<i>Lyophyllum shimeji</i>	Lyophyllina	20	Antimitogênica, inibidor da transcriptase reversa HIV-1, atividade antifúngica
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Trichosantrina	≈13	Atividade <i>N</i> -glicosidase, inibição em sistema livre de células
<i>Benin hispada</i>	Hispingina	21	Ribonuclease tRNA, atividade <i>N</i> -glicosidase, atividade antifúngica
<i>Phytolacca heterotepala</i>	Heterotepalina	28-36	Atividade adenosina glicosidase polinucleotídica, atividade <i>N</i> -glicosidase
<i>Flammulina velutipes</i>	Velina	19	atividade <i>N</i> -glicosidase, inibição em sistema livre de células;
	Flammulina	30	Atividade <i>N</i> -glicosidase, inibição em sistema livre de células

Fonte: modificada de PURI *et al.*, (2012).

Em 2005, Zhang e colaboradores, utilizando a metodologia de *Southern blot*, apresentaram a existência de pelo menos três cópias dos homólogos de curcina, onde esse resultado foi posteriormente sustentado através de pesquisa sobre o genoma de *J. curcas* por dados de sequenciamento genômico. Onde 12 genes de RIPs foram identificados no genoma da *J. curcas* (ZHANG *et al.*, 2012). Recentemente, uma nova RIP tipo 1, designado como Jc-SCRIP com maior peso molecular (38.938 Da), foi isolada da casca de sementes de *J. curcas* L. Essa proteína apresentou citotoxicidade

in vitro contra nove tipos de bactérias patogênicas humanas e um tipo de fungo (NUCHSUK *et al.*, 2012). Todas as pesquisas acima sugerem a presença de uma família de RIPs em *J. curcas*, e que, elas podem ser utilizadas como um potencial agente antimicrobiano e anticâncer natural em aplicações médicas e agrícolas.

1.6. Aproveitamento dos resíduos da produção de oleaginosas e da extração de óleo

No Brasil, a principal matéria-prima para a produção de biocombustível é a soja, responsável por mais de 70% do biodiesel produzido no país. Porém, além da *J. curcas*, culturas como crambe (*Crambe abyssinica*) e nabo-forrageiro (*Raphanus sativus*) despontam como potenciais alternativas interessantes para a produção de biodiesel (SOUZA *et al.*, 2009). Ferrari e colaboradores (2009), avaliaram a composição química de pinhão-mansão de diferentes origens, conforme pode ser observado na tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2. Características físico-químicas de amostras de sementes de pinhão-mansão.

Composição	Pinhão-mansão (%)
Umidade	7,63 ± 0,7
Lipídios	31,51 ± 6,3
Proteína	16,11 ± 1,8
Cinzas	4,56 ± 0,7
Fibra	16,00 ± 2,4
Carboidrato	23,83 ± 4,5

*Média e desvio padrão

** Calculado por diferença

Fonte: Ferrari *et al.*, 2009.

O pinhão-mansão (*J. curcas* L.) é um arbusto de folha caduca da família *Euphorbiaceae* e é capaz de produzir altos níveis de triacilglicerol para a matéria-prima de biodiesel (MONTES e MELCHINGER, 2016). O pinhão-mansão é tolerante às condições de *déficit* hídrico; portanto, tem atraído a atenção como uma fonte viável de biodiesel de próxima geração em regiões áridas. A tolerância do pinhão-mansão aos solos contaminados com elementos potencialmente tóxicos foi recentemente relatada, e isso chamou a atenção para a potencial utilidade da *Jatropha* para a produção de combustível de biomassa em terras poluídas (YADAV *et al.*, 2009; CHANG *et al.*,

2014; MARRUGO-NEGRETE *et al.*, 2015). Embora o pinhão-mansão não tenha sido considerado um hiperacumulador de elementos potencialmente tóxicos (POLLARD *et al.*, 2014), espécies de plantas tolerantes a elementos potencialmente tóxicos com características economicamente benéficas, como matéria-prima para biocombustível, podem ter vantagens potenciais para o desenvolvimento econômico sustentável e florestamento em áreas contaminadas (JAMIL, 2009).

O pinhão-mansão possui sementes que são compostas de aproximadamente 60% de amêndoas e 40% de casca, onde o material do núcleo compreendendo até 50% de óleo (SINGH *et al.*, 2008). Além disso, observa um bom rendimento na relação de grãos/óleos quando comparado com outras espécies de plantas oleaginosas e óleos extraídos. O óleo apresenta características físico-químicas adequadas à produção de biodiesel, com ácidos graxos de alta qualidade (ácido linoleico monoinsaturado e poli-insaturado), estáveis em altas temperaturas, com propriedades semi-seca adequadas, alta qualidade de queima, alto índice de cetano e simples conversão em biodiesel por transesterificação química ou biológica. (JONGSCHAAP *et al.*, 2007; KUMAR e SHARMANA, 2008; MAKKAR e BECKER, 2009; KOH e GHAZI, 2011; DURAES *et al.*, 2012). Atributos importantes da cultura incluem crescimento rápido, resistência a secas e pragas, capacidade de propagação em diferentes solos, perenidade e, como uma safra industrial não alimentar, evitando a competição com a agricultura alimentar (KUMAR e SHARMANA, 2008; ACHTEN *et al.*, 2008; BECKER e MAKKAR, 2008; MAKKAR e BECKER, 2009; ABHILASH *et al.*, 2009; BAILLIS e McCARTHY, 2011; EDRISI *et al.*, 2015).

De acordo com a Associação Brasileira dos Produtores de Pinhão-mansão (ABPPM) no ano de 2017, a área plantada encontra-se com 80 mil hectares, possuindo uma previsão de aumento de mais 20 mil hectares, entretanto, essa estatística não é oficial.

O rendimento necessário para a produção de 1 tonelada de óleo por extração por solventes ou mecânica, são necessárias 2,85 toneladas de sementes de *J. curcas*, sendo que aproximadamente 70% desse material ainda permanece como resíduo da cultura após o processo de extração, constituindo resíduos (ou torta) de sementes de *J. curcas* (ACHTEN *et al.*, 2008; BALDINI *et al.*, 2014). Este subproduto abundante de extração de óleo é um resíduo que também é rico em nitrogênio, fósforo, potássio e carbono e, com um significativo teor de proteína (pelo menos 16%), teoricamente,

podem fornecer todos os aminoácidos, com exceção da lisina, necessários para o crescimento de animais saudáveis (MAKKAR et al., 1998; BELEWU *et al.*, 2009).

Sementes de espécies oleaginosas, como *J. curcas* são mais propensas à degradação, sendo assim, não podem ser armazenadas por longos períodos. Quando comparadas as sementes amiláceas, a conservação das oleaginosas é mais difícil, uma vez que os lipídios são quimicamente menos estáveis do que as moléculas do amido. Por essa razão, a peroxidação de lipídios é frequentemente relatada como uma das principais causas de deterioração dessas sementes (PEREIRA *et al.*, 2013).

Contudo, se pensarmos em escala comercial, a produção de plantas com essa finalidade resultaria em grande montante de resíduos, nesse caso a torta, que em função de suas características e toxicidade não pode ser largamente utilizada e, portanto, em termos de sustentabilidade e preservação ambiental, necessita de correto destino final (VIRGENS *et al.*, 2017). De acordo com a Tabela 3, pode-se observar a composição química da torta de sementes de pinhão-manso.

Tabela 3. Composição química (% de matéria-prima) de tortas de sementes de pinhão-manso.

Composição	Torta de pinhão-manso(%)
Matéria-seca	91,73 ± 0,11
Lipídeos	14,21 ± 1,01
Proteína bruta	28,66 ± 0,45
Cinzas	5,94 ± 0,31
Glicose	0,25 ± 0,04
Sacarose	1,83 ± 0,33
Amido	12,00 ± 0,72
Fibra alimentar	36,68 ± ,120

Média e desvio padrão
Fonte: SOUZA et al., 2009.

Apesar do volume e das características nutricionais significativas do resíduo de pinhão-manso, a presença de compostos bioativos impedem e dificultam a aplicação desse subproduto na alimentação animal. (MENDONÇA e LAVIOLA, 2009). Os compostos incluem fatores anti-nutricionais tais como inibidores de tripsina e fitatos,

toxinas tais como ésteres de forbol e curcina e alérgenos tais como proteínas 2S. Os ésteres são os principais componentes tóxicos, quando ingeridos, podem agir de forma aguda, induzindo uma intensa resposta inflamatória ou cronicamente, induzindo o desenvolvimento do tumor. Embora esses compostos sejam lipossolúveis, com a maior parte do conteúdo de ésteres da semente ligadas com o óleo, essas quantidades mínimas que permanecem na torta de pinhão-manso são suficientes para prejudicar várias espécies de animais (GOEL *et al.*, 2007; MAKKAR e BECKER, 2009; DEVAPPA, MAKKAR e BECKER, 2010).

A desintoxicação eficiente do subproduto é necessária para aplicação subsequente como fertilizante ou como suplemento na alimentação animal. Numerosos processos de desintoxicação para este resíduo foram descritos, baseados em processos químicos, físicos, biológicos ou combinados (GOMES *et al.*, 2018). A Tabela 4, elaborada por Mendonça e Laviola (2009), traz o compilado de estratégias utilizadas por alguns autores, bem como as limitações e resultados encontrados.

Tabela 4. Estratégias de destoxificação presentes na literatura.

Autores	Estratégias testadas/ resultados	Limitação
Makkar <i>et al.</i> (1998)	Calor úmido (121°C/20-30 min) X calor seco: só curcina	- Não avaliou ésteres de forbol; -Testa lectina, não toxicidade da curcina; -Não validada em testes com animais.
Makkar e Becker (1999)	Variedade não-tóxica, 121°C/30 min: inibidor de tripsina (redução 83%) e lectina (99%) - Em ratos: tratamento térmico foi apenas parcialmente efetivo; Carpas: torta tratada ou não, perderem peso.	- Não avaliou ésteres de forbol; -Testa lectina, não toxicidade da curcina
Aregheore <i>et al.</i> (2003)	Melhores tratamentos (redução de ésteres do	- Alto custo;

forbol):

a) Calor úmido 121°C/30 min + Lavar 4 vezes c/ metanol (95%); - Experimento animal indicou destoxificação ineficiente.

b) Hidróxido de sódio 4% + Hipoclorito de sódio 4% + 121°C/30min (93%);

c) Hidróxido de sódio 4% + Lavar 2 vezes c/ metanol;

b) Hidróxido de sódio 4% + Lavar 4 vezes c/ água;

Substituindo a ração de ratos em 16%: todos perderam peso, mas o tratamento (a) foi o tratamento menos prejudicial.

Chivandi *et al.*, (2004, 2006)

(Zimbabwe)

Hexano 8 h + extrair hexano (3 x) por 45 min /30 °C + extrair etanol 95%

35 °C + 90 °C / 30 min + extrusada + extrair hexano (3x) 45 min / 30 °C + 121°C / 30 min.

- Alto custo e trabalhoso
- Teste em suínos (1 a 5%):
diarreia a partir do 14^o dia,
anemia e outras alterações
sanguíneas.

Martinez- Herrera *et al.*, (2006)

(México e Alemanha)

Tratamentos (redução de ésteres de forbol):

a) Bicarbonato de sódio + 121 °C / 25 min (75%);

b) Etanol 90% 2 horas (96%);

- Custo;

- Não testada em animais.

c) Etanol 2 h →
Bicarbonato + 121 °C /
25 min (98%);

d) Bicarbonato de sódio
+ Irradiação gama
(17%): só afetou fitato e
saponina.

Belewu e Ogunsola (2010) (Nigéria)	Experimentos caprinos com substituição):	com (50% pequenas alterações em parâmetros hematológicos;
	a) Torta tratada com <i>Aspergillus niger</i> ;	- Não foi quantificado ésteres de forbol
	b) Torta tratada com <i>Trichoderma longbrachiatum</i> ;	
	Nenhum animal morreu.	
Kumar et al., (2010) (Alemanha)	Semente é descascada, desengordurada com éter de petróleo em soxhlet, sofre tratamento com solventes(patente) e posteriormente autoclavagem a 121 °C por 15 min.	- Processo tem várias etapas, o que pode inviabilizar economicamente sua produção.
	Experimento com carpas, substituição de 38% da ração;	
	Nenhum animal morreu, foi tão eficiente no crescimento das carpas quanto a soja.	

Fonte: modificada de MENDONÇA e LAVIOLA (2009).

Apesar do alto valor nutricional da torta, seu uso para alimentação animal ainda não é possível devido à sua toxicidade. De acordo com Makkar e Becker (2009), em

média, 70% de todos os ésteres de forbol são removidos no óleo e o restante é encontrado na torta.

A torta de pinhão-manso apresenta toxicidade variada. Como pode-se verificar na análise da Tabela 5, o inibidor de tripsina variou de 18,4 a 27,5 mg/g; semelhantemente a este, as variações também foram significativas para saponinas e fitato. Não foram encontrados ésteres de forbol na torta obtida das sementes coletadas no México e a torta com maior índice deste foi a do Quênia com 3,32 mg/g.

Tabela 5. Fatores tóxicos de torta de pinhão manso proveniente de vários países

Origem	IT (mg/g)	Lectina ^b 1/(mg/mL)	Saponina (%)	Fitato (%)	Éster de forbol (mg/g)
Cabo Verde, Fogo	27,3	0,85	1,82	7,20	1,50
Senegal, Santhie Ram	23,6	0,85	2,21	8,20	2,27
Senegal, Nioro Du Rip	21,6	0,85	1,98	8,10	1,69
Ghana, Nyankpala	22,2	6,85	2,25	7,80	1,29
Benin, Cotonou	21,8	0,85	2,04	8,40	1,71
Burkina Faso	22,8	0,85	1,91	8,20	1,71
Quênia, Kitui	24,9	0,85	2,67	6,20	3,32
Tanzânia, Mombo	24,4	0,85	2,58	8,60	1,12
Burma, Sink Gaing	25,3	0,85	2,04	7,50	0,87
Índia, Kangra	24,7	6,85	2,39	8,20	1,10
Índia, Kangra	27,5	6,85	2,02	8,20	1,28
Costa Rica, Rio Grande	26,3	6,85	2,72	9,60	1,15
México, Vera Cruz	24,5	6,85	2,06	8,60	1,02
Índia, Nasik	24,7	0,85	2,01	8,60	1,76
Cabo Verde ^a	21,3	2,88	2,60	9,40	2,17
Nicarágua, Managua	21,1	2,88	2,00	10,1	2,70
Nigéria, Ife	18,4	-	2,00	7,20	-
Cabo Verde, Fogo	26,5	1,70	3,40	8,90	nd

^aVariedade de Cabo Verde cultivada em Managua na Nicarágua; ^binverso do mínimo de amostra (mg) por mL de ensaio necessário para produzir aglutinação; nd- não detectado. IT – Inibidores de tripsina. Fonte: adaptado de MAKKAR *et al.* (1997).

Xiao e Zhang (2011) também fizeram um estudo comparativo em relação à composição dos constituintes tóxicos e anti-nutricionais na torta de *Jatropha curcas* obtida por diferentes métodos de extração do óleo. As sementes foram descascadas e depois de moído, o albúmen passou por dois diferentes métodos de extração do óleo, sendo eles prensagem e extração em soxhlet utilizando éter de petróleo como solvente. Os teores dos componentes tóxicos encontrados na torta de pinhão manso encontram-se na Tabela 6.

De acordo com os autores, os baixos teores de lectina e inibidor de tripsina na torta obtida por prensagem ocorreu devido à temperatura elevada (120 °C) utilizada nesse processo. O teor de éster de forbol, no entanto, pouco foi alterado nos diferentes métodos.

Tabela 6. Toxicidade da torta obtida por diferentes métodos de extração de óleo.

Compostos tóxicos	Métodos de obtenção da torta	
	Soxhlet – éter de petróleo	Prensa
IT (mg/g) ^a	27,3	2,7
Lectina (mg/mL) ^b	38,8	1,5
Saponina (%)	2,9	2,6
Fitato (%)	11,1	11,6
Éster de forbol (mg/g)	3,1	2,9

^aInibidor de tripsina; ^binverso do mínimo de amostra (mg) por mL de ensaio necessário para produzir aglutinação.

Fonte: adaptado de XIAO e ZHANG (2011).

Diferentes outros trabalhos realizados por outros autores, utilizando metodologias diferentes para realizar o processo de desintoxicação de torta de sementes de pinhão-manso foram desenvolvidos, como o realizado por Xiao *et al.*, 2011 utilizando tratamentos enzimáticos em associação com produtos químicos (Tabela 7) e por Aderibigbe *et al.*, (1997), utilizando tratamentos térmicos (Tabela 8) em diferentes condições.

Tabela 7. Efeito dos diferentes tratamentos sobre a toxicidade da torta de pinhão manso

Parâmetros	Tratamento					
	Controle	Torta a	Torta b	Torta c	Torta d	Torta e
EF (mg/g)	2,88	2,47	0	0	0,98	1,16
IT (mg/g)	3,15	2,93	2,55	2,47	3,09	3,12
Lectina (mg/mL) ^f	3,43	3,41	1,49	1,35	1,46	1,62
Saponina (g/100g)	2,67	2,62	1,14	0,93	1,58	1,46
Fitato (%)	10,04	9,11	7,01	6,85	7,28	8,83

Torta a-Tratamento com enzimas; Tortas b e c- Tratamento com enzimas + metanol 60% e etanol 65%, respectivamente; tortas d e e- Tratamento com metanol e etanol 90%, respectivamente. IT inibidor de tripsina; EF- Éster de forbol; ^f -mínimo de amostra (mg) por mL de ensaio necessário para produzir aglutinação.

Fonte: adaptado de XIAO *et al.* (2011).

Tabela 8. Degradação ruminal de proteínas, teores de IT, saponina, lectina e fitato.

Amostras	DRP* (% N total)	Inibidor de tripsina (mg/g)	Saponina(%)	Lectina (mg/mL)*	Fitato (%)
TP	37,7	18,9	Na	Na	Na
TS	43,3	21,3	2,6	66,7	9,4
TP ^a	66,5	4,5	Na	50	Na
TP ^b	55,2	4,5	Na	Na	Na
TP ^{b'}	57,8	2,9	Na	50	Na
TP ^c	60,3	1,1	Na	Na	Na
TP ^{c'}	57,0	0,4	Na	50	Na
TP ^a	67,4	5,8	2,5	12,5	8,7
TS ^b	73,3	3,8	2,6	12,5	9,8
TS ^{b'}	73,4	1,2	2,6	12,5	9,2
TS ^c	71,9	0,8	2,6	12,5	Na
TS ^{c'}	72,1	0,3	2,6	12,5	9,4
TP ^d	55,8	0,4	Na	Na	Na
TS ^d	51,1	2,5	2,5	12,5	9,8

DRP: Degradação ruminal de proteína; a – amostra obtida pelo tratamento 1 (100°C, 60 min). b – amostra obtida pelo tratamento 2 (130°C, 30 min). b' - amostra obtida pelo tratamento 2 (130°C, 30 min). c - amostra obtida pelo tratamento 2 (160 °C, 30 min). c' - amostra obtida pelo tratamento 2 (160 °C, 60 min). d - Amostra obtida pelo tratamento 4 (100 °C, 60 min; 160 °C, 30 min). Na- não analisado. * mínimo de amostra (mg) por mL de ensaio necessário para produzir aglutinação.

Fonte: adaptado de ADERIBIGBE *et al.* (1997)

Zhao e colaboradores (2018) utilizando a metodologia de fermentação microbiana com cepas de Enterobacteriaceae para desintoxicar tortas de sementes de pinhão-mansão (Tabela 9), observaram uma redução nos compostos tóxicos e anti-nutricionais da torta de pinhão-mansão. Entretanto, ainda pôde se observar a presença dos mesmos.

Tabela 9. Desintoxicação da torta de sementes de *Jatropha curcas* usando cepas de *Enterobacter* Z11 em fermentação em estado sólido.

Análise	Não fermentada	Fermentada	Taxa de degradação (%)
Fitato (%)	6,08 ± 0,03	1,06 ± 0,01	82,6
Tanino (%)	0,373 ± 0,02	0,232 ± 0,02	37,8
Inibidores de tripsina (TIU/g)	84,8 ± 0,02	8,10 ± 0,03	90,5
Lectina (mg/mL)	0,309 ± 0,28	0,034 ± 0,22	88,9
Éster de forbol (mg/g)	1,22 ± 0,07	0,59 ± 0,09	51,6

TIU/g – Unidade de Inibição de tripsina

Fonte: ZHAO *et al.* (2018).

Uma estratégia a ser utilizada no processo de desintoxicação poderia ser o armazenamento. Neto (2009) em sua dissertação de mestrado, estocou tortas de mamona em estufa e a temperatura ambiente por um período de 6 meses, durante esse período as amostras foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular e confirmação eletroforética da presença de ricina. Nas duas metodologias de conservação o autor observou um decréscimo ao longo do armazenamento, sendo não mais observada a presença de ricina nas tortas de mamona armazenadas em temperatura ambiente no quinto mês de estocagem e no sexto mês na torta armazenada em estufa (37 °C).

Alguns fatos podem ser destacados após o levantamento bibliográfico, dentre eles destacamos que vários processos diferentes foram utilizados sob diversa forma e por diversos autores para verificar a viabilidade do processo de desintoxicação de torta de pinhão-manso, onde os mesmos não obtiveram sucesso. Os trabalhos citados anteriormente não avaliaram a presença de curcina em suas análises de avaliação tóxica.

O fato de um trabalho realizado com ricina, uma RIP mais tóxica, quando comparado com a curcina apresentar perda de funcionalidade após longo período de armazenamento, nos fez questionar sobre a estabilidade da curcina durante longo período de armazenamento de torta.

Outro fato importante a se destacar é que esses processos de desintoxicação além de ineficientes são onerosos, tornado não implementáveis na prática industrial. Após a leitura vasta da literatura demonstrando as inúmeras possibilidades da curcina e de outras RIPs tipo 1 como um potencial insumo biotecnológico, a hipótese inicial desse trabalho avaliar a presença de curcina em um subproduto tecnológico, sendo uma alternativa operacional viável com ganhos econômicos, sociais, ambientais e biotecnológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Monitorar a presença da curcina (uma RIP tipo 1) na torta residual de sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) durante diferentes períodos de armazenamento, avaliando sua integridade físico-química, conformacional e suas atividades biológicas *in vivo* e *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar o processo de extração de proteínas da torta residual de sementes de pinhão-manso;
- Isolar e purificar a curcina a partir da torta residual de sementes de pinhão-manso;
- Avaliar a integridade e o grau de pureza da curcina obtida das tortas de sementes de pinhão-manso armazenadas por diferentes períodos de tempo;
- Avaliar as atividades biológicas (RNA-*N*-glicosidase; toxicidade e inibição da síntese proteica) da curcina isolada das tortas de sementes de pinhão-manso armazenadas por diferentes períodos de tempo;
- Avaliar a toxicidade da curcina isolada de torta de sementes de pinhão-manso sob diferentes tempos de armazenamento sob *Artemia salina* em diferentes concentrações;
- Avaliar a atividade anti-helmíntica da curcina isolada de torta de sementes de pinhão-manso sob diferentes tempos de armazenamento sob *Ascaridia galli* em diferentes concentrações.

3 MATERIAIS

3.1 Vegetal

As sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) foram utilizadas para a obtenção da torta residual. Essas sementes foram removidas de frutos coletados de plantas cultivadas na área experimental do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os frutos foram colhidos maduros, na safra que ocorre no período compreendido entre os meses de março e julho. Depois de removidas dos frutos, as sementes foram lavadas com água destilada, secas por 16 h a 30 °C em estufa de secagem com circulação de ar e armazenadas a temperatura média de 12 °C até as etapas de utilização. É importante destacar que a espécie vegetal utilizada no presente trabalho foi devidamente cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – **SisGen** (No. processo ADA415C).

3.2. Animal

Nos ensaios biológicos foi utilizado a linhagem de *Pichia pastoris* KM71H (*Thermo Fisher Scientific*). Também foram utilizadas larvas de *Artemia salina* L., um microcrustáceo da classe Anostracea (*Brine Shrimp Test*), na forma de metanúplios e nematódeos adultos *Ascaridia galli*. Para produção de anticorpos policlonais foi utilizado um coelho macho adulto da raça Nova Zelândia com aproximadamente 8 meses de idade.

3.3 Reagentes

Cloreto de sódio; corantes (*Coomassie brilliant blue*); albumina sérica bovina; acrilamida; bis-acrilamida; acetona; β -mercaptoetanol; tampão fosfato de sódio (PBS); fenol; kit *TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems*; anticorpos primários e secundários; metanol; matriz cromatográfica Sephadex G-100; Tris [2-Amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol]; ácido clorídrico; ácido acético; sulfato de amônio, marcadores moleculares e outros reagentes de grau analítico.

4 MÉTODOS

4.1 Preparação da torta residual das sementes de pinhão-manso e armazenagem.

A torta foi obtida por meio de dupla prensagem dos grãos inteiros, em prensa mecânica tipo “expeller”, de aço inoxidável, com capacidade para extração de 150 Kg.h⁻¹. Após a prensagem para remoção primária do óleo, três amostras contendo 1 Kg de torta foram submetidas ao processo de secagem e armazenamento por 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias à 37 °C em estufa com circulação de ar. Após cada período, as amostras foram individualmente embaladas em papel alumínio, acondicionadas em sacos plásticos tipo *zip lock* e congeladas. O processo de obtenção da torta ocorreu em triplicata.

4.2 Delipidação química e preparo das farinhas da torta residual das sementes de pinhão-manso.

Após os diferentes períodos de armazenamento, as tortas secas foram descongeladas e submetidas à delipidação química com hexano (1:5 m/v) por 12 h, com quatro trocas durante esse período. Esse processo foi realizado na capela e a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Após a delipidação, cada amostra foi submetida à secagem por mais 12 h em estufa de circulação de ar, à temperatura ambiente. Em seguida, o material delipidado foi triturado em moinho elétrico e peneirado (peneira de 12 mesh) até a obtenção de uma farinha fina e homogênea. Essas farinhas foram acondicionadas em tubos Falcon estéreis e armazenadas a 10 °C até a realização das análises previstas no trabalho.

4.3 Obtenção do extrato proteico a partir das farinhas das tortas de pinhão-manso armazenadas por diferentes períodos.

Os extratos proteicos das farinhas das tortas foram obtidos com tampão PBS pH 7,2 (1:10, m/v) sob agitação constante, por 4 h e a 25 °C. Após esse período, os extratos foram centrifugados a 12000 x g, por 20 min e a 4 °C. Os precipitados foram

descartados e o sobrenadante (denominado extrato bruto da torta ou EB_t) foi filtrado e armazenado à -20 °C para ser utilizado nas demais etapas.

4.4 Precipitação das proteínas dos extratos brutos das tortas (EB_ts) com sulfato de amônio.

Os EB_ts foram submetidos à precipitação com sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, utilizando 80% de saturação conforme a metodologia utilizada por Lin *et al.*, (2010). Os EB_ts saturados foram mantidos em repouso por 6 h à 5 °C e, em seguida, centrifugados a 12000 x g por 20 min. Os sobrenadantes foram descartados e o precipitados foram coletados, solubilizados em PBS pH 7,2. As frações solubilizadas foram dialisadas por 12 h contra água ultrapura e por mais 4 h com o mesmo tampão PBS. Foram adotadas as seguintes nomenclaturas para as frações proteicas solubilizadas das tortas:

- ✓ FTP₁₅ ⇒ Fração proteica da torta de pinhão-mansão armazenada por 15 dias;
- ✓ FTP₃₀ ⇒ Fração proteica da torta de pinhão-mansão armazenada por 30 dias;
- ✓ FTP₄₅ ⇒ Fração proteica da torta de pinhão-mansão armazenada por 45 dias;
- ✓ FTP₆₀ ⇒ Fração proteica da torta de pinhão-mansão armazenada por 60 dias;
- ✓ FTP₇₅ ⇒ Fração proteica da torta de pinhão-mansão armazenada por 75 dias;
- ✓ FTP₉₀ ⇒ Fração proteica da torta de pinhão-mansão armazenada por 90 dias;

4.5 Dosagem de proteínas das frações proteicas das tortas de pinhão-mansão (FTPs).

As dosagens de proteínas da FTPs foram realizadas conforme o método de Bradford (1976), utilizando a albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

4.6 Purificação da curcuma das FTPs por cromatografia de exclusão molecular.

As FTPs, obtidas conforme descrito no item 4.4; foram aplicadas em colunas de Sephadex G-100 (0,8 x 100 cm), previamente equilibradas com tampão PBS pH 7,2 conforme a metodologia descrita por Lin *et al.* (2010). Em seguida, cada coluna foi

eluída com o mesmo tampão PBS, utilizando um fluxo de 1 mL.min⁻¹. As frações cromatográficas foram coletadas, quantificadas em espectrofotômetro pela medida da absorbância a 280 nm e analisadas por ensaios eletroforéticos (PAGE).

4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Os ensaios eletroforéticos unidimensionais em gel de poliacrilamida foram realizados conforme a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada para uso de placas verticais. As bandas proteicas foram identificadas com corante *Coomassie Brilliant Blue R-250* a 0,05 %, preparado em uma solução de metanol: ácido acético: água (1 : 3,5 : 8, v/v/v). Foram utilizados diferentes marcadores moleculares da *Ambresco*®.

4.8 Ensaio de imunodeteção da curcina das FTPs utilizando anticorpos policlonais anti-curcina.

Os anticorpos policlonais anti-curcina foram produzidas em um coelho macho adulto, da raça Nova Zelândia (com 8 meses de idade) e purificados nas dependências do GBME, conforme a metodologia descrita por (VERAS, 2015). Para ensaio de imunodeteção foi utilizada a técnica de *Western blotting*. Inicialmente, a curcina de sementes e das FTPs foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), na presença de SDS e sob condições redutoras. Após a eletroforese, as bandas proteicas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando PBS como tampão de transferência e a aplicação de 38 mA e 40 V por 2 h. Após a transferência, a membrana foi incubada em PBS pH 7,2 com 5% de leite Molico® (solução de bloqueio) por 5 min sob agitação lenta e a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada (2 h, a 8 °C) com o anticorpo primário (anti-curcina). Após esse tempo, a membrana foi lavada com o tampão PBS e incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG conjugado com a peroxidase) por mais 2 h, a 8 °C. O processo de revelação da membrana foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio 30%, cloreto de níquel e tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,2, no escuro e a temperatura ambiente.

4.9 Dicroísmo circular

A avaliação do padrão conformacional da curcina obtida das FTPs foi feita utilizando a técnica espectrofotométrica de dicroísmo circular (CD). As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro J-815 da JASCO. Inicialmente foi utilizada uma alíquota de 100 μL das amostras proteicas (contendo aproximadamente 20 μg de curcina obtida de sementes e das FTPs em tampão PBS 7,2). As medidas foram feitas numa cubeta de quartzo com 1 mm de caminho ótico, à temperatura controlada de 25 °C. Primeiro, foi obtido um espectro do branco, ou seja, apenas da solução do tampão de solubilização da proteína, para que não houvesse interferência do tampão. As contribuições do tampão, obtidas sob condições idênticas, foram subtraídas e todos os espectros de CD foram corrigidos a fim de eliminar quaisquer efeitos de ruído. Foi feita então, uma varredura de 200 a 250 nm aplicando a velocidade de 50 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$, registrando 8 acumulações. A predição quantitativa das contribuições da estrutura secundária foi realizada pela desconvolução dos espectros de CD usando o programa *SELCON 3*, desenvolvido por Sreemana e Woody (2000). Outros programas utilizados para processar os dados foram *Spectra Manager™ II* e *Origin®*

4.10 Fluorescência.

As medidas de emissão da fluorescência foram feitas a 25 °C em um espectrofluorímetro Hitachi modelo FP-777. As amostras de curcina de sementes e obtidas das FTPs foram excitadas em 295 nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 300 a 450 nm, usando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico. A concentração final de curcina usada nos ensaios foi 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após a coleta, foi feita a subtração do espectro do tampão a fim de excluir a interferência do espalhamento de luz. Em todas as medidas, foram usados filtros óticos de 295 nm no compartimento de emissão do equipamento.

4.11 Atividade RNA N-glicosidase *in vitro*.

A avaliação da atividade RNA *N*-glicosidase foi realizada conforme a metodologia descrita por Smith *et al.* (2003). Para esse ensaio, 20 µg de ribossomos de levedura (*Pichia pastoris*) foram incubados a 25 °C por 1 h com 1 µg da curcina purificada das diferentes FTPs, num volume final de 500 µL. A reação foi interrompida pela a adição de SDS 1%. O rRNA foi obtido através da extração com fenol-clorofórmio e precipitado pela a adição de 0,1 volume de NaOAc 2 M pH 6,0 e 2,5 volumes de etanol 100%. A mistura de reação foi congelada e o precipitado de rRNA foi obtido por centrifugação a 13000 x *g* por 30 min a 4 °C. O precipitado foi lavado com etanol 70 % e incubado 20 min no dessecador a vácuo para secar. Em seguida, 10 µg do rRNA foi tratado (por 4 min, a 60 °C) com 20 µL de anilina-acética 1 M, pH 4,5. No controle negativo, foi usada água no lugar da anilina. A reação foi interrompida pela a adição de 0,1 volume de NH₄OAc 2 M, 2,5 volumes de etanol 100% e centrifugadas a 15000 x *g* por 1 h a 4 °C. O precipitado obtido foi ressuspenso em 15 µL de tampão TPE (Tris 3,6 mM; NaH₂PO₄ 3 mM; EDTA 0,2 mM) contendo formamida 60%. A identificação dos fragmentos de rRNA depurinados foi realizada através de eletroforese em gel desnaturante de agarose-formamida, utilizando brometo de etídio e visualizados sob luz UV do transluminador.

4.12 Inibição da síntese proteica em sistema livre de células.

A capacidade das frações de curcina purificadas das FTPs de inibir a síntese de proteínas foi avaliada utilizando o kit *TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems* (Promega). Neste ensaio foram utilizadas alíquotas contendo 20 µg curcina de sementes e de tortas de sementes de pinhão-manso em diferentes períodos de armazenamento (FTP). Como controle negativo, apenas o tampão PBS pH 7,2 foi adicionada a reação. Como controle positivo da reação de inibição, foi utilizada 20 µg ricina comercial (*Sigma-Aldrich*). As reações contendo a curcina das FTPs, bem como os controles foram incubados 45 min a 30 °C. Em seguida, 2,5 µL da reação foram misturados com 25 µL do substrato da luciferase (*Luciferase Assay Reagent*). A medida de luz emitida foi realizada em um luminômetro, com 2 segundos de tempo retardado e 20 segundos de aquisição por amostra. Os resultados foram expressos em URL.s¹ (unidades relativas de luz por segundo) em função da concentração das

RIPs. Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores representados como média de três medições.

4.13 Bioensaio com *Artemia salina* para avaliar toxicidade frações de curcina purificadas das FTPs.

Para este teste, 25 mg de cistos de *A. salina* L. foram incubados em um recipiente contendo água do mar artificial (NaCl 23 g.L⁻¹; MgCl₂.6H₂O 11 g.L⁻¹, Na₂.SO₄ 4 g.L⁻¹; CaCl₂.2H₂O 1,3 g.L⁻¹; KCl 0,7 g.L⁻¹) à temperatura de 25 °C, na presença de luz e sob aeração constante (McLAUGHLIN *et al.*, 1998; MEYER *et al.*, 1982). Utilizou-se Na₂CO₃ para ajustar o pH e evitar a morte das larvas. Após a eclosão dos cistos, ocorrido em 24 horas, os nauplios foram transferidos para tubos de ensaio com auxílio de uma pipeta Pasteur. Em cada tubo foram colocadas 10 larvas, sendo completado até o volume final de 1 mL com água do mar artificial. Para o grupo controle, foi usado apenas a água do mar artificial, e para os grupos testes, água do mar artificial mais a curcina de sementes das FPTs nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg.mL⁻¹. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os poços de controle negativos continham 2 mL de água do mar artificial com 10 náuplios de *Artemia*. No outro grupo controle utilizou a BSA nas mesmas concentrações da curcina, também foi incluído. Após 24 horas, foi calculado o percentual de mortalidade (PARRA *et al.*, 2001; McLAUGHLIN *et al.*, 1998).

4.14 Atividade anti-helmíntica

Esse ensaio foi realizado na UFMG, utilizando helmintos adultos, machos e fêmeas de *Ascaridia galli* cedidos. Os helmintos de tamanho variando de 5 a 7 cm foram selecionados e lavados em solução salina 0,9%, e aqueles considerados ativos foram transferidos para placas de Petri descartáveis (150 × 15 mm), contendo solução Tyrode (KALEYSA, 1975) pré-aquecida (37 °C), totalizando 10 nematoides por placa. A seguir, foram adicionadas alíquotas da curcina obtida da fração proteica da torta armazenada por 90 dias, nas seguintes concentrações: 1; 2; 3; 4 e 5 mg.mL⁻¹. Os nematoides foram mantidos em estufa BOD, à temperatura de 37±1 °C, e examinados 6, 12, 24, 48 e 72 h após o tratamento. Os nematoides imóveis, mesmo após breve

pressão com agulha estéril, foram considerados mortos (SHILASKAR e PARASAR, 1985). O experimento foi repetido três vezes para cada dose, e a porcentagem de parasitas mortos em cada grupo foi calculada. Esse teste foi acompanhado de dois controles negativos constituídos por água e solução salina 0,9% e um controle com a droga referência, citrato de piperazina (5 mg.mL^{-1}), administrada de acordo com o fabricante (Proverm Tortuga)

4.15 Análise estatística

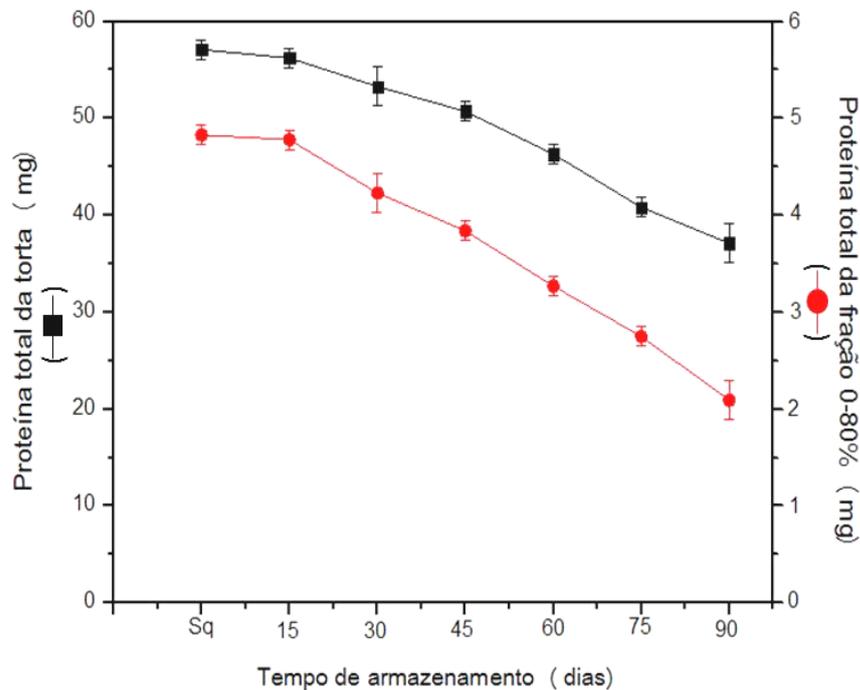
Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando-se o teste Student-Newman-Keuls, com auxílio do programa *InStat* (Graphpad InStat: GraphPad Software Oberlin, San Diego – CA, USA). O nível de significância adotado foi $P < 0,05$ (PIMENTEL-GOMES, 1987).

5 RESULTADOS e DISCUSSÕES

5.1 Dosagem de proteínas das frações proteicas das tortas de pinhão-manso (FTPs)

Na Figura 4, pode-se observar que ao longo do armazenamento das tortas de sementes de pinhão-manso houve um decréscimo na concentração de proteínas totais. Utilizando a metodologia de Bradford, (1976). O mesmo decréscimo proteico foi constatado no extrato bruto proteico de tortas de sementes de pinhão-manso após a precipitação com sulfato de amônio (80%).

Figura 4. Dosagem de proteínas solúveis dos extratos brutos das sementes quiescentes (Sq), dos extratos brutos e das frações proteicas (precipitadas com 80%) das tortas de sementes de pinhão-manso armazenadas por 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias. Foram utilizadas três amostras para cada período avaliado.



Fonte: Autor (2018)

Marcos Filho (2009), observou que durante o processo de deterioração das sementes ocorrem alterações nas proteínas, como, por exemplo, decréscimo no teor e síntese de proteínas; acréscimo no teor de aminoácidos; decréscimo no teor de

proteínas solúveis; desnaturação das proteínas provocadas por temperaturas elevadas, determinando a perda da habilidade de desempenhar suas funções.

Foram estudados genótipos de *J. curcas* procedentes de quatro diferentes regiões agroclimáticas do México cujas características morfológicas diferiam (SAETAE; SUNTORNSUK, 2011). Nesse estudo, as sementes eram ricas em proteína bruta (31-34,5%). Em 2017, Zhang e colaboradores, realizando precipitação com sulfato de amônio 80% do extrato bruto de *J. curcas* o mesmo apresentou uma concentração de 196,4 mg de proteínas utilizando a metodologia de Lowry, representando 8,7% do extrato bruto total da semente.

Nepal e colaboradores (2018), avaliaram a composição e concentração proteica de extrato bruto de *J. curcas* desintoxicada, proteína isolada de soja e farelo de trigo. Onde o extrato bruto de *J. curcas* apresentou uma concentração de proteína total um pouco menor quando comparado com a proteína isolada de soja, mas bem acima da concentração de farelo de trigo. Além disso apresentando maiores concentrações de histidina, isoleucina, fenilalanina, metionina, treonina, triptofano e valina quando comparado com as outras fontes de proteínas.

Além disso, no estudo, o extrato proteico bruto desintoxicado de *J. curcas* apresentou um conteúdo relativamente alto de proteína digestível, lipídios e um perfil de aminoácidos bem equilibrado (exceto lisina e cistina) e pôde substituir a farinha de peixe em até 75% sem afetar significativamente o crescimento da carpa comum. Além disso, com base nos vários parâmetros sanguíneos e plasmáticos, o Extrato não eram tóxicos para a carpa comum (NEPAL, 2018).

É fato que a metodologia na obtenção do extrato proteico, bem com a forma de extração e obtenção do biodiesel de *J. curcas* influencia na quantidade e qualidade dessa composição. Xiao e Zhang, (2014) compararam o teor proteico de *J. curcas* após metodologias diferentes de extração: por Soxhlet e por prensa tipo parafuso; obtendo respectivamente 58,6% e 45,3%; apesar de apresentar uma taxa de recuperação menor, a extração por prensa tipo parafuso apresentou menores índices de toxinas e compostos antinutricionais; e uma taxa de digestibilidade *in vitro* menor, quando comparado com o método de extração a quente.

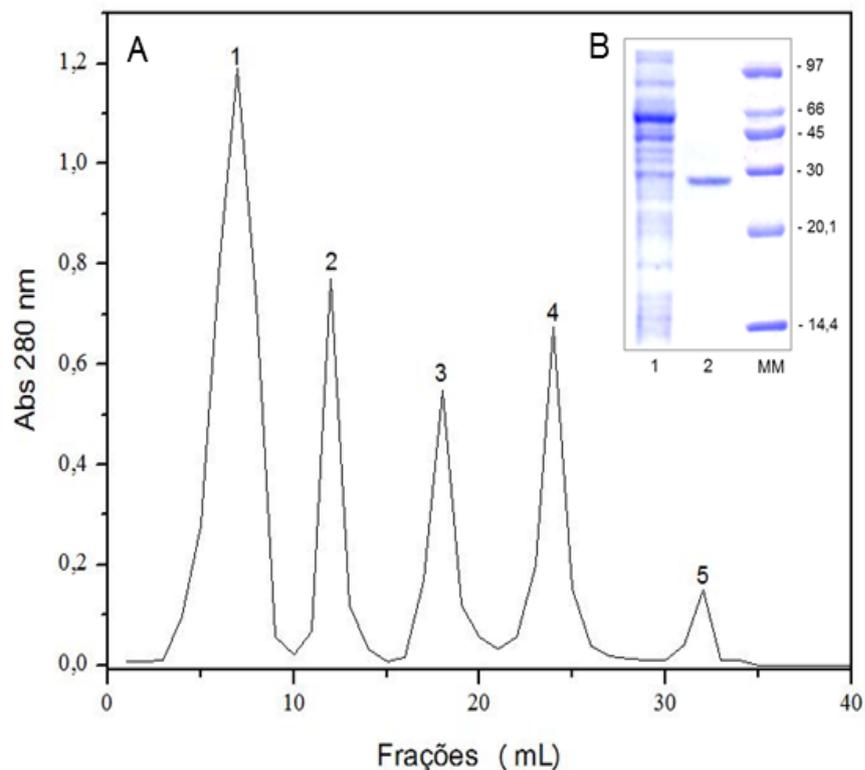
O teor de proteína presente nas sementes de pinhão-mansão tem despertado interesse para o potencial uso da torta ou do farelo resultantes da extração de óleo

como ingrediente de ração animal; no entanto, a presença de componentes tóxicos e fatores anti-nutricionais deve ser considerada (FERRARI *et al.*, 2009).

5.2 Purificação da curcina das FTPs por cromatografia de exclusão molecular

As amostras de extrato bruto de *J. curcas* foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular, utilizando coluna Sephadex-G100, eluída com o tampão PBS pH 7,2. Onde foram obtidos 5 picos, referenciado abaixo (Figura 5A) como 1, 2, 3, 4, e 5. A fração do pico 4, referente a curcina foi analisada através de eletroforese SDS-PAGE observando uma faixa de aproximadamente 28,2 kDa (Figura 5B) conforme mencionado por Lin e colaboradores, (2010). Além disso, pode-se observar a ausência de outras bandas no gel de eletroforese, demonstrando que apenas um processo cromatográfico foi suficiente para a purificação da proteína.

Figura 5. Purificação da curcina de sementes de pinhão-manso (*J. curcas*).



(A) Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex-G100. A matriz foi equilibrada e eluída com o tampão PBS 7,2. Onde poder ser observado 5 picos distintos. **(B)** SDS-PAGE (15%) sob condições redutoras. 1) Fração proteica 0-80% obtida do extrato da farinha de sementes de *J. Curcas*; 2) Fração do Pico 4 (referente a curcina) e MM – marcadores moleculares (kDa).
Fonte: Autor (2018).

O cromatograma acima apresenta cinco picos distintos após uma única corrida cromatográfica, utilizando coluna de Sephadex G-100. Vale ressaltar que outros autores purificaram a curcina utilizando a mesma metodologia, onde os mesmos autores sequenciaram a composição de aminoácidos, que foi de 251 aminoácidos com a seguinte composição: Asx31, Thr15, Ser16, Glx22, Pro9, Gly15, Ala22, Val26, Met2, Ile14, Leu24, Tyr14, Phe12, Lys18, His2, Arg7, Cys1 e Trp1 (LIN *et al.*, 2010a).

A torta de semente de pinhão-manso é um subproduto da obtenção de biodiesel que possui proteínas de alto valor biológicos, que tem despertado interesse em sua utilização na produção animal, apresentando como principal problema a composição de produtos tóxicos e anti-nutricionais, como a curcina. Várias alternativas vêm sendo empregadas com o objetivo de levar a uma diminuição de compostos tóxicos, inclusive o próprio armazenamento prolongado. Conforme pode ser observado na tabela 10, ao longo do armazenamento de 90 dias da torta, o extrato bruto e a fração precipitada com sulfato de amônio (80%) diminui significativamente ao longo do tempo, entretanto o rendimento de curcina isolada por cromatografia de exclusão molecular permanece praticamente inalterado ao longo do armazenamento, havendo apenas uma diferença significativa quando comparado com a semente quiescente. Esse dado merece destaque e cuidado pois demonstra uma conservação da curcina podendo ocasionar intoxicação alimentar e contaminação do manipulador.

Este resultado não pode ser comparado com outros estudos de conservação ou de avaliação tóxica de torta de *Jatropha curcas*, visto que na literatura observa-se análise de diversos constituintes tóxicos e anti-nutricionais, como éster de forbol, inibidores de tripsina, fitato e saponina (MAKKAR *et al.*, 1997; MENDONÇA e LAVIOLA, 2009; XIAO *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2018). Entretanto, observa-se uma estabilidade na concentração da curcina ao longo do armazenamento de 90 dias, fato este que não foi encontrado por Neto (2009), em seu trabalho com torta de mamona.

Tabela 10. Rendimento das curcinas isoladas das sementes quiescentes e das tortas de sementes obtidas após diferentes dias de armazenamento.

Fração	Tempo de armazenamento (dias)	*Proteína (mg/g)	Redimento (%)
¹ Ebts	⁴ Sq	571,15 ^a	100 ^a

	15	562,38 ^b	100 ^a
	30	533,02 ^c	100 ^a
	45	507,38 ^d	100 ^a
	60	463,25 ^e	100 ^a
	75	408,12 ^f	100 ^a
	90	371,19 ^g	100 ^a
	Sq	48,3 ^a	8,45 ^a
² Fração 0-80%	15	46,8 ^b	8,50 ^b
	30	42,3 ^c	7,90 ^c
	45	38,4 ^d	7,60 ^d
	60	32,7 ^e	7,00 ^e
	75	27,5 ^f	6,70 ^f
	90	20,9 ^g	5,60 ^g
	Sq	0,622 ^a	0,1 ^a
³ P4 (Sephadex-G100)	15	0,571 ^b	0,1 ^a
	30	0,577 ^b	0,1 ^a
	45	0,576 ^b	0,1 ^a
	60	0,575 ^b	0,1 ^a
	75	0,577 ^b	0,1 ^a
	90	0,575 ^b	0,1 ^a

¹Extrato bruto da torta sementes de *J. curcas* obtido com PBS pH 7,2

²EBTs precipitado com sulfato de amônio 80%

³Fração referente a pico 4 (correspondente a curcina) das cromatografias em Sephadex-G100 utilizando frações 0-80% das tortas de sementes.

^dTeor de proteína total determinado pelo método de Bradford.

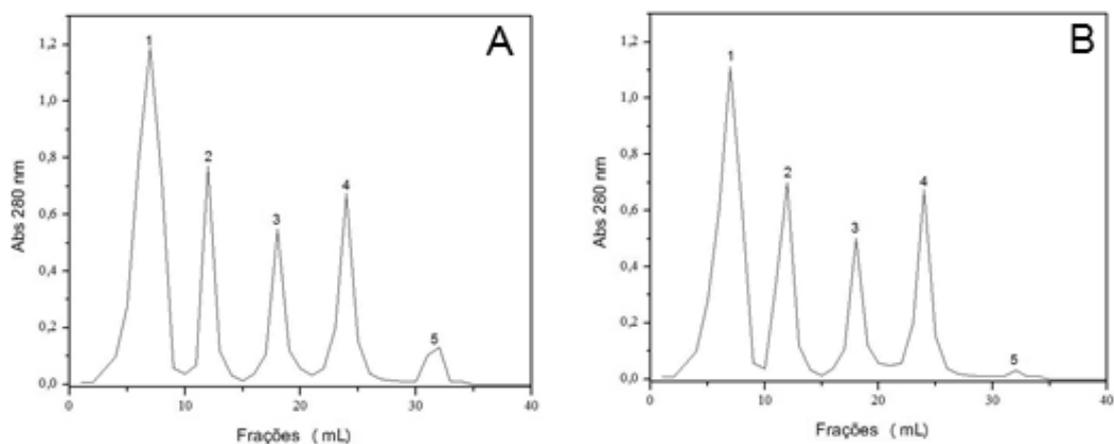
^eSementes quiescentes de *J. curcas* com 15 dias de armazenamento.

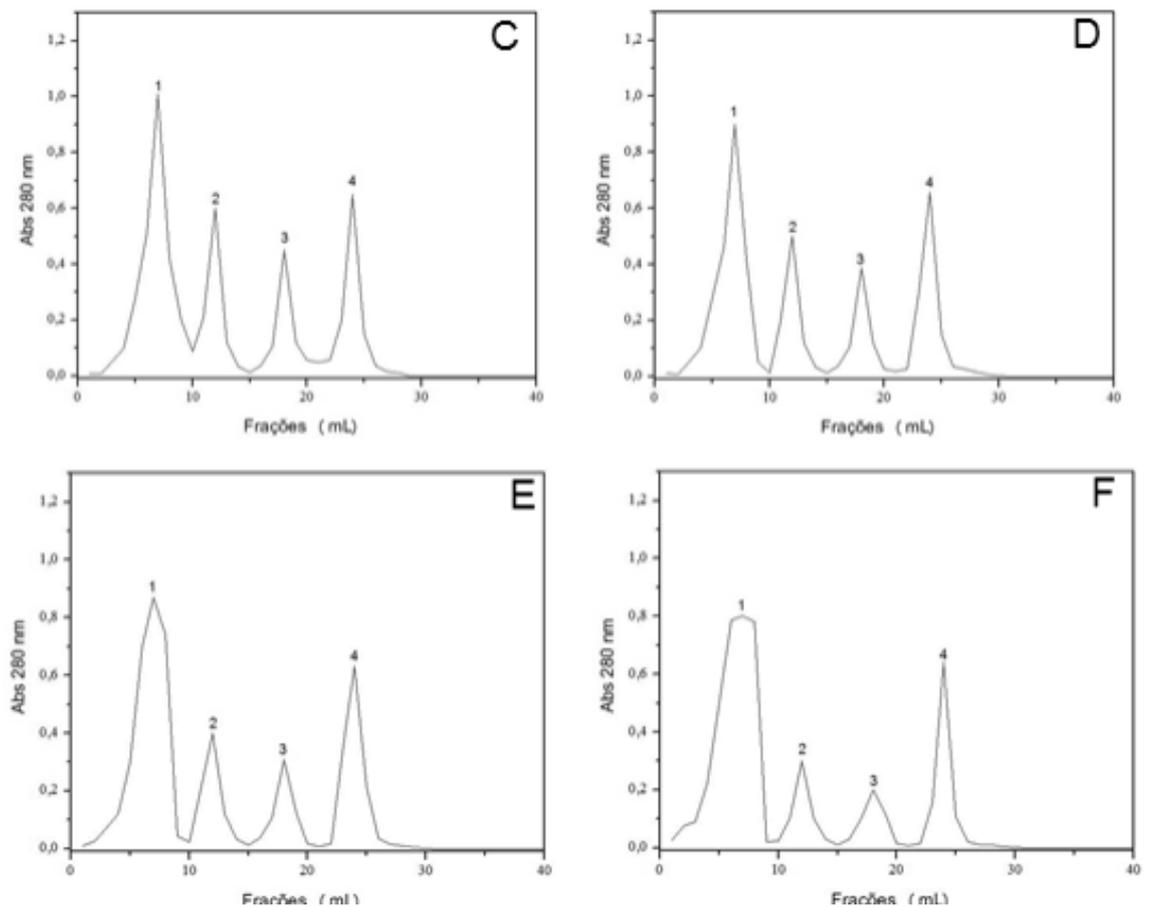
Fonte: Autor, (2018).

Em 2010, Castellion e colaboradores avaliaram a estocagem de duas linhagens de quinoa ao longo de 6 meses. Os autores observaram que houve uma redução de 45% na concentração de proteínas totais após 3 meses de armazenamento e após 6 meses essa redução é ainda maior, sendo de 71%. Em 2017, pesquisadores avaliaram a oxidação proteica em sementes de *Pongamia pinnata* ao longo de 405 dias de armazenamento aumentou, bem como uma diminuição da atividade antioxidante da semente ao longo do armazenamento (SAHU *et al.*, 2017).

As amostras de extrato bruto de *J. curcas* foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular, utilizando coluna Sephadex-G100, eluída com o tampão PBS pH 7,2. Onde foram obtidos 5 picos, referenciado abaixo, como 1, 2, 3, 4 (curcina), e 5. A cromatografia foi realizada em amostragem diferentes dias de estocagem: 15 (A); 30 (B); 45 (C); 60 (D); 75 (E) e 90 (F) dias. Podendo observar (Figura 6) que o pico correspondente a curcina (Pico 4) permanece praticamente inalterado ao longo do armazenamento, fato este não observado nos demais picos (1, 2, 3 e 5), onde observa um decréscimo das demais proteínas e até mesmo uma eliminação total, como observado no Pico 05 que não é mais observado a partir de 45 dias de armazenamento (Figura 6C).

Figura 6. Isolamento da curcina das frações proteicas 0-80% das tortas de sementes de pinhão-mansó obtidas após diferentes dias de armazenamento.





Cromatograma realizado em Cromatografia de Exclusão molecular em coluna de Sephadex-G100, equilibrada e eluída em tampão PBS pH 7,2 em diferentes períodos de armazenamento. Fração proteica da torta obtida com 15 (A), 30 (B), 45 (C), 60 (D), 75 (E) e 90 dias de armazenamento. Fonte: Autor (2018).

A estabilidade de RIP tipo 1 também foi observada por Barroso, (2016) avaliando a estabilidade térmica da podagrina, proteína obtida da semente de *J. podagrica*. Através do ensaio de termoestabilidade da podagrina, o autor demonstrou uma temperatura de *melting* em torno de 65 °C demonstrando a estabilidade térmica da proteína.

A descrição da purificação da curcina e o estudo da sua composição química preliminar foram realizados com sementes de *J. curcas* oriundas da cidade de Panzihua, na China, onde se caracterizou a curcina como uma proteína básica principal, que constitui cerca de 20% do total de proteínas solúveis extraídas (BARBIERI *et al.*, 1993).

Diversos estudos relatam o papel fundamental de RIPs como ferramenta de proteção da planta contra insetos e fungos (JABER *et al.*, 2010). Entretanto outras funções na fisiologia das plantas já foram relatadas na literatura, como: reorganização

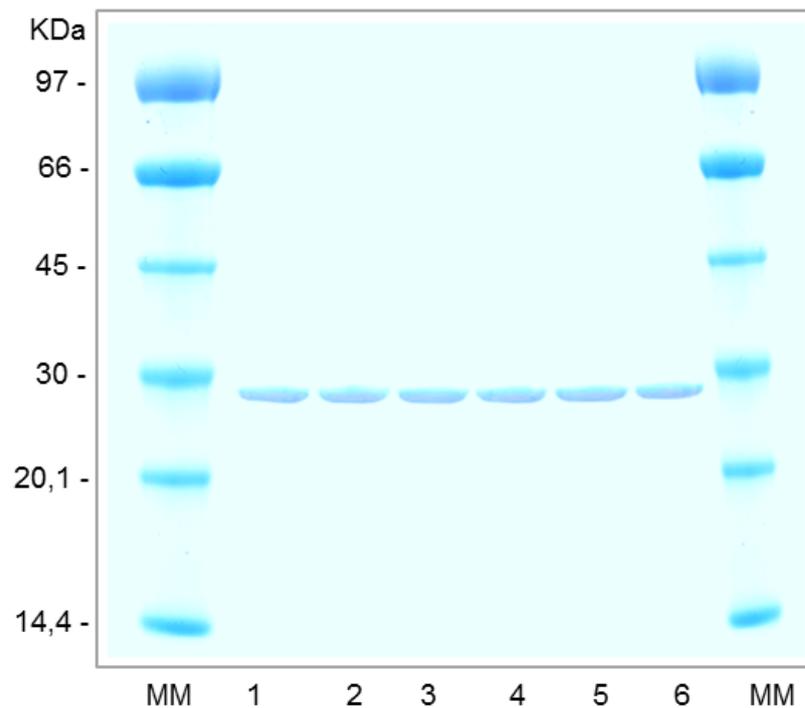
da maquinaria translacional em situação de estresse e envolvido na senescência; bem como indicativos da participação da resposta da planta à seca e a salinidade, envolvido na maturação de micrósporos, bem como função de armazenamento (ZAEYTIJD e VAN DAMME, 2017). O fato relatado pelos autores acima foi constatado em nossa pesquisa, onde se observa uma conservação de uma proteína essencial para a sobrevivência da planta.

Em investigação recente que teve por objetivo detoxificar a torta oriunda de sementes de *J. curcas*, estudar toxinas, fatores anti-nutricionais e propriedades funcionais da proteína isolada da torta detoxificada, os teores de proteínas da torta bruta e da torta detoxificada foram semelhantes, sugerindo que o método de extração utilizado (etanol) não afetou a concentração de proteínas. Entretanto, as concentrações dos outros constituintes foram bastante diferentes. A porcentagem de proteína encontrada nos isolados foi de 89,0% na torta bruta, cerca de quatro vezes maior que na torta detoxificada (cerca de 23,0%). Após detoxificação da torta, ésteres de forbol e lectinas não foram detectados. As concentrações de ácido fítico, de inibidores de tripsina e de saponina também foram muito menores na torta detoxificada (SAETAE; SUNTORNSUK, 2011). Fato preocupante, pois nos estudos encontrados na literatura, a avaliação do processo de desintoxicação de torta de *J. curcas* inclui basicamente a determinação de ésteres de forbol, não sendo mencionado em sua maioria a determinação e/ou avaliação de curcina.

5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise em SDS-PAGE da alíquota revelou que o pico 4 apresentou banda proteica com massa molecular aparente de 28,1 kDa (Figura 7), similar ao previsto na curcina, RIPs tipo 1 isolada de espécie do gênero *J. curcas* (LIN *et al.*, 2010). Esse resultado mostrou que a proteína pode ser facilmente separada das demais através de uma única etapa cromatográfica por exclusão molecular.

Figura 7. SDS-PAGE (15%) sob condições redutoras das curcinas isoladas das tortas de sementes de *J. curcas*.

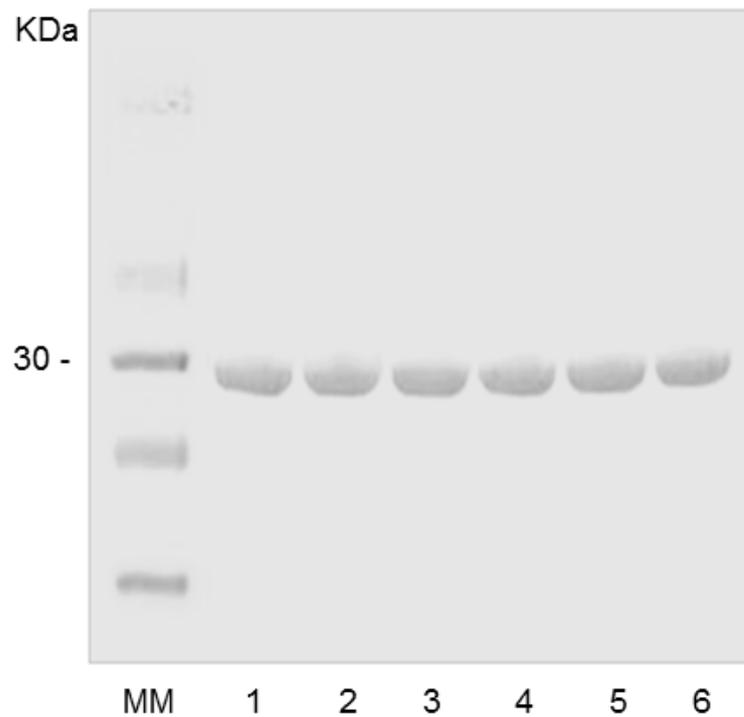


Análise por SDS-PAGE do pico 4 de extrato proteico após precipitação de sulfato de amônio (80% de saturação). MM – marcadores moleculares. Pico 4 (Curcinas) das tortas obtidas com 15 (linha 1), 30 (linha 2), 45 (linha 3), 60 (linha 4), 75 (linha 5) e 90 (linha 6) dias de armazenamento. Fonte: Autor (2018).

5.4 Ensaio de imunodeteção da curcina das FTPs utilizando anticorpos policlonais anti-curcina

A fração retida na coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephadex G-100, conhecida como pico 4, conforme mencionado anteriormente foi submetido ao ensaio de *Western blotting*. Este resultado é importante por confirmar a presença de curcina em todas as tortas de sementes de pinhão-manso armazenadas, sendo facilmente visualizado pela forte interação com o anticorpo policlonal anti-curcina (Figura 8).

Figura 8. *Western blotting* das curcinas isoladas das frações proteicas das tortas de sementes de *J. curcas*.

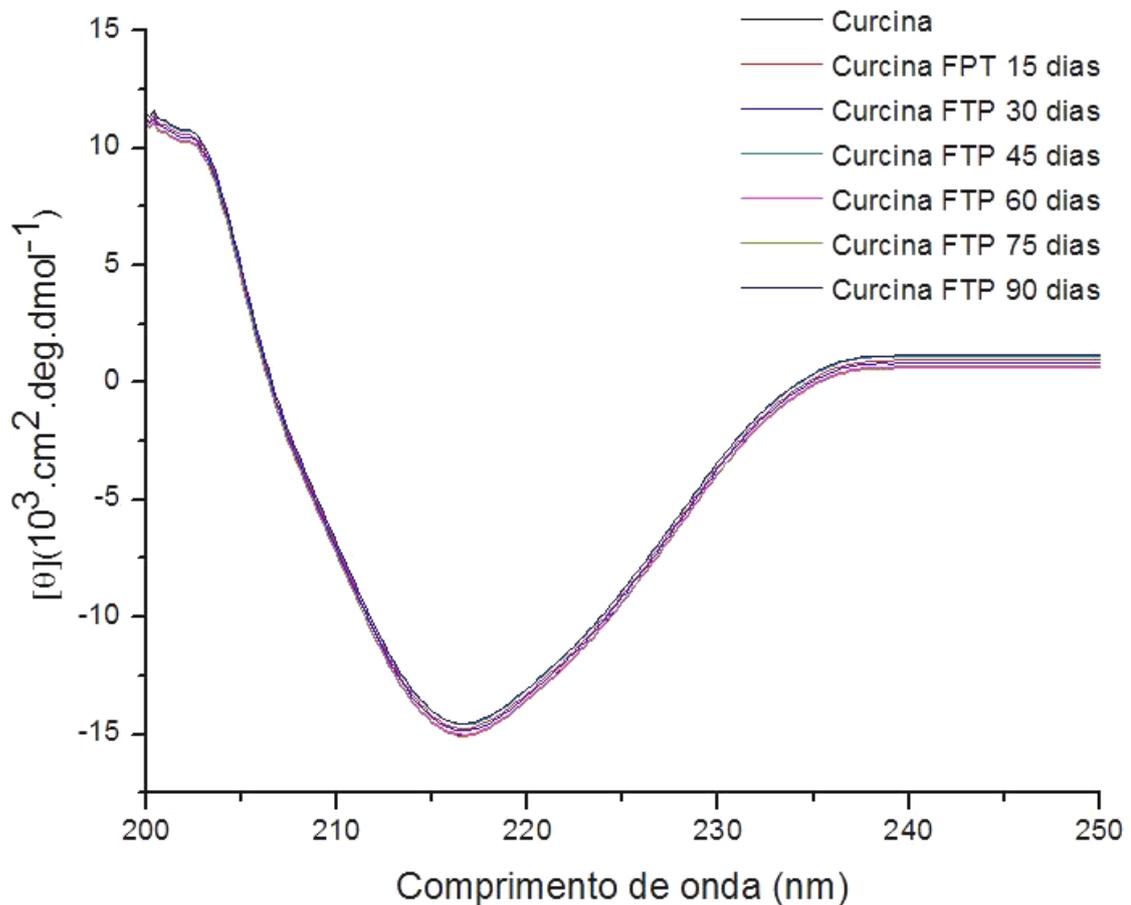


Análise por Western blotting do pico 4 de extrato proteico após precipitação de sulfato de amônio (80% de saturação). MM – marcadores moleculares. Pico 4 (Curcinas) das tortas obtidas com 15 (linha 1), 30 (linha 2), 45 (linha 3), 60 (linha 4), 75 (linha 5) e 90 (linha 6) dias de armazenamento. Fonte: Autor (2018).

5.5 Dicroísmo circular

A técnica de Dicroísmo circular é uma ferramenta bastante utilizada para estudos conformacionais de proteínas ou de polipeptídeos em solução, devido à sua capacidade de indicar o tipo de estrutura secundária, sendo útil no monitoramento de comprovações e alterações conformacionais de proteínas sob diversos fatores, como por exemplo: pH, temperatura e ao longo do tempo. Como resultado dessa análise, o espectro de dicroísmo circular apresentou uma banda negativa de amplitude distinta com mínimo em 217 (Figura 9). Este espectro concorda com a presença de estruturas secundárias de β -folha é predominante (aproximadamente 43,4% de β -folha calculada). Resultado semelhante foi observado por Lin e colaboradores, (2010) onde os pesquisadores observaram um percentual de β -folha de 43,5% em amostras de curcuma, semelhante inclusive a estrutura de lectinas (LOL1) de *Lathyrus ochrus* com 43% de β -folhas (BOURNE *et al.*, 1990).

Figura 9. Espectros de CD da curcina obtida de sementes e das frações proteicas das tortas de pinhão-manso (FTP) armazenadas por 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias.



As medidas foram realizadas com soluções proteicas de aproximadamente 20 μg da curcina de sementes e das FTPs em tampão PBS pH 7,2. Os espectros foram obtidos variando o comprimento de onda entre 200 a 250 nm e registrados com uma média de 8 varreduras, a temperatura ambiente (25 $^{\circ}\text{C}$), utilizando cubeta retangular de caminho óptico de 1 mm.

Fonte: Autor (2018).

As análises quantitativas do espectro de CD da curcina realizadas com os programas CONTIN e SELCON 3, Spectra Manager e Origin mostraram que existe uma predominância de folhas- β (Tabela 11) em concordância com a estrutura da curcina observada por Lin e colaboradores, (2010).

Tabela 11. Predição da estrutura secundária da curcina de sementes e da curcina da fração proteica da torta armazenada por 90 dias.

Estrutura secundária	Curcina	*Curcina FTP _{90 dias}
		(%)
Folhas- β	43,6	43,4
Hélices- α	27,1	28,5
Voltas	19,2	18,9
Não ordenadas	10,1	9,2

*Curcina isolada da fração proteica da torta de sementes armazenada por 90 dias
Fonte: Autor (2018).

Resultados semelhantes foram encontrados na curcina com 43,5% de β -folhas; 22,3% de α -hélice e 34,2% de formas aleatórias (LIN *et al.*, 2010a) demonstrando que a curcina não sofreu alterações conformacionais. Pode-se observar uma conservação conformacional quando comparamos a curcina isolada de semente quiescentes e na FTP90 dias, bem como quando comparado com os dados de predição de outros autores, como Lin e colaboradores. Resultados semelhantes, forma observado em outras RIPs do tipo 1, como a podagrina com 41,3% de β -folhas; 23,1% de α -hélice e 31,2% de formas aleatórias (BARROSO, 2016).

Fabbrini e colaboradores (2017), observaram que apesar das diferenças nas sequências de aminoácidos, a dobra tridimensional global de RIPs é bem conservada como estimado pela sobreposição das estruturas 3D de vários RIPs tipo 1 com o da cadeia A da Ricina, que demonstra claramente que RIPs e RIPs tipo 1 todos compartilham um "*RIP fold*" comum, caracterizado pela presença de dois domínios principais: um domínio N-terminal, que é principalmente de β folha, e um domínio C-terminal predominantemente α -hélice.

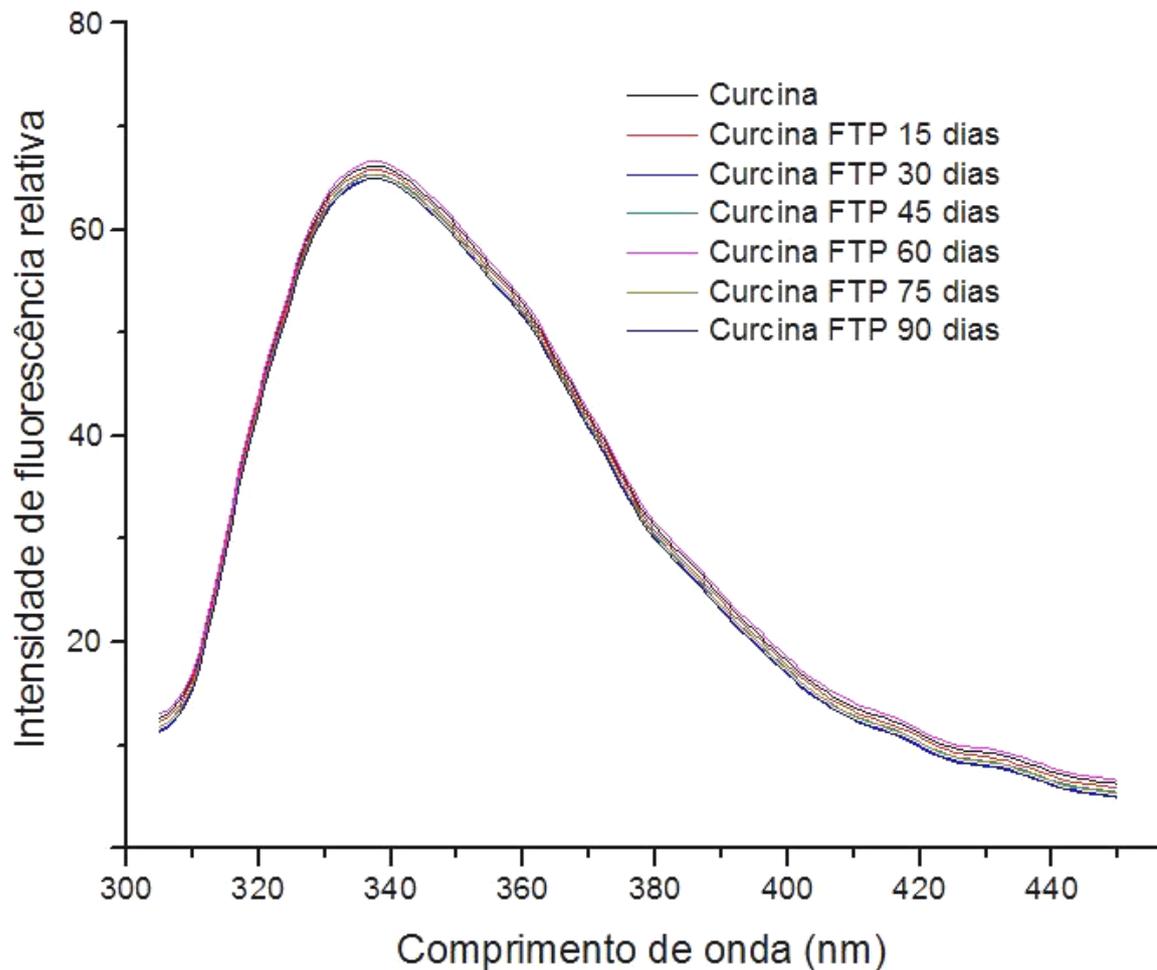
5.6 Fluorescência

Visando a obtenção de mais informações sobre as características conformacionais da curcina, foram realizadas medidas de emissão da fluorescência em um espectrofluorímetro Hitachi modelo FP-777. Esta técnica baseia-

se na propriedade que algumas moléculas possuem de, ao serem excitadas, emitirem luz em comprimentos de onda mais longos. No caso das proteínas, três resíduos de aminoácidos apresentam esta propriedade: a tirosina, o triptofano e a fenilalanina (LACKOWICZ, 1983). Esses resíduos são denominados fluoróforos naturais e sua fluorescência é altamente específica e sensível ao ambiente em que se encontram. Sendo assim, a fluorescência de uma proteína quando devidamente enovelada é resultante da fluorescência de seus resíduos individuais dependendo da vizinhança de cada um deles. Esse fato aliado à facilidade de realizar medidas com amostras pouco concentradas (na ordem de 10^{-6} M para proteínas), torna a fluorescência uma técnica bastante sensível e eficaz para monitorar mudanças conformacionais e interações com ligantes (LACKOWICZ, 1992). Como resultado dessas análises, foi observado que o espectro de emissão da curcina é característico de resíduos de triptofano, tirosina e fenilalanina que se encontram nas porções mais internas da molécula, protegidos do solvente. Resultados semelhantes foram observados na curcina por Lin *et al.*, 2010.

A Figura 10 mostra a característica de espectroscopia de fluorescência endógena de curcina. As amostras foram excitadas a 295 nm e a emissão monitorada entre 300 e 450 nm; a curva mostra o espectro de emissão no comprimento de onda de emissão a 335 nm. Resultados semelhantes foram encontrados por Lin e colaboradores (2010), com amostras de curcina e por Barroso, (2016) com amostras de podagrina.

Figura 10. Espectros de emissão de fluorescência da curcina obtida de sementes e das frações proteicas das tortas de pinhão-manso (FTP) armazenadas por 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias.



Alíquotas da proteína ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão PBS pH7,2 foram excitadas em 295 nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 300 a 450 nm, usando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Fonte: Autor (2018).

Os dados de dicroísmo circular e fluorescência corroboram e demonstram que a curcina manteve a conformação estrutural estável ao longo do período de armazenamento, faltando avaliar sua atividade biológica

5.7 Atividade RNA N-glicosidase *in vitro*

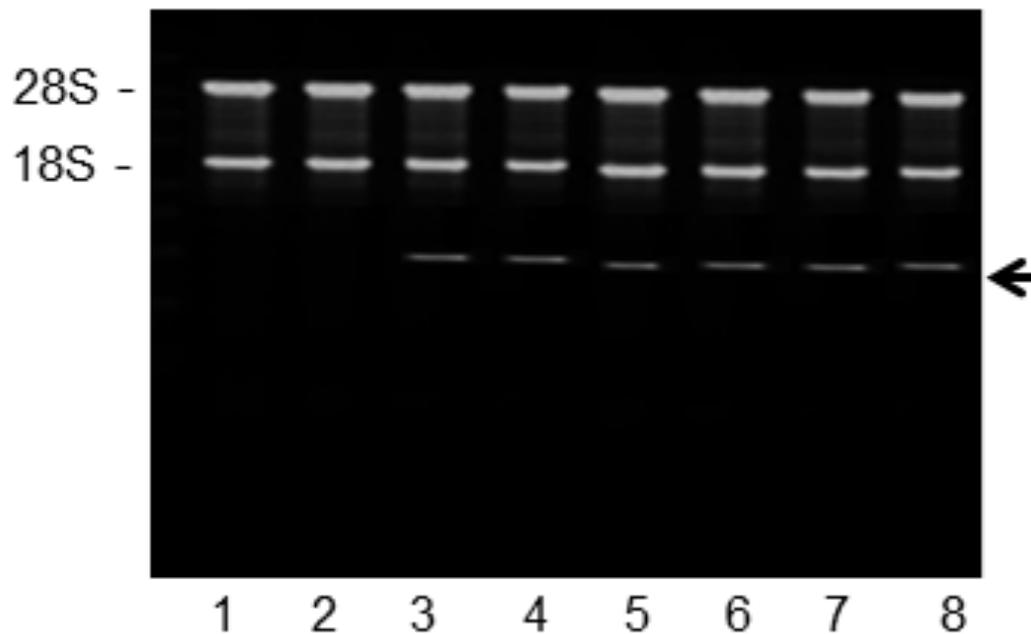
A avaliação da atividade rRNA-N-glicosidase da curcina foi realizada conforme a metodologia descrita por Smith *et al.*, (2003). Como resultado, a curcina foi capaz de depurar ribossomos nos diferentes tempos de armazenamento (Figura 11), pois o gel de agarose apresentou uma banda similar ao fragmento de Endo (≈ 370 nucleotídeos) liberado da subunidade 28S do rRNA de levedura e

detectado após o tratamento com anilina (ENDO *et al.*, 1987; STIRPE *et al.*, 1988; SMITH *et al.*, 2003).

Na avaliação da atividade RNA *N*-glicosidase *in vitro*, a curcina foi incubada com ribossomos isolados de levedura. Em seguida o RNA ribossomal (rRNA) foi extraído e tratado com anilina. Como resultado, 20 µg da curcina foi capaz de depurar o rRNA (Figura 11). Estudos já realizados mostram que a cadeia catalítica das RIPs é capaz de depurar a subunidade maior do RNA ribossômico, libera um pequeno fragmento de nucleotídeos da porção 3' do rRNA (ENDO *et al.*, 1987; VAN DAMME *et al.*, 2001).

Esta metodologia, é considerada como teste de confirmatório no diagnóstico da atividade enzimática das RIPs e pode facilmente ser observado através de eletroforese em gel de agarose/formamida (SMITH *et al.*, 2003). Na Figura 11, o rRNA tratado com a curcina extraída de torta de pinhão-manso armazenado por longos períodos apresentou uma banda similar ao fragmento de Endo liberado da subunidade 28S do rRNA de levedura e detectado após o tratamento com anilina. Este fragmento não foi detectado nas amostras controle (contendo apenas o rRNA e o rRNA tratado somente com a anilina). Esse resultado confirma que a curcina dos diferentes FTP se apresenta com sua estrutura conformacional inalterada, inclusive com sua atividade rRNA-*N*-glicosidase preservada.

Figura 11. Análise da atividade RNA *N*-glicosidase *in vitro* da curcina de sementes e das curcinas isoladas das tortas de sementes obtidas em diferentes dias de armazenamento.



Colunas: 1) RNA ribossomal não tratado com curcina e anilina (controle 1); RNA ribossomal tratado apenas com anilina (controle 2); 3 a 8) RNA tratados com as curcinas das tortas obtidas com 15 (linha 3), 30 (linha 4), 45 (linha 5), 60 (linha 6), 75 (linha 7) e 90 (linha 8) dias de armazenamento. A seta indica o fragmento de Endo liberado e detectado após o tratamento com anilina.
 Fonte: Autor (2018).

Diferentes estudos apontam que as RIPs promovem a depurinação da subunidade maior do RNA ribossômico, liberando um pequeno fragmento de 130-400 nucleotídeos da porção 3' do rRNA (ENDO *et al.*, 1987). Este fragmento é conhecido como fragmento de Endo, sendo considerado um diagnóstico da atividade enzimática das RIPs e pode facilmente ser observado através de eletroforese em gel de agarose/formamida.

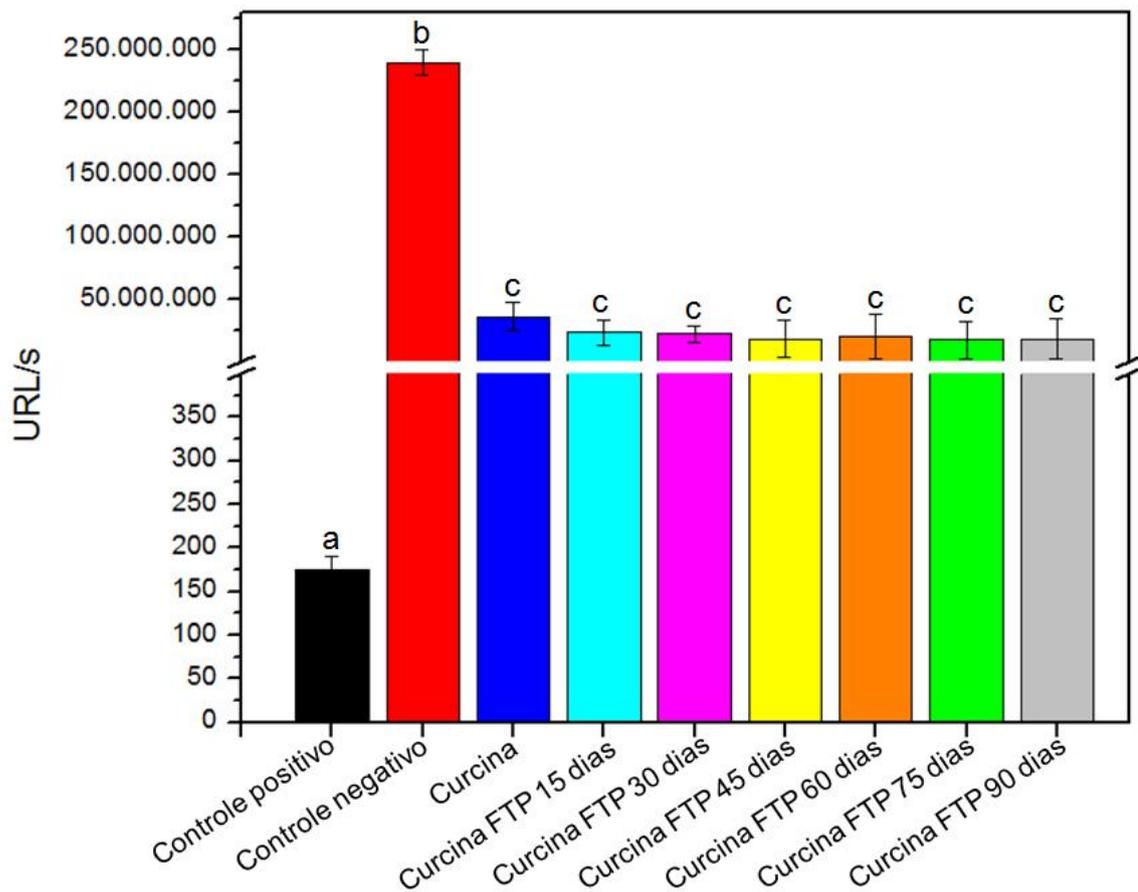
Apesar de ser utilizado como método de avaliação de atividade de RIP, vários pesquisadores não utilizam essa metodologia para confirmar a eficácia do processo de desintoxicação da torta de pinhão-manso. Saetae e Suntornsuk, (2011) utilizaram como amostra de análise torta de *J. curcas* após processo detoxificação. Nesse estudo, os autores verificaram a presença de fatores tóxicos e anti-nutricionais da torta; utilizando como metodologias de determinação a avaliação de ésteres de forbol, ácido fítico, inibidor de tripsina, atividade lectínica e saponina. Entretanto, os autores acima não realizaram avaliação RNA-*N*-glicosidase.

5.8 Inibição da síntese proteica em sistemas livre de células

A capacidade da curcina extraída de torta de pinhão-manso armazenado por longos períodos de inibir a síntese proteica *in vitro* foi avaliada utilizando sistema acoplado de transcrição-tradução da luciferase, livre de células, denominado *TNT Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega). A vantagem desse sistema é o acoplamento do processo de transcrição genica ao processo de síntese proteica sem que seja necessária a utilização de células. Se a proteína de interesse exercer atividade inibitória da síntese proteica, esta ação será detectada pela redução na intensidade de luz gerada pela luciferase. Conforme os resultados obtidos, a curcina apresentou inibição da síntese proteica da luciferase nos diferentes períodos de armazenamento (Figura 12). Pesquisas mostram que as RIPs apresentam uma variação na sua capacidade de inativar a síntese proteica *in vitro* e que está diferença engloba valores de concentração que vão da ordem de picomol (no caso das RIPs tipo 1) à nanomol (no caso das RIPs tipo 2) (BATTELLI, 2004).

Os resultados da curcina foram comparados com os do controle positivo (ricina), no qual foi observado diferença significativa entre a curcina e a ricina em todos os tempos de armazenamento. Porém não foi encontrado diferença significativa entre diferentes amostras de curcina nos diferentes tempos de armazenamento. Essa diferença entre a atividade biológica entre a Curcina e a Ricina era esperado, visto que é de conhecimento que RIPs do tipo 2 apresenta toxicidade maior quando comparado com RIPs do tipo 1. Diferença estatística também foi observado entre a curcina nos diferentes tempos de armazenamento e o controle negativo (tampão PBS).

Figura 12. Ensaio da inibição da síntese proteica promovida pela curcina obtida de sementes e das FTPs em sistema livre de células (TNT® *Coupled Reticulocyte Lysate System*).



Como controle positivo da reação de inibição, foi utilizada a ricina comercial. Como controle negativo, apenas o tampão PBS foi adicionada a reação. As demais colunas tratam-se da curcuma isolada a partir de sementes quiescentes e as demais colunas, curcuma obtida a partir de tortas de sementes de pinhão-manso armazenadas por diferentes períodos (15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias). Os resultados foram expressos em unidades relativas de luz por segundo (URL/s). Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores representados como média de três medições
Fonte: Autor (2018).

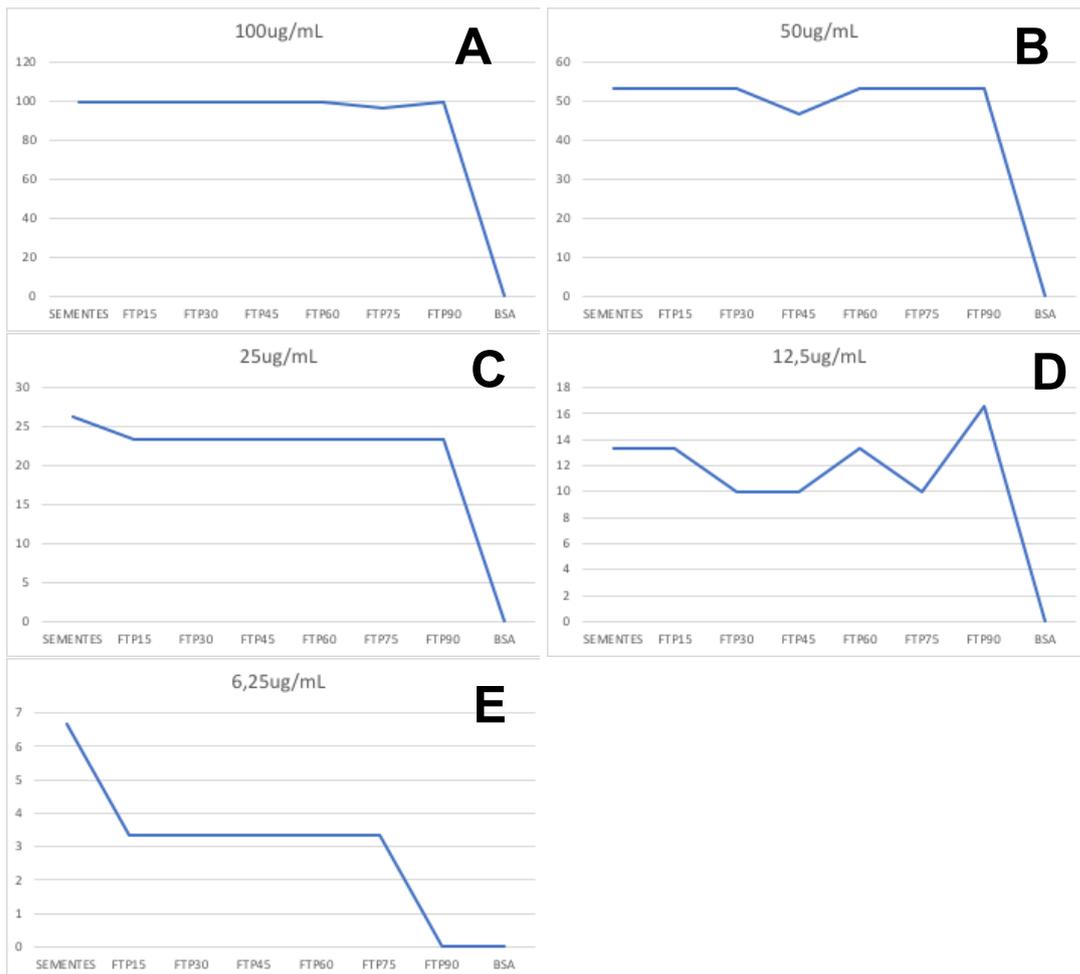
5.9 Bioensaio com *Artemia salina* para avaliar a toxicidade das frações de curcuma purificada das FTPs

O teste de letalidade de *Artemia* tem sido utilizado com sucesso para determinar a toxicidade de moléculas biológicas que possuem uma variedade de atividades farmacológicas, incluindo agentes anticancerígenos, antivirais, inseticidas, pesticidas e anti-HIV (CARBALLO *et al.*, 2002; PERVIN *et al.*, 2006; HO *et al.*, 2007).

A fim de se avaliar a toxicidade de curcuma purificada de sementes e das tortas armazenadas em diferentes períodos, pode-se constatar que ao longo do

armazenamento da torta de pinhão-manso a curcina extraída apresentou elevado índice de toxicidade sobre náuplios de *Artemia salina* permanecendo praticamente inalterado ao longo do armazenamento em diferentes concentrações (Figura 13).

Figura 13. Toxicidade da curcina isolada das sementes e das frações proteicas (FTPs) das tortas armazenadas por 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias sobre cistos de *Artemia salina*.



Toxicidade da curcina isolada das sementes e das frações proteica da torta obtida com 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de armazenamento utilizando diferentes concentrações de curcina 100 µg/mL (A), 50 µg/mL(B), 25 µg/mL(C), 12,5 µg/mL (D) e 6,25 µg/mL (E)

Fonte: Autor (2018).

Ensaio de toxicidade com *Artemia* sp. se apresenta como um bom modelo para avaliação utilizando diferentes substâncias, como efluentes industriais (PIMENTEL *et*

al., 2009), podendo utilizar também de amostras biológicas. Dos quais, podemos destacar extratos de *Euphorbia conspicua* (Euphorbiaceae) (SANTOS *et al.*, 2007), extratos de nim utilizados na medicina, cosmética e agricultura (BEVILACQUA *et al.*, 2008), agentes terapêuticos (NUNES *et al.*, 2009), lectinas de Leguminosae (SANTOS *et al.*, 2010).

Jaramillo-Quintero e colaboradores, (2015), avaliando o efeito citotóxico de curcina sobre linhagens de células de câncer de mama (SK-BR-3 e MDA-MB-231) obtiveram IC₅₀ de 15,5 e 18,6 µg.mg⁻¹ respectivamente e 353,4 µg.mg⁻¹ para fibroblastos. Resultado importante para a utilização das biomoléculas como ferramenta terapêutica anticâncer.

O efeito tóxico da curcina tem sido atribuído à sua atividade da *N*-glicosidase e à inibição da síntese proteica (LIN *et al.*, 2003c). Entretanto, em 2012, Zhao e colaboradores sugeriram que a apoptose em células de sarcoma em ratos poderia ser a causa da morte celular. Já em 2014, os pesquisadores Mohamed e colaboradores relataram que a curcina desencadeou diversas alterações bioquímicas e morfológicas, como disfunção mitocondrial, degeneração nuclear e supressão do mecanismo de defesa, com evidentes alterações semelhantes à autofagia e à apoptose. A capacidade da curcina matar células por apoptose, especialmente células cancerígenas, oferece a oportunidade de usar este RIP como um potencial agente terapêutico, como um imunocjugado para o tratamento de vários tipos de câncer (JARAMILLO-QUINTERO, 2015).

5.10 Atividade anti-helmíntica

A avaliação da atividade anti-helmíntica foi realizada utilizando adultos (machos e fêmeas) da espécie *Ascaridia galli*, utilizando como controle positivo Piperazina e água como controle negativo. Comparando a FTP_{90 dias} com o grupo controle, não foi observado diferença significativa entre os dados de mortalidade a partir de 48 horas de tratamento (Tabela 12). Jummai e Okoli, (2014) utilizando como modelo experimental minhocas (*P. posthuma*) utilizando curcina na concentração de 15mg.mL⁻¹ após 13 minutos de tratamento foi observado paralisia das mesmas e 34 minutos de tratamento foi observado morte das mesmas. A taxa de mortalidade de

100% após 24 horas de tratamento foi observada apenas no grupo tratado com curcina na concentração de 1600mg.mL⁻¹.

Tabela 12. Percentual médio de mortalidade *in vitro* da *Ascaridia galli* ao longo de 72 horas de tratamento com a curcina da torta de sementes armazenadas por 90 dias

Amostras	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Tempo (h) / Taxa de mortalidade (%)				
		6	12	24	48	72
Água	-	0	0	0	0	0
Piperazina	5	0	12,2 ^{a*}	25,0 ^a	50,0 ^a	100 ^a
¹ Curcina FTP _{90 dias}	1	0	0	0,32 ^d	3,33 ^d	3,33 ^e
	2	0	0	3,33 ^d	13,3 ^c	16,7 ^d
	3	0	3,33 ^c	6,67 ^c	16,7 ^c	40,0 ^c
	4	0	6,67 ^b	16,7 ^b	40,0 ^b	76,6 ^b
	5	0	6,67 ^b	16,7 ^b	40,0 ^a	100 ^a

¹Curcina isolada da fração proteica da torta de sementes armazenada por 90 dias

*Médias com letras iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Student (P>0,05).

Fonte: Autor (2018).

Ascaridia galli é um helminto gastrointestinal comum que afeta animais selvagens e domésticos com incidência cosmopolita. O processo infeccioso ocasiona perda de peso e perdas na produção pecuária (DAS *et al.*, 2010).

Um anti-helmíntico eficaz é necessário para combater o grave problema da infecção por helmintos na criação animal. Na escolha do mesmo, deve-se avaliar: a seleção do tratamento, a eficácia, a toxicidade, a resistência a drogas e os resíduos do medicamento deixado na alimentação humana. Os anti-helmínticos baseados em produtos químicos foram e são muito utilizados no homem e nos animais. Uma alternativa, a isso, se faz pela utilização de extratos de plantas, para substituir os anti-helmínticos atualmente utilizados no mercado (GALVANI e BARRENECHE, 1994). Medicamentos alternativos ou novas drogas, estão sendo pensados atualmente como uma forma segura de superar a resistência aos medicamentos e o risco grave de resíduos de drogas veterinárias em alimentos para humanos (ABDELQADER *et al.*, 2012). Ensaio sobre o extrato de plantas como anti-helmínticos foram conduzidos com o gengibre (*Zingiber officinale*) para combater *Angiostrongylus cantonensis* (LIN *et al.*, 2010b) e curcumina contra *Ascaridia galli* (BAZH e EL-BAHY, 2013).

Ríos-de Álvarez e colaboradores, (2012) utilizando lectinas no tratamento de verminose (*T. colubriformis* e *T. circumcincta*) em pequenos ruminantes observaram um aumento na indução de células de defesa para parasitas (eosinófilos), tanto no abomaso, como no intestino nos animais tratados com lectinas por via oral, a utilização de lectina PHA no tratamento de verminose indicou uma diminuição não expressiva quando comparada com o controle.

Em estudo utilizando extratos de sementes de abóbora e de casca de romã contra *Ascaridia galli* feito Aziz e colaboradores, (2018) os autores obtiveram taxa de mortalidade *in vitro* variando de 65,8% - 85% após 36 horas de tratamento para extratos de sementes de abóboras e de 54,2% - 73,3% de mortalidade após 36 horas de tratamento com extratos de casca de romã. Os resultados obtidos apresentaram menor eficácia do que este trabalho, embora os autores do artigo acima mencionados tenham utilizado concentrações maiores de extrato variando de 25mg.mL⁻¹ a 75 mg.mL⁻¹.

Os resultados do estudo podem transpor a metodologia utilizada e serem ampliadas para outros modelos de experimentação além do realizado, Cenin e colaboradores, (1988) demonstraram em seus estudos a ação de 12 RIP tipo 1 sobre ribossomos de *Trypanossoma* e *Leishmania*, inclusive utilizando a Gelonina, uma RIP tipo 1 extraído da semente de Euphorbiaceae.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos concluímos que a curcina é um RNA-N-glicosidase estável, pois consegue manter sua integridade físico-química, o padrão conformacional de sua estrutura secundária e as suas atividades biológicas (*in vivo* e *in vitro*) mesmo quando sua fonte de obtenção, no caso a torta de sementes armazenada por até 90 dias, difere da sua fonte original e, portanto, não oferece condições adequadas para a manutenção dessas características.

Tal fato abre novas perspectivas para a utilização da torta residual de *J. curcas*, não somente como coproduto da agroindústria, mas também, como matéria prima para prospecção de proteínas bioativas com potenciais aplicações biotecnológicas, como é o caso da curcina.

REFERÊNCIAS

- ABDELQADER, A.; QARALLAH, B.; AL-RAMMAMNEH, D.; DAS, G. Anthelmintic effects of citrus peels ethanolic extracts against *Ascaridia galli*. **Vet. Parasitol.**, v. 188, n. 1, p. 78-84, 2012.
- ABHILASH, P.; SRIVASTAVA, P.; JAMIL, S.; SINGH, N. Revisited *Jatropha curcas* na oil plant ou multiple benefits: critical research needs and prospects for the future. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 18, n. 1, p. 127-131, 2011.
- ACHTEN, W.; VERCHOT, L.; FRANKEN, Y.J.; MATHJIS, E.; SINGH, V.P.; AERRTS, R.; MUYS, B. *Jatropha* bio-diesel production and use. **Biomass Bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1063-1084, 2008.
- ADERIBIGBE, A.O.; JOHNSON, C.O.L.E.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K.; FOIDL, N. Chemical composition and effect of heat on organic matter- and nitrogen-degradability and some antinutritional components of *Jatropha* meal. **Animal Feed Science Technology**, v. 67, n. 2, p. 223-243, 1997.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE PINHÃO-MANSO. **Pinhão-manso: cenário e área plantada**. [S. l.]: ABPPM, 2018. Disponível em: <https://www.biodieselbr.com/revista/010/pinhao-manso-espera-2.htm>. Acesso em: 20 jun. 2018.
- BOULAILA, M.R.; AZIZ, M.; OMAR, M.A.; SULTAN, K. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of pumpkin seeds and pomegranate peels extracts against *Ascaridia galli*. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 231-234, 2018.
- BAILLIS, R.; MCCARTHY, H. Carbon impacts of direct land use change in semiarid woodland converted to biofuel plantations in India and Brazil. **GCB Bioenergy**, v. 3, n. 6, p. 449-460, 2011.
- BALDINI, M.; FERFUIA, C.; BORTOLOMEAZZI, R.; VERARDO, G.; PASCALI, J.; PIASENTIER, E.; FRANCESCHI, L. Determination of phorbol esters in seeds and leaves of *Jatropha curcas* and in animal tissue by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Ind. Crops Prod.**, v. 59, p. 268-276, 2014.
- BALLINGER, M.J.; PERLMAN, S.J. Generality of toxins in defensive symbiosis: Ribosome-inactivating proteins and defense against parasitic wasps in *Drosophila*. **PLoS Pathog.**, v. 13, n. 7, p. 1-19, 2017.
- BARBIERI, L.; BATELLI M.G.; STRIPE F. Ribosome inactivating protein from plants. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1154, n. 3, p. 237-282, 1993.
- BARBIERI, L.; GORINI, P.; VALBONESI, P.; CASTIGLIONI, P.; STIRPE, F. Unexpected activity of saporins. **Nature**, v. 372, n. 624. p. 319, 1996.

BARBIERI, L.; VALBONESI, P.; BONORA, E.; GORINI, P.; BOLOGNESI, A.; STIRPE, F. Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). **Biochem. J.**, v. 319, n. 2, p. 507–513. 1996.

BARBIERI, L.; VALBONESI, P.; BONDIOLI, M.; LUGO ALVAREZ, M.; DAL MONTE, P.; LANDINI, M.P.; STIRPE, F. Adenine glycosylase activity in mammalian tissues: an equivalent of ribosome-inactivating proteins. **FEBS Lett.**, v. 505, n. 1, p. 196–197, 2001.

BARBIERI, L.; BRIGOTTI, M.; PEROCCO, P.; CARNICELLI, D.; CIANI, M.; MERCATALI, L.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins depurinate poly(ADP-ribose)-polymerase and have transforming activity for 3T3 fibroblasts. **FEBS Lett.**, v. 538, n. 1, p. 178–182, 2003.

BARBIERI, L.; POLITO, L.; BOLOGNESI, A.; CIANI, M.; PELOSI, E.; FARINI, V.; JHA, A.; SHARMA, N.; VIVANCO, J.M.; CHAMBERY, A.; PARENTE, A.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins in edible plants and purification and characterization of a new ribosome-inactivating protein from *Cucurbita moschata*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1760, n. 5, p. 783–792, 2006.

BARBIER, J.; GILLET, D. Ribosome Inactivating Proteins: From Plant Defense to Treatments against Human Misuse or Diseases. **Toxicons**, v. 10, n. 4, p. 1-6, 2018.

BARROSO, W.S. **Bioprospecção de proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) em plantas do semi-árido cearense**. 2016. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

BASCH, E.; GABARDI, S.; ULBRICHT, C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, v. 60, n. 4, p. 356–359. 2003.

BASS, H. W.; OBRIAN, G.R.; ROBERTS, J.K.; BOSTON, R.S. A maize ribosome-inactivating protein is controlled by the transcriptional activator Opaque-2. **Plant. Cell.**, v. 4, n. 2, p. 225-234, 1992.

BATTELLI M.G.; POLITO L.; BOLOGNESI A.; LAFLEUR L.; FRADET Y.; STIRPE F. Toxicity of ribosome-inactivating proteins containing immunotoxins to a human bladder carcinoma cell line. **Int. J. Cancer**. v. 65, n. 4, p. 485–490, 1996.

BATTELLI, M.G. Cytotoxicity and toxicity to animals and humans of ribosome-inactivating proteins. Mini-Rev. **Med. Chem.**, v. 4, n. 5, p. 513-521, 2004.

BAYER, H.; EY, N.; WATTENBERG, A.; VOSS, C.; BERGER, M.R. Purification and characterization of rioximin from *Ximenia americana* fruit kernels. **Protein Expr. Purif.**, v. 82, n. 1, p. 97-105, 2012.

- BEAUMELLE, B.; ALAMI, M.; HOPKINS, C.R. ATP-dependent translocation of ricin across the membrane of purified endosomes. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 31, p. 23661- 23669, 1993.
- BECKER, K.; MAKKAR, H. *Jatropha curcas*: a potential source for tomorrow's oil and biodiesel. **Lipid Technol.** v. 20, n. 5, p. 104-107, 2008.
- BELEWU, M.A.; MUHAMMED, N.O.; AJAYI, F.T.; ABDULGAFAR, D.T. Performance characteristics of goat fed Trichoderma treated feather meal-rice husk mixture. **Anim. Nutr. Feed Technology**, v. 9, p. 203-208, 2009.
- BERGMANN, L.; AAMDAL, S.; MARREAUD, S.; LACOMBE, D.; HEROLD, M.; YAMAGUCHI, T.; WILHELM-OGUNBIYI, K.; LENTZEN, H.; ZWIERZINA, H. Phase I trial of r viscum (INN: aviscumine) given subcutaneously in patients with advanced cancer: a study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC protocol number 13001). **Eur. J. Cancer**, v. 44, n. 12, p. 1657-1662, 2008.
- BEVILACQUA, A.H.V.; SUFFREDINI, I.B.; BERNARDI, M.M. Neem *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) toxicity in *Artemia* sp: comparison of a commercial preparation and the pure oil. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde**, v. 26, n. 2, p. 157-160, 2008.
- BOLOGNESI A.; POLITO L.; LUBELLI C.; BARBIERI L.; PARENTE A.; STIRPE F. Ribosome-inactivating and Adenine Polynucleotide Glycosylase Activities in *Mirabilis jalapa* L. tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 16, p. 13709–13716, 2002.
- BOLOGNESI, A.; BORTOLOTTI, M.; MAIELLO, S.; BATTELLI, M.G.; POLITO, L. Ribosome-inactivating proteins from plants: a historical overview. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 1-19, 2016.
- BOTTGER, S.; WESTHOF, E.; SIEMS, K.; MELZIG, M.F. Structure–activity relationships of saponins enhancing the cytotoxicity of ribosome-inactivating proteins type I (RIP-I). **Toxicol.** v. 73, p. 144-150, 2013.
- BOURINBAIAR, A.S.; LEE-HUANG, S. The activity of plant-derived antirretroviral proteins MAP30 and GAP31 against herpes simplex virus in vitro. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 219, n. 3, p. 923–929, 1996.
- BOURNE, Y.; ABERGEL, C.; CAMBILLAU, C.; FREY, M.; ROUGÉ, P.; FONTECILLA-CAMPUS, J.C. X-ray crystal structure determination and refinement at 1.9 Å resolution of isolectin I from the seeds of *Lathyrus ochrus*. **J. Mol. Biol.**, v. 214, n. 2, p. 571-584, 1990.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRIGOTTI, M.; RAMBELLI, F.; ZAMBONI, M.; MONTANARO, L.; SPERTI, S. Effect of alpha-sarcin and ribosome-inactivating proteins on the interaction of elongation factors with ribosomes. **Biochem J.**, v. 257, n. 3, p. 723-727, 1989.

- BRIGOTTI M.; ALFIERI R.; SESTILI P.; BONELLI M.; PETRONINI P.G.; GUIDARELLI A.; BARBIERI L.; STIRPE F.; SPERTI S. Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. **FASEB J.**, v. 16, n. 3, p. 365–372, 2002.
- CARBALLO, J.L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z.L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M.D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnol.**, v. 2, p. 17–21, 2002.
- CASTELLION, M.; MATIACEVICH, S.; BUERA, P.; MALDONADO, S. Protein deterioration and longevity of quinoa seeds during long term storage. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 952-958, 2010.
- CAVALLARO, U.; NYKJAER, A.; NIELSEN, M.; SORIA, M.R. Alpha 2-macroglobulin receptor mediates binding and cytotoxicity of plant ribosome-inactivating proteins. **Eur. J. Biochem.**, v. 232, n. 1 p. 165-171, 1995.
- CENINI, P.; BOLOGNESI, A.; STIRPE, F. Ribosome-Inactivating Proteins from Plants Inhibit Ribosome Activity of Trypanosoma and Leishmania. **J. Protozool.**, v. 35, n. 3, p. 384-387, 1988
- CHAN, S.H.; SHAW, P.C.; MULOT, S.F.; XU, L.H.; CHAN, W.L.; TAM, S.C.; WONG, K.B. Engineering of a mini-trichosanthin that has lower antigenicity by deleting its C-terminal amino acid residues. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 270, n. 1, p. 279–285, 2000.
- CHANG, F.C.; KO, C.H.; TSAI, M.J.; WANG, Y.N.; CHUNG, C.Y. **Ecotoxicology**. v. 23, p. 1969–1978, 2014.
- CHEN Z.C.; WHITE R.F.; ANTONIW J.F.; LIN Q. Effect of pokeweed antiviral protein (PAP) on the infection of plant viruses. **Plant Pathology**, v. 40, n. 4, p. 612-620, 1991.
- CHEN Y.; PEUMANS W.J.; VANDAMME E.J. The *Sambucus nigra* type-2 ribosome-inactivating protein SNAI' exhibits in planta antiviral activity in transgenic tobacco. **FEBS Lett.** v. 516, n. 3, p. 27–30, 2002.
- DAS, G.; KAUFMANN, F.; ABEL, H.; GAULY, M. Effect of extra dietary lysine in *Ascaridia galli* infected grower layers. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3, p. 238-243, 2010.
- DeLANO, W. **The Pymol Molecular Graphics System**; DeLano Scientific: San Carlos, CA, USA, 2002.
- DEVAPPA, R.K.; MAKKAR, H.P.; BECKER, K. *Jatropha* toxicity – a review. **J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.**, v. 13, n. 6, p. 476-507, 2010.
- DONAYRE TORRES, A.J.; ESQUIVEL SOTO, E.; GUTIERREZ XICOTENCATL, M.D.; ESQUIVEL GUADARRAMA, F.R.; GOMEZ LIM, M.A. Production and

purification of immunologically active core protein p24 from HIV-1 fused to ricin toxin B subunit in *E. coli*. **Viol. J.**, v. 6, n. 1, p. 13-17, 2009.

DURAES, F.O.M.; LAVIOLA, B.G.A.; ALVES, A.A. Potential and challenges in making physic nut (*Jatropha curcas* L.) a viable biofuel crop: the Brazilian perspective. **Plants Sciences Reviews**. v. 6, n. 43, p. 1-8, 2011.

EDRISI, S.A.; DUBEY, R.K.; TRIPATHI, V.; BAKSHI, M.; SRIVASTAVA, P.; JAMIL, S.; SINGH, N.; ABHILASH, P. *Jatropha curcas* L.: a crucified plant waiting for resurgence. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 855-862, 2015.

ENDO, Y.; MITSUI, K.; MOTIZUKI, K.; TSURUGI, K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 12, p. 5908–5912. 1987.

ENDO, Y.; GLUCK, A.; WOOL, I. G. Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. **J. Mol. Biol.**, v. 221, n. 1, p. 193-207, 1991.

FABBRINI, M.S.; KATAYAMA, M.; NAKASE, I.; VAGO, R. Plant Ribosome-Inactivating Proteins: Progresses, Challenges and Biotechnological Applications (and a few digressions). **Toxins (Basel)**, v. 9, n. 10, p. 1-33, 2017.

FERRARI, R.A.; CASARINI, M.B.; MARQUES, D.A.; SIQUEIRA, W.J. Avaliação da composição química e de constituinte tóxico em acessos de pinhão-mansão de diferentes origens. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 4, p. 309-314, 2010.

FERRERAS J.M.; BARBIERI L.; GIRBÉS T.; BATTELLI M.G.; ROJO M.A.; ARIAS F.J.; ROCHER M.A.; SORIANO F.; MENDÉZ E.; STIRPE F. Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis*, L. (Caryophyllaceae). **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1216, n. 1, p. 31–42, 1993.

FERRERAS J.M.; CITORES L.; BENITO F.M.D.; ARIAS F.J.; ROJO M.A.; MUNOZ R.; IGLESIAS R.; GIRBES T., Ribosome inactivating proteins and lectins from *Sambucus*. **Curr. Topics Phytochem.**, v. 3, p. 113–128, 2000.

FRENCH R.R.; BELL A.J.; HAMBLIN T.J.; TUTT A.L.; GLENNIE M.J. Response of B-cell lymphoma to a combination of bispecific antibodies and Saporin. **Leuk. Res.** v. 20, n. 7, p. 607–617, 1996.

FODSTAD, O.; KVALHEIM, G.; GODAL, A.; LOTSBERG, J.; AAMDAL, S.; HOST, H.; PIHL, A. Phase I study of the plant protein ricin. **Cancer Res.**, v. 44, n. 2, p. 862-865, 1984.

GALVANI, F.R.; BARRENECHE, M. Levantamento das espécies vegetais utilizadas em medicina popular no município de Uruguaiana (RS). **Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro.**, v. 1, n. 1, p. 77-89, 1994.

GIRBE´S, T.; BARBIERI, L.; FERRERAS, J.M.; ARIAS, F.J.; ROJO, M.A.; IGLESIAS, R.; ALEGRE, C.; ESCARMIS, C.; STIRPE, F. Effects of ribosome-inactivating proteins on *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens* translation systems. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 20, p. 6721–6724, 1993.

GILABERT-ORIOLO, R.; WENG, A.; MALLICKRODT, B.; MELZIG, M.F.; FUCHS, H.; THAKUR, M. Immunotoxins constructed with ribosome-inactivating proteins and their enhancers: a lethal cocktail with tumor specific efficacy. **Curr. Pharm. Des.**, v. 20, n. 42, p. 6584-6643, 2014.

GOEL, G.; MAKKAR, H.P.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **Int. J. Toxicol.**, v. 26, n. 4, p. 279-288, 2007.

GOMES, T.G., HADI, S.I.I., COSTA ALVES, G.S., MENDONÇA, S., SIQUEIRA, F.G., MILLER, R.N.G. Current Strategies for detoxication of *Jatropha curcas* seed cake: A review. **J. Agric. Food Chem.**, v. 66, n. 11, p. 2510-2522, 2018.

HARTLEY, M.R.; CHADDOCK, J.A.; BONNESS, M.S. The structure and function of Ribosome inactivating proteins. **Trends in plant science**. v. 1, n. 8, p.252-260, 1996.

HARTLEY, M.R.; LORD, J.M. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1701, n. 1, p. 1-14, 2004.

HOTT J.S.; DALAKAS M.C.; SUNG C.; HALLETT M.; YOULE R.J. Skeletal muscle-specific immunotoxin for the treatment of focal muscle spasm. **Neurology**, v. 50, n. 2, p. 485–491, 1998.

HUANG, M.X.; HOU, P.; WEI, Q.; XU, Y.; CHEN, F. A ribosome-inactivating protein (curcin 2) induced from *Jatropha curcas* can reduce viral and fungal infection in transgenic tobacco. **Plant Growth Regul.**, v. 54, n. 2, p. 115–123, 2008.

IGLESIAS, R.; ARIAS, F.J.; ROJO, M.A.; ESCARMIS, C.; FERRERAS, J.M.; GIRBE´S, T. Molecular action of the type 1 ribosome-inactivating protein saporin 5 on *Vicia sativa* ribosomes. **FEBS Lett.**, v. 325, n. 3, p. 291–294, 1993.

GIRBES, T.; FERRERAS, J.M.; ARIAS, F.J.; STIRPE, F. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 4, n. 2, p. 461-476, 2004.

ISHIZAKI, T.; MEGUMI, C.; KOMAI, F.; MASUDA, K.; OOSAWA, K. Accumulation of a 31-kDa glycoprotein in association with the expression of embryogenic potential by spinach callus in culture. **Physiol. Plant.**, v. 114, n. 1, p. 109–115, 2002.

JABER, K.; HAUBRUGE, E.; FRANCIS, F. Development of entomotoxic molecules as control agents: illustration of some protein potential uses and limits of lectins (Review). **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.**, v. 14, n. 1, p. 225-241, 2010.

JAMIL, S.; ABHILASH, P.C.; SINGH, N.; SHARMA, P.N. *Jatropha curcas*: A potential crop for phytoremediation of coal fly ash. **J. Hazard Mater.**, v. 172, n. 1, p. 269–275, 2009.

JARAMILLO-QUINTERO, L.P.; OCA, A.C.M.; ROJAS, A.R.; ROJAS-HERNÁNDEZ, S.; CAMPOS-RODRÍGUEZ, R.; MARTÍNEZ-AYALA, A.L. Cytotoxic effect of the immunotoxin constructed of the ribosome-inactivating protein curcin and the monoclonal antibody against Her2 receptor on tumor cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 79, n. 6, p. 896-906, 2015.

JONGSCHAAP, R.E.E.; CORRÉ, W.J.; BINDRABAN, P.S.; BRANDENBURG, W.A. **Claims and facts on *Jatropha curcas* L.: global *Jatropha curcas* evaluation. Breeding and propagation programme.** 1 ed. Netherland, Plant Research International B.V. 2007.

JUMMAI, A.T.; OKOLI, B.J. Curcin from *Jatropha curcas* seed as a potential anthelmintic. *Advancement in Medicinal Plant Research*, v. 2, n. 3, p. 47-49, 2015.

KELLY, S.M.; PRICE, N.C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1338, n. 2, p. 161-185, 1997.

KNIGHT B. Ricin – a potent homicidal poison. **Br. Med. J.**, v. 1, n. 6159, p. 350–351, 1979.

KOH, M.Y.; GHAZI, T.I.M. A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil. **Renewable Sustainable Energy Rev.** v. 15, n. 5, p. 2240-2251, 2011.

KOZLOWSKI A.; HARRIS J.M. Improvements in protein PEGylation: pegylated interferons for treatment of hepatitis C. **J. Control. Release.** v. 72, n. 1, p. 217–224, 2001.

KUMAR M.A.; TIMM D.E.; NEET K.E.; OWEN W.G.; PEUMANS W.J.; RAO A.G. Characterization of the lectin from the bulbs of *Eranthis hyemalis* (winter aconite) as an inhibitor of protein synthesis. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 33, p. 25176–25183, 1993.

KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L): review. **Industrial Crops and Products**, v. 18, n. 1, p 1-10, 2008.

LACKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy.** 1 ed. New York: Springer, 1983.

LACKOWICZ, J.R. **Topics in fluorescence spectroscopy. Vol.1: Techniques.** 1 ed. New York: Springer, 1992.

LI, M.; CHEN, Y.; LIU, Z.; SHEN, F.; BIAN, X.; MENG, Y. Anti-tumor activity and immunological modification of ribosome-inactivating protein (RIP) from *Momordica*

charantia by covalent attachment of polyethylene glycol. **Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)**, v. 41, n. 9, p. 792–799, 2009.

LI, C.; ZENG, M.; CHI, H.; SHEN, J.; NG, T.B.; JIN, G.; LU, D.; FAN, X.; XIONG, B.; XIAO, Z.; SHA, O. Trichosanthin increases Granzyme B penetration into tumor cells by upregulation of CI-MPR on the cell surface. *Oncotarget.*, v. 8, n. 16, p. 26460–26470, 2017.

LIN, J.Y.; TSERNG, K.Y.; CHEN, C.C.; TUNG, T.C. Abrin and ricin: new anti-tumour substances. **Nature**, v. 227, n. 5255, p. 292–293, 1970.

LIN, J.Y.; LIU, K.; CHEN, C.C.; TUNG, T.C. Effect of crystalline ricin on the biosynthesis of protein, RNA, and DNA in experimental tumor cells. **Cancer Res.**, v. 31, n. 7, p. 921–924, 1971.

LIN, J.; LI, Y.X.; ZHOU, X.W.; TANG, K.X.; CHEN, F. Cloning and characterization of a curcin gene encoding a ribosome inactivating protein from *Jatropha curcas*. **DNA Seq.**, v. 14, n. 4, p. 311–317, 2003a.

LIN, J.; YAN, F.; TANG, L.; CHEN, F. Antitumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas*. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 24, n. 3, p. 241–246, 2003b.

LIN, J.; CHEN, Y.; XU, Y.; YAN, F.; TANG, L.; CHEN, F. Cloning and expression of curcin, ribosome-inactivating protein from the seeds of *Jatropha curcas*. **Acta Bol. Sin.** v. 45, n. 7, p. 858–863, 2003c.

LIN, J.; ZHOU, X.; WANG, J.; JIANG, P.; TANG, K. Purification and characterization of curcin, a toxic lectin from the seed of *Jatropha curcas*. **Prep. Biochem. Biotechnol.**, v. 40, n. 2, p. 107–118, 2010a.

LIN, R.J.; CHENC, C.Y.; CHUNGA, L.Y.; YEN, C.M. Larvicidal activities of ginger (*Zingiber officinale*) against *Angiostrongylus cantonensis*. **Acta Trop.** v. 115, n. 1, p. 69–76, 2010b.

LING, J.; LIU, W. Y.; WANG, T.P. Cleavage of supercoiled double-stranded DNA by several ribosome-inactivating proteins *in vitro*. **FEBS Lett.**, v. 345, n. 3, p. 143–146, 1994.

LING J.; LIU W.Y.; WANG T.P. Simultaneous existence of two types of ribosome-inactivating proteins in the seeds of *Cinnamomum camphora*: characterization of the enzymatic activities of these cytotoxic proteins. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1252, n. 1, p. 15–22, 1995.

LIU, R.S.; YANG, J.H.; LIU, W.Y. Isolation and enzymatic characterization of lamjapin, the first ribosome-inactivating protein from cryptogamic algal plant (*Laminaria japonica* A). **Eur. J. Biochem.**, v. 269, n. 19, p. 4764–5752, 2002.

LORD, J.M.; ROBERTS, L.M. Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. **J. Cell. Biol.**, v. 140, n. 4, p. 733–736, 1998.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K.; SPORER, F.; WINK, M. Studies on Nutritive Potential and Toxic Constituents of Different Provenances of *Jatropha curcas*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, n. 8, p. 3152-3157, 1997.

MAKKAR, H.P.S.; ADERIBIGBE, A.O.; BECKER, K. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factor. **Food Chemistry**, v. 62, n. 2, p. 207-215, 1998.

MAKKAR, H.P.; BECKER, K. *Jatropha curcas*, as promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. **Eur. J. Lip. Sci. Technol.**, v. 111, n. 8, p. 773-787, 2009.

MARCOS FILHO, J.; NOVEMBER, A.D.L. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de hortaliças. In: NASCIMENTO, W.M. **Tecnologia de sementes de hortaliças**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, p. 185-243, 2009.

MARRUGO-NEGRETE, J.; DURANGO-HERNÁNDEZ, J.; PINEDO-HERNÁNDEZ, J.; OLIVERO-VERBEL, J.; DÍEZ, S. Phytoremediation of mercury-contaminated soils by *Jatropha curcas*. **Chemosphere**, v. 127, p. 58–63, 2015.

MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B.G. Uso potencial e toxidez da torta de pinhão-manso. **Comunicado Técnico da Embrapa**. 1 ed. Brasília: EMBRAPA, 2009.

MOHAMED, M.S.; VEERANARAYANAN, S.; MINEGISHI, H.; SAKAMOTO, Y.; SHIMANE, Y.; NAGAOKA, Y.; AKI, A.; POULOSE, C.A.; ECHIGO, A.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; KUMAR, D.S. Cytological and subcellular response of cells exposed to the type-1 RIP curcin and the hemocompatibility analysis. **Sci. Rep.**, v. 4, n. 5747, p. 1-13, 2014.

MOHAMED, M.S.; VEERANARAYANAN, S.; POULOSE, A.C.; NAGAOKA, Y.; MINEGISHI, H.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; KUMAR, D.S. Type 1 ribotoxin-curcin conjugated biogenic gold nanoparticles for a multimodal therapeutic approach towards brain cancer. **Biochim Biophys. Acta**, v. 1840, n. 6, p. 1657–1669, 2014.

MONTES, J.M.; MLECHINGER, A.E. Domestication and breeding of *Jatropha curcas* L. **Trends Plant. Sci.** v. 21, n. 12, p. 1045-1057, 2016.

MORIMOTO H.; BONAVIDA B. Diphtheria toxin- and Pseudomonas A toxin-mediated apoptosis. ADP ribosylation of elongation factor-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with tumor necrosis factor-alpha. **J. Immunol.**, v. 149, n. 6, p. 2089–2094, 1992.

MOSINGER, M. Sur les reactions neuroendocriniennes et genitales dans l'intoxication par ricine. **Cont. Rend. Soc. Biol.**, v. 145, p. 412-415, 1951.

MOTA, D.M.; BOMFIM, L.R.; MADEIRA, S.V.; RAMOS, M.V. Proteínas Inativadoras de Ribossomos: um veneno vegetal com aplicações farmacológicas – características físico-químicas, estruturais e biológicas. **Revista RECCS.**, v. 11, p. 144-152, 1998.

MOTTO, M.; LUPOTTO, E. The genetics and properties of cereal ribosome-inactivating proteins. **Mini Rev. Med.Chem.**, v. 4, n. 5, p. 493-503, 2004.

MOURGUE, M.; DELPHAUT, J.; BARET, R.; KASSAB, R. Etude De La Toxicite Et Localisation De La Toxalbumine (Curcine) Des Graines De *Jatropha curcas* Linn. **Bull. Soc. Chim. Biol.**, v. 43, n. 4, p. 517-531, 1961.

MUNDY, J.; LEAH, R.; BOSTON, R.; ENDO, Y.; STIRPE, F. Genes encoding ribosome-inactivating proteins. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v. 12, n. 2, p. 60-62, 1994.

NARAYANANA, S.; SURENDRANATHB, K.; BORAB, N.; SUROLIA, A.; KARANDEB, A.A. Ribosome inactivating proteins and apoptosis. **FEBS Letters**, v. 579, n. 6, p. 1324–1331, 2005.

NETO, Hélio Arraes Crespo. Metodologia. *In*: NETO, Hélio Arraes Crespo. **Avaliação dos teores de ricina e de proteases durante o armazenamento de torta de mamona (*ricinus communis* L.)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia. Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2009. p. 18-22.

NICOLAS, E.; BEGGS, J.M.; TARASCHI, T.F. Gelonin is an unusual DNA glycosylase that removes adenine from single-stranded DNA, normal base pairs and mismatches. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 40, p. 31399–31406, 2000.

NIELSEN, K.; BOSTON, R. S. Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.**, v. 52, p. 785-816, 2001.

NG, T.B.; CHAN, W.Y.; YEUNG, H.W. Proteins with abortifacient, ribosome inactivating, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS activities from Cucurbitaceae plants. **Gen. Pharmacol.**, v. 23, n. 4, p. 579–590, 1992.

NG, T.B.; LAM, J.S.Y.; WONG, J.H.; LAM, S.K.; NGAI, P.H.K.; WANG, H.X.; CHU, K.T.; CHAN, W.Y. Differential abilities of the mushroom ribosome-inactivating proteins hypsin and velutin to perturb normal development of cultured mouse embryos. **Toxicol. in vitro.**, v. 24, n. 4, p. 1250-1257, 2010.

NUCHSUK, C.; WETPRASIT, N.; ROYTRAKUL, S.; RATANAPO, S. Larvicidal activity of a toxin from the seeds of *Jatropha curcas* Linn. against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* Say. **Trop. Biomed.**, v. 29, n. 2, p. 286–296, 2012.

NUNES, B.S.; RENSONNET, N.S.; DAL-SECCO, D.; VIEIRA, S.M.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H.; MOURA, T.R.; TEIXEIRA, C.S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; CUNHA, F.Q.; NAPIMOGA, M.H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 379, n. 6, p. 609-616, 2009.

OLSNES, S. The history of ricin, abrin and related toxins. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 361-370, 2004.

OLSNES, S.; SANDVIG, K.; PETERSEN, O.W.; DEURS, B.V. Immunotoxins-entry into cells and mechanisms of action. **Imnulo. Today**, v. 10, n. 9, p. 291-295, 1989.

PEUMANS, W.J.; HAO, Q.; VAN DAMME, E.J.M. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? **The FASEB Journal**, v. 15, p. 1493-1506, 2001.

PERVIN, F.; HOSSAIN, M.M.; KHATUN, S.; SIDDIQUE, S.P.; SALAM, K.A.; KARIM, M.R.; ABSAR, N. Comparative cytotoxicity study of six bioactive lectins purified from pondweed (*Potamogeton nodosus* Poir) rootstock on Brine Shrimp. **Journal of Medical Science**, v. 6, n. 6, p. 999–1002, 2006.

PIMENTEL, M.F.; LIMA, PIRES, D.; MARTINS, L.R.; BEATRIZ, A.; SANTAELLA, S.T.; COSTA-LOTUFO, L.V. Ecotoxicological analysis of cashew nut industry effluents, specifically two of its major phenolic components, cardol and cardanol. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 3, p. 363 – 368, 2009.

PEREIRA, M.D.; DIAS, D.C.F.S.; BORGES, E.E.L.; MARTINS FILHO, S.; DIAS, L. A.D.; SORIANO, P.E. Physiological quality of physic nut (*Jatropha curcas* L.) seeds during storage. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 1, p. 21-27, 2013.

POLLARD, A.J.; REEVES, R.D.; BAKER, A.J.M. Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. **Plant. Sci.**, v. 17, p. 217–218, 2014.

PURI, M.; KAUR, I.; PERUGINI, M.A.; GUPTA, R.C. Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications. **Drug Discov.Today**, v. 17, n. 13, p. 774-783, 2012.

QIN, W.; MING-XING, H.; YING, X., XIN-SHEN, Z.; FANG, C. Expression of a ribosome inactivating protein (curcin 2) in *Jatropha curcas* induced by stress. **J. Biosci.**, v. 30, n. 3, p. 351–357, 2005.

RÍOS-DE ÁLVAREZ, L.; JACKSON, F.; GREER, A.W.; GRANT, G.; JACKSON, E.; MORRISON, A.A.; HUNTLEY, J.F. Direct anthelmintic and immunostimulatory effects of oral dosing semi-purified phytohaemagglutinin lectin in sheep infected with *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Vet. Parasitol.**, v. 187, n. 1, p. 267-274, 2012.

ROBERTS, W.K.; SELITRENNIKOFF, C.P. Isolation and partial characterization of two antifungal proteins from barley. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 880, n. 2, p. 161–170, 1986.

SAETAE, D.; SUNTORNSUK, W. Toxic compound, anti-nutritional factors and functional properties of protein isolated from detoxified *Jatropha curcas* seed cake. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 12, n. 1, p.66-77, 2010.

SAHU, B.; SAHU, A.K.; THOMAS, V.; NAITHANI, S.C. Reactive oxygen species, lipid peroxidation, protein oxidation and antioxidative enzymes in dehydrating Karanj (*Pongamia pinnata*) seeds during storage. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 383-390, 2017.

SANTOS, A.F.; AZEVEDO, D.P.; MATA, R.C.S.; MENDONÇA, D.I.; SANT'ANA, A.E. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. **Bioresour. Technol.**, v. 98, n. 1, p. 135– 139, 2007.

SANTOS, A.F.; CAVADA, B.S.; ROCHA, B.A.; NASCIMENTO, K.S.; SANT'ANA, A.E. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresour. Technol.**, v. 101, n. 2, p. 794-798, 2010.

SANTOS, K.M.; GOMES, I.N.F.; SILVA-OLIVEIRA, R.J.; PINTO, F.E.; OLIVEIRA, B.G.; ROMÃO, W.; REIS, R.M.V.; RIBEIRO, R.I.M.A. *Bauhinia variegata candida* Fraction Induces Tumor Cell Death by Activation of Caspase-3, RIP, and TNF-R1 and Inhibits Cell Migration and Invasion *In Vitro*. **Biomed. Res. Int.**, v. 25, p. 1-10, 2018.

SCADDEN, D. T.; SCHENKEIN, D. P.; BERNSTEIN, Z.; LUSKEY, B.; DOWEIKO, J.; TULPULE, A.; LEVINE, A. M. Immunotoxin combined with chemotherapy for patients with AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer**, v. 83, n. 12, p. 2580-2587, 1998.

SCHORT, J.; WENG, A.; MELZING, M.F. Ribosome-inactivating and related proteins. **Toxins**. v. 7, n. 5, p. 1556-1615, 2015.

SHAW, P.C.; MULOT, S.; MA, S.K.; XU, Q.F.; YAO, H.B.; WU, S.; LU, X.H.; DONG, Y.C. Structure/function relationship study of Tyr14 and Arg22 in trichosanthin, a ribosome-inactivating protein. **Eur. J. Biochem.**, v. 245, n. 2, p. 423 – 427, 1997.

SHAW, P.C.; LEE, K.M.; WONG, K.B. Recent advances in trichosanthin, a ribosome-inactivating protein with multiple pharmacological properties. **Toxicon.**, v. 45, n. 6, p. 683–689, 2005.

SHI, W.; MAK, A. N.; WONG, K.; SHAW, P. Structures and Ribosomal Interaction of Ribosome-Inactivating Proteins. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1588-1599, 2016.

SINGH, R.; VYAS, D.; SRIVASTAVA, N.; NARRA, M. SPRERI experience on holistic approach to utilize all parts of *Jatropha curcas* fruit for energy. **Renewable Energy**, v. 33, n. 8, p. 1868-1873, 2008.

SMITH, D. C.; MARSDEN, C. J.; LORD, J.M.; ROBERTS, L. M. Expression, Purification and Characterization of Ricin vectors used for exogenous antigen delivery into the MHC Class I presentation pathway. **Biol. Proced. Online**, v. 5, n. 1, p. 13-19, 2003.

SOUZA, A. D. V.; FÁVARO, S. P.; ÍTAVO, L. C. V.; ROSCOE, R. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-mansão, nabo-forrageiro e crambe. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 44, n. 10, p. 1328-1335, 2009.

SPOONER, R. A.; WATSON, P. D.; MARSDEN, C. J.; SMITH, D. C.; MOORE, K. A.H.; COOK, J. P.; LORD, J. M.; ROBERTS, L. M. Protein disulphide-isomerase

reduces ricin to its A and B chains in the endoplasmic reticulum. **Biochem. J.**, v. 383, n. 2, p. 285–293, 2004.

STEEVES, R. M.; DENTON, M. E.; BARNARD, F. C.; HENRY, A.; LAMBERT, J. M. Identification of three oligosaccharide binding sites in ricin. **Biochemistry**, v. 38, n. 36, p. 11677–11685, 1999.

STIRPE, F.; PESSIIONBRIZZI, A.; LORENZONI, E.; STROCCHI, P.; MONTANARO, L.; SPERTI, S. Studies on proteins from seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas*—toxic properties and inhibition of protein-synthesis *in vitro*. **Biochem J.**, v. 156, n. 1, p. 1–6, 1976.

STIRPE, F.; GASPERI-CAMPANI, A.; BARBIERI, L.; LORENZONI, E.; MONTANARO, L.; SPERTI, S.; BONETTI, E. Inhibition of protein synthesis by modeccin, the toxin of *Modecca digitata*. **FEBS Lett.**, v. 85, n. 1, p. 65–67, 1978.

STIRPE, F.; BAILEY, S.; MILLER, S.P.; BODLEY, J.W. Modification of ribosomal RNA by ribosome-inactivating proteins from plants. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, n. 4, p. 1349–1357, 1988.

STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 371–383, 2004.

STIRPE F.; BATTELLI M.G. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 63, n. 13, p. 1850–1866, 2006.

STIRPE, F.; BOLOGNESI, A.; BORTOLOTTI, M.; FARINI, V.; LUBELLI, C.; PELOSI, E.; POLITO, L.; DOZZA, B.; STROCCHI, P.; CHAMBERY, A.; PARENTE, A.; BARBIERI, L. Characterization of highly toxic type 2 ribosome-inactivating proteins from *Adenia lanceolata* and *Adenia stenodactyla* (Passifloraceae). **Toxicon**, v. 50, n. 1, p. 94–105, 2007.

SUN, Y.; HUANG, P.L.; LI, J.J.; HUANG, Y.Q.; ZHANG, L.; HUANG, P.L.; LEE-HUANG S. Anti-HIV agent MAP30 modulates the expression profile of viral and cellular genes for proliferation and apoptosis in AIDS-related lymphoma cells infected with Kaposi's sarcoma associated virus. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 287, n. 4, p. 983–994, 2001.

TAYLOR S.; MASSIAH, A.; LOMONOSSOFF, G.; ROBERTS, L.M.; LORD, J.M.; HARTLEY, M., Correlation between the activities of five ribosome-inactivating proteins in depurination of tobacco ribosomes and inhibition of tobacco mosaic virus infection. **Plant J.**, v. 5, n. 6, p. 827–835, 1994.

TILL, M. A.; GHETIE, V.; GREGORY, T.; PATZER, E. J.; PORTER, J. P.; UHR, J. W.; CAPON, D. J., VITETTA, E. S. HIV-infected cells are killed by rCD4-ricin A chain. **Science**, v. 242, n. 4882, p. 1166–1168, 1988.

TOMATSU, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; SHIBAMOTO, N. Aralin, a new cytotoxic protein from *Aralia elata*, inducing apoptosis in human cancer cells. **Cancer Lett.**, v. 199, n. 1, p. 19–25, 2003.

- TRAN, M.; HENRY, R.E.; SIEFKER, D.; VAN, C.; NEWKIRK, G.; KIM, J.; BUI, J.; MAYFIELD, S.P. Production of anti-cancer immunotoxins in algae: Ribosome inactivating proteins as fusion partners. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 110, n. 11, p. 2826-2835, 2013.
- TSAI, B.; YE, Y.; RAPOPORT, T. A. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 3, n. 4, p. 246–255, 2002.
- VIRGENS, I.O.; CASTRO, R.D.; LOUREIRO, M.B.; FERNANDEZ, L.G. Revisão: *Jatropha curcas* L.: aspectos morfológicos e químicos. **Braz. J. Food Technol.**, v. 20, p. 309-314, 2017.
- WALSH, M.J.; DODD, J.E.; HAUTBERGUE, G.M. Ribosome-inactivating proteins. Potent poisons and molecular tools. *Virulence*, v. 4, n. 8, p. 774-784, 2013.
- WANG, W. X.; DONG, J. Y.; ZHOU, S. Y.; LI, W.; ZHAO, Y. Modification of ricin and its hepatotoxicity and activity against hepatocellular cancer in mice. **World J. Gastroenterol.**, v. 4, n. 4, p. 307-310, 1998.
- WANG, Y. X.; JACOB, J.; WINGFIELD, P. T.; PALMER, I.; STAHL, S. J.; KAUFMAN, J. D.; HUANG, P. L.; LEE-HUANG, S.; TORCHIA, D. A. Anti-HIV and anti-tumor protein MAP30, a 30 kDa single-strand type-I RIP, shares similar secondary structure and beta-sheet topology with the A chain of ricin, a type-II RIP. **Protein Sci.**, v. 9, n. 1, p. 138-144, 2000.
- WEI, Q.; LIAO, Y.; ZHOU, L.; ZHOU, J.; WANG, S.H.; CHEN, F. Antifungal activity of curcun from seeds. **Chin. J. OF Oil Crop Sci.**, v. 26, n. 3, p. 71–75, 2004.
- WENG, A.; THAKUR, M.; BECERN-BRAUN, F.; BACHRAN, D.; BACHRAN, C.; RIESE, S.B.; JENET-SIEMS, K.; GILABERT-ORIOLO, R.; MELZIG, M.F.; FUCHS, H. The toxin component of targeted anti-tumoral toxins determines their efficacy increases by saponins. **Mol. Oncol.**, v. 6, n. 3, p. 323-332, 2012.
- WICAKSONO, P.A.; NAME, S.; MARTIEN, R.; ISMAIL, H. Formulation and Cytotoxicity of Ribosome-Inactivating Protein *Mirabilis Jalapa* L. Nanoparticles Using Alginate-Low Viscosity Chitosan Conjugated with Anti-Epcam Antibodies in the T47D Breast Cancer Cell Line. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, n. 17, n. 4, p. 2277-2284, 2016.
- WOODY, R.W. Circular dichroism of peptides and proteins. *In*: Nakanishi, K.; Berova, N.; Woody, R.W. (eds.) *Circular Dichroism. Principles and Applications*. Wiley-VCH Publishers, Inc., New York, 1994, p. 473-521.
- XIAO, J.; ZHANG, H. Comparative evaluation of *Jatropha curcas* L. seed meals obtained by different methods of defatting on toxic, antinutritional and nutritive factors. **J. Food Sci. Technol.**, v. 51, n. 6, p. 1126-1132, 2014.
- XIAO, J.; ZHANG, H.; NIU, L.; WANG, X.; LU, X. Evaluation of detoxification methods on toxic and antinutritional composition and nutritional quality of proteins in *Jatropha curcas* meal. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n. 8, p. 4040-4044, 2011.

YADAV, S.K.; JUWARKAR, A.A.; KUMAR, G.P.; THAWALE, P.R.; SINGH, S.K.; CHARKRABARTI, T. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L.: impact of dairy sludge and biofertilizer. **Bioresour. Technol.**, v. 100, n. 20, p. 4616–4622, 2009.

YAMASAKI, C.; NISHIKAWA, K.; ZENG, X.T.; KATAYAMA, Y.; NATORI, Y.; KOMATSU, N.; ODA T.; NATORI Y. Induction of cytokines by toxins that have an identical RNA N-glycosidase activity: Shiga toxin, ricin, and modeccin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1671, n. 1, p. 44–50, 2004.

YE, W.; NANGA, R.P.R.; KANG, C.B.; SONG, J.H.; SONG, S.K.; YOON, H.S. Molecular characterization of the recombinant A-chain of a type II ribosome-inactivating protein (RIP) from *Viscum album coloratum* and structural basis on its ribosome-inactivating activity and the sugar-binding properties of the B-chain. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 30, n. 5, p. 560-570, 2006.

YEUNG, H.W.; LI, W.W.; FENG, L.; BARBIERI, L.; STIRPE, F. Trichosanthin and momorcharin: Identity of abortifacient and ribosome-inactivating proteins. **International Journal of peptide and protein research**, v. 31, n. 3, p. 265-268, 1988.

ZAEYTIJD, J.; VAN DAMME, E.J.M. Extensive Evolution of Cereal Ribosome-Inactivating Proteins Translates into Unique Structural Features, Activation Mechanisms, and Physiological Roles. **Toxins**. v. 9, n. 4, p. 1-26, 2017.

ZAMBONI, M.; BRIGOTTI, M.; RAMBELLI, F.; MONTANARO, L.; SPERTI, S. High-pressure-liquid-chromatographic and fluorimetric methods for the determination of adenine released from ribosomes by ricin and gelonin. **Biochemical Journal**, v. 259, n. 1, p. 639-643.1989.

ZARLING, J.N.; MORAN, P.A.; HAFFAR, O.; SIAS, J.; RICHMAN, D.D.; MYERS, D.E.; KUEBELBECK, V.; LEDBETTER, J.A.; UCKUN, F.M. Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4+ cells by monoclonal antibodies. **Nature**, v. 347, p. 92-95, 1990.

ZHANG, J.P.; QIN, X.B.; XU, Y.; CHEN, F. Isolation and analysis on the genomic DNA sequence of members of a curcin gene-family encoding a ribosome-inactivating protein from *Jatropha curcas*. **Journal of Sichuan University (Nature Science Edition)**, v. 42, n. 5, p. 1042–1046, 2005.

ZHANG, S.; WU, P.Z.; CHEN, Y.P.; LI, M.R.; JIANG, H.W.; WU, G.J. Cloning and expression analysis of a novel curcin gene (*curcin-L2*) from *Jatropha curcas* L. **Guangdong Agricultural Sciences**, v. 9, p. 1–5, 2012.

ZHAO, Q.; WANG, W.; WANG, Y.; XU, Y.; CHEN, F. The effect of curcin from *Jatropha curcas* on apoptosis of mouse sarcoma-180 cells. **Fitoterapia**, v. 83, n.5, p. 849-852, 2012.

ZHOU, X.; XIANG-DONG, L.; YUAN, J.Z.; TANG, Z.H.; LIU, W.Y. Toxicity of cinnamomin-a new type II ribosome-inactivating protein to bollworm and mosquito. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, 259–264. 2000.

ZHAO, Y. N.; WANG, H.F.; LIU, J.X. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake by a new soil-borne *Enterobacter cloacae* strain. **Letters in Applied Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 197-204, 2018.