



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

José Iran Pereira Veras

**APROVEITAMENTO DA TORTA RESIDUAL DE SEMENTES DE PINHÃO
MANSO (*Jatropha curcas* L.) PARA A OBTENÇÃO DA CURCINA: UMA RNA-N-
GLICOSIDASE COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Sobral-Ce

2015

JOSÉ IRAN PEREIRA VERAS

**APROVEITAMENTO DA TORTA RESIDUAL DE SEMENTES DE PINHÃO
MANSO (*Jatropha curcas* L.) PARA A OBTENÇÃO DA CURCINA: UMA RNA-N-
GLICOSIDASE COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia

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

Sobral-Ce

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

V584a Veras, José Iran Pereira.
Aproveitamento da torta residual de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para a obtenção da curcina : uma RNA-N-glicosidade com potencial biotecnológico / José Iran Pereira Veras. – 2015.
65 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2015.
Orientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.

1. Curcina. 2. *Jatropha*. 3. Torta de sementes. I. Título.

CDD 660.6

JOSÉ IRAN PEREIRA VERAS

**APROVEITAMENTO DA TORTA RESIDUAL DE SEMENTES DE PINHÃO
MANSO (*Jatropha curcas* L.) PARA A OBTENÇÃO DA CURCINA: UMA RNA-N-
GLICOSIDASE COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará – *Campus* do Pici, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em ____/____/____

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

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

A minha mãe.

A minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e coragem para enfrentar as dificuldades e desafios.

A minha família, pelo apoio e incentivo.

Aos colegas, pelo companheirismo, carinho e solidariedade.

Aos professores pela sabedoria e ensinamentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva, pela paciência.

Aos integrantes do Laboratório de Biotecnologia Molecular (Labbmol)

A todos que, direta e indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho, meu muito obrigado.

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

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

“Não haverá borboletas se a vida não passar por longas e silenciosas metamorfoses”.

(Ruben Alves)

RESUMO

O uso da torta residual de sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) tem sido limitada devido à presença de fatores tóxicos, alérgicos e anti-nutricionais. Em parte, esta toxicidade é atribuída a uma RIP do tipo 1 denominada curcina. O curcina é um RNA *N*-glicosidase com grande potencial biotecnológico, pois apresenta várias atividades biológicas, incluindo a ação anticâncer. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de aproveitamento da torta residual de sementes de *J. curcas* para a obtenção da forma bioativa da curcina. Inicialmente, a torta de sementes (com 15 dias de armazenagem) foi delipidada com hexano por 12 h e transformada em um pó fino e homogêneo. Este pó foi submetido a extração de proteínas (1:10 p/v) com tampão PBS pH 7,2 durante 4 h, a 25 °C. O extrato total foi centrifugado a 12000 xg durante 20 min, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e submetido a 60% de saturação com sulfato de amônio, durante 6 h a 5 °C. O precipitado proteico foi dissolvido no mesmo tampão de extração. A fração proteica solubilizada (denominada fração 0/60) foi dialisada e aplicada numa coluna de Sephadex G-100. Cinco picos proteico principais foram obtidos do processo cromatográfico. A fração correspondente ao pico 4 analisada por eletroforese (SDS-PAGE) e uma única banda proteica de peso molecular aparente de 28 KDa foi observada, semelhante ao peso molecular de curcina de sementes. Esta fração, denominada CTS (curcina da torta de sementes), foi capaz de depurar (*in vitro*) RNA ribossomal de *Pichia pastoris* e de inibir (*in vitro*) a síntese proteica da luciferase. Os resultados do ensaio de toxicidade aguda em ratos mostraram que a CTS apresentou uma DL₅₀ de 60 mg/kg. Os ensaios de dicroísmo circular mostraram que a CTS tem predominância de folhas-β e que a sua temperatura de *melting* está em torno de 65° C. O anticorpo policlonal produzido anti-CTS foi capaz de reconhecer especificamente a curcina de sementes. Como conclusão, mesmo após 15 dias de armazenamento, a torta residual de sementes de *J. curcas* pode ser aproveitada como matéria-prima para a obtenção da curcina bioativa, estável e funcional.

Palavras-chave: **Curcina. Jatropha. Torta de sementes**

ABSTRACT

The use of the residual *Jatropha curcas* seeds pie been limited due to the presence of toxic, allergenic and anti-nutritional factors. In part, this toxicity is attribute to a RIP type 1 called curcin. The curcin is a RNA *N*-glucosidase with great biotechnological potential, because it presents several biological activities, including anticancer action. The objective of this study was to evaluate the viability of utilization of the residual pie from *J. curcas* seeds to obtain the of curcin bioactive form. Initially, the seeds pie (with 15 days old) was delipidated with hexane for 12 h and transformed into a fine and homogeneous powder. This powder was submitted to proteins extraction (1: 10 w / v) with PBS buffer pH 7.2, for 4 h, at 25 °C. The total extract was centrifuged at 12000 xg for 20 min at 4 °C. The supernatant was collected submitted to 60% saturation with ammonium sulfate for 6 h at 5 °C. The solubilized protein fraction was dialyzed and applied to a Sephadex G-100. Five major protein peaks were obtained of the chromatographic process. The fraction corresponding to peak 4 was pooled and analyzed by electrophoresis (SDS-PAGE). A single protein band of apparent molecular weight of 28 KDa was observed, similar to curcin from seeds. This fraction corresponding to curcin seeds pie (CSP) was also able of depurinate (*in vitro*) the ribosomal RNA from *Pichia pastoris* and to inhibit (*in vitro*) protein synthesis of luciferase. The results of acute toxicity assay in mice showed that CSP presented a LD₅₀ of 60 mg/kg. Circular dichroism assays have shown that the CTS has a predominance of β -sheets and its melting temperature is around 65 °C. The polyclonal antibody anti-CTS was able to specifically recognize the curcin seeds. In conclusion, even after 15 days of storage, the residual pie from *J. curcas* seeds could be used for obtaining of the bioactive curcin, stable and functional.

Keywords: Curcin. *Jatropha*. Seeds Pie.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	Página
1 – Sementes de pinhão-manso, o óleo e a torta resultante da extração do óleo das sementes	13
2 - O jornalista búlgaro Georgi Markov.	17
3 – Representação esquemática da organização molecular das RIPs tipo 1 e 2.	19
4 – Esquema da estrutura molecular das RIPs tipo 3.	20
5 – Representação esquemática do sítio específico de ação das RIPs em ribossomos de ratos.	21
6 – Pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.) e suas partes vegetativas.	30
7 – Análise eletroforética (SDS-PAGE 15%) do extrato bruto da farinha da torta de sementes de pinhão-manso e da fração proteica precipitada com sulfato de amônio.	41
8 – Isolamento e análise eletroforética da curcina da torta de sementes de pinhão-manso.	42
9 – Análise da atividade RNA <i>N</i> -glicosilase da CTS através de eletroforese em gel de agarose/formamida.	43
10 – Espectro de dicroísmo circular da CTS	45
11 – Ensaio da inibição da síntese proteica promovida pela CTS em sistema livre de células (TNT® <i>Coupled Reticulocyte Lysate System</i>).	47
112 – Ensaio de <i>Western blotting</i> da curcina de sementes e da CTS utilizando anticorpos policlonais anti-CTS.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1- Toxicidade aguda determinada através de injeção intraperitoneal em camundongos, utilizando diferentes doses da CTS	44
2 - Predição da estrutura secundária e da temperatura de transição (<i>melting</i>) da CTS.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A ₄₃₂₄	Adenina localizada na posição 4324 do RNA ribossomal
BSA	Albumina sérica bovina
ConA	concanavalina A
DL ₅₀	Dose letal suficiente para matar 50% da população
D. O. _{280 nm}	Densidade optica a 280 nanomolar
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Gal	Galactose
GAGA	Sequência de guanina e adenina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
JIP60	<i>Jasmonate-Induced Protein</i> de 60 kDa
kDa	Quilodaltons
LabBMol	Laboratório de Biotecnologia Molecular
M	Molar
mM	Milimolar
µL	Microlitros
mL	Mililitros
Man	Manose
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanomolar
NaCl	Cloreto de sódio
PAP	Proteína antiviral do <i>pokeweed</i>
RIP	<i>Ribosome-Inactivating Protein</i>
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TRIS	Tris-(aminometilidenotrimetanol)
UH	Unidade de hemaglutinação
UV	Ultravioleta
28 S	Índice de sedimentação (S) 28 do RNA ribossomal

SUMÁRIO

	Página
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	12
1. Considerações gerais	12
2. Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs)	13
2.1. RIPs: Breve histórico	14
2.2. Classificação das RIPs	18
2.3. Mecanismos de ação e internalização das RIPs	20
2.4. Distribuição das RIPs na natureza.	24
2.5. Propriedades físico-químicas e estruturais das RIPs	24
2.6. Atividades e potencial biotecnológico das RIPs	26
3. Curcina	30
2. <u>OBJETIVO</u>	33
4. <u>MATERIAIS</u>	34
5. <u>MÉTODOS</u>	35
6. <u>RESULTADOS E DISCUSSÕES</u>	40
7. <u>CONCLUSÕES</u>	49
8. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	50

INTRODUÇÃO

1. Considerações gerais

Entre as diversas plantas oleagenosas que vêm sendo avaliadas, uma atenção especial está sendo dada ao pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) no Plano Nacional de Agroenergia (OLIVEIRA e RAMALHO, 2006). Referente ao setor produtivo, o pinhão-manso (figura 1) tem se tornado atrativa, principalmente devido ao seu potencial de rendimento. Enquanto a soja produz cerca de 500 kg óleo/ha, o pinhão-manso tem potencial para produzir cerca de 1500 kg óleo /ha.

Figura 1 – Sementes de pinhão-manso, o óleo e a torta resultante da extração do óleo das sementes.



Fonte: Embrapa Agroenergia, 2014.

O óleo de pinhão-manso está presente principalmente no albúmen dos frutos. Cada fruto de pinhão-manso pesa aproximadamente 0,75 g, no qual o albúmen representa em torno de 65% da massa total. Com relação à composição química, o albúmen contém de 27 à 32% de proteína e de 58 à 60% de lipídeos (MAKKAR *et al.*, 1998).

A torta residual é o produto resultante do tratamento dos grãos de pinhão-manso para a retirada do óleo. A composição da torta pode variar em função do modo de extração (prensa mecânica ou extração por solvente) e do tipo de grãos e teor de óleos nos grãos. O alto teor de proteína da torta (até 46 %) a torna

potencialmente útil como suplemento protéico, já que é rica em aminoácidos sulfurados e em aminoácidos essenciais que atendem ao padrão sugerido pela FAO. No entanto, o uso desse co-produto para a nutrição animal somente é viável se seus componentes tóxicos forem removidos (ADERIBIGBE *et al.*, 1997; MAKKAR *et al.*, 1998).

Estudos com seres humanos e com animais, ruminantes ou não, demonstraram que tanto as sementes quanto a torta não tratada são tóxicos (ADAM, 1974; AHMED e ADAM, 1979a, b; LIBERALINO *et al.*, 1988, EL BADAWI *et al.*, 1992). Nesses trabalhos foram testadas doses agudas e crônicas de torta durante 14 dias e os resultados mostraram que, mesmo o tratamento de menor dose testado, levou todos os animais à morte. Os primeiros sinais observados nesses animais, antes do óbito, foram de diarreia, dispnéia, desidratação e perda de condição geral, associados com alguns achados patológicos. Esse padrão de toxicidade deve-se à presença de fatores tóxicos como as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) e os ésteres diterpenos (ésteres de forbol). Recentemente, foi identificada uma proteína com potencial alergênico similar ao da albumina 2S de *Ricinus communis* (MACIEL *et al.*, 2009; MARTINEZ-HERRERA *et al.*, 2006).

Apesar de serem consideradas um fator negativo no aproveitamento da torta das sementes de pinhão-manso, devido a toxicidade, estudos em diferentes áreas da ciência têm demonstrado que as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) são moléculas multiativas que apresentam potenciais aplicações biotecnológicas em diferentes setores (saúde humana e animal, agricultura etc.). Esse dado já justifica a importância do aproveitamento de novas fontes de matérias primas (com a torta residual de sementes resultante da extração de óleos) para a obtenção de proteínas bioativas, como as RIPs.

2. Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs)

A simples observação de que algumas proteínas vegetais eram capazes de inativar irreversivelmente (*in vitro*) a síntese de proteína em ribossomos animais, resultou na origem do termo “proteínas inativadoras de ribossomos” ou “RIP” (do termo inglês – *Ribosome-inactivating proteins*). Por ter sido adotado antes de estudos estruturais e enzimáticos mais aprofundados, por muito tempo, esse termo foi erroneamente aplicado para todas as proteínas vegetais que

apresentassem esse tipo de atividade biológica. Após a elucidação do modo de ação das RIPs sobre ribossomos eucariotos e a descoberta de que elas possuem um sítio catalítico com atividade RNA N-glicosidase, o termo RIP passou a ser associado apenas a essa atividade enzimática (Van Damme *et al.*, 2001).

Conforme a nomenclatura adotada pela Comissão Internacional de Enzimas (EC), todas as proteínas capazes de catalisar a endohidrólise da ligação N-glicosídica de uma adenina específica do RNA ribossomal, são consideradas RNA N-glicosidasas (EC 3.2.2.22). Embora o termo RNA N-glicosidase seja comumente usado como sinônimo, RNA N-glicosidase é o nome oficial adotado para esse grupo de enzimas e deve ser preferencialmente usado (Van Damme *et al.*, 2001).

A associação do termo RIP com a atividade RNA N-glicosidase é importante para diferenciar essas proteínas de outras, que apesar de também serem capazes de inativar ribossomos (por exemplo, RNases e proteases) não são consideradas RIPs, pois utilizam outros mecanismos de ação.

Atualmente, sabe-se que as RIPs não são somente enzimas com uma atividade catalítica *in vitro* bem definida, elas também são proteínas bioativas que apresentam uma série de atividades biológicas específicas tanto em eucariotos como em procariotos. Assim, muitas dessas atividades das RIPs podem ser um indicativo do seu papel fisiológico (Peumans e Van Damme, 2001).

2.1. RIPs: Um breve histórico.

Há tempos a raça humana utiliza plantas para fins medicinais, em busca de tratamento para ferimentos, como também para a cura de diversas doenças. Isto resultou na descoberta de várias plantas tóxicas e medicinais, e conseqüentemente, permitiu também o estudo e uso dos seus princípios ativos. Plantas tóxicas, como a mamona (*Ricinus comunis*) e o jequeriti (*Abrus precatorius*), foram utilizadas por antigas civilizações gregas e egípcias, mesmo sem o conhecimento sobre quais princípios ativos eram responsáveis por suas atividades biológicas e terapêuticas (REYES, 2011).

Somente em 1857, Georg Fridericus Krich descreveu pela primeira vez, a toxicidade dos óleos de *Ricinus communis*, *Croton tiglium* e *Euphorbiae lathyridis* no trabalho intitulado "*Experimenta quaedam farmacológica de oleis ricini, crotonis*

et euphorbiae lathyridis” (Krich *apud* Ilomets, 1990). Em 1871, Emil Werner conseguiu obter uma fração tóxica ativa de extrato de sementes de *Ricinus communis* ao fazer extração a frio e precipitação alcoólica. Emil foi um dos primeiros pesquisadores a detectar a capacidade de imunização de animais contra frações proteicas tóxicas. Em seus experimentos, ele observou que com o passar do tempo, havia uma redução do efeito tóxico das frações em animais imunizados, já que era comum utilizar o mesmo animal várias vezes (Warden & Waddel *apud* Kocourek, 1986). Em 1884, Warden e Waddel mostraram que a toxicidade de *Abrus precatorius* era devido uma fração proteica obtida por precipitação alcoólica a partir do extrato aquoso das sementes. No entanto, foi levantado a hipótese que a toxicidade seria proveniente de uma contaminação bacteriana da semente (Warden & Waddel *apud* Kocourek, 1986). Dixon, em 1887, foi o primeiro pesquisador a levantar a hipótese que, de fato, a propriedade tóxica da mamona seria proveniente da ação de uma proteína presente em suas sementes (DIXON *apud* OLSNES e PIHL, 1977).

Em 1888, no laboratório de Kobert em Dorpat, Stillmark purificou uma proteína do extrato bruto de sementes de mamona, a qual nomeou de ricina (DIXON *apud* OLSNES e PIHL, 1977). Em sua tese de doutorado, Stillmark descreveu a associação entre a atividade aglutinante dessa proteína contra eritrócitos e a atividade tóxica da mamona. Hellín, outro pesquisador que também trabalhava no laboratório de Kobert, obteve resultados semelhantes com extratos brutos de sementes de jequeriti (*Abrus precatorius*), dos quais conseguiu identificar e purificar a proteína abrina (HELLIN *apud* LIENER, 1986).

O pesquisador Paul Ehrlich, em 1891, conseguiu estabelecer princípios fundamentais de imunologia usando ricina e abrina, relatando o princípio da reação antígeno/anticorpo (EHRlich *apud* KURTH e SCHWERDTFEGE, 2012). Ehrlich demonstrou experimentalmente que a injeção subcutânea em animais, com ricina ou abrina, protegia-os posteriormente da atividade tóxica proveniente das mesmas. Além disso, ele também verificou que esta resposta poderia ser detectada no soro obtido dos animais tratados e tinha caráter específico. Atualmente, esse processo é conhecido como interação antígeno-anticorpo. Deste experimento também surgiu a hipótese que essas proteínas se fixavam aos tecidos antes de exercer a sua ação tóxica e que as mesmas deviam ser

constituídas por duas porções distintas: uma porção que interage com os tecidos e outra tóxica. Esta hipótese foi confirmada décadas depois com a caracterização estrutural da abrina e da ricina (OLSNES, 2004).

Em 1897, Flexner descreveu a patologia da ricina e o envenenamento por abrina (FLEXNER, 1897). Apesar dos avanços nos estudos, por muito tempo essas toxinas perderam o interesse da comunidade científica. Somente em 1960, elas voltaram a ter atenção, quando Lin e colaboradores, verificaram que essas proteínas apresentavam maior atividade citotóxica sobre células tumorais do que em células normais (LIN *et al.*, 1970; LIN *et al.*, 1971).

Os estudos de Olsnes e Pihl (1973) e de Montanaro e Sperti (1973), no início da década de 70, permitiram a determinação da atividade direta da abrina e a ricina sobre a síntese de outras proteínas. Na mesma época, esses pesquisadores demonstraram que ambas as toxinas eram constituídas por duas cadeias polipeptídicas que migravam diferencialmente na eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). A cadeia protéica de migração mais rápida foi denominada de “cadeia A” e a outra de “cadeia B”. Também foi possível confirmar que estas proteínas inibiam fortemente a síntese proteica em sistemas livres de células, sendo esta atividade incrementada na presença do agente redutor β -mercaptoetanol. A cadeia A era a responsável por tal atividade inibitória, agindo na subunidade 60S do ribossomo (OLSNES *et al.*, 1972).

Ainda no início da década de 70, Obrig e colaboradores identificaram a primeira toxina protéica de cadeia única (cadeia A) capaz de inibir a síntese proteica. Essa toxina recebeu o nome de proteína antiviral de *Phytolacca americana* (PAP), pois foi isolada de extratos de folhas de *P. americana* e impedia a transmissão de infecção pelo vírus do mosaico do tabaco (OBRIG *et al.*, 1973).

Outro marco importante no estudo das RIPs foi a elucidação do mecanismo de ação de RIPs por Endo e colaboradores (ENDO *et al.*, 1987a; ENDO *et al.* 1987b). Estudando a ricina, estes pesquisadores demonstraram que a cadeia A possui atividade RNA *N*-glicosidase específica, isto é, tem a capacidade de remover enzimaticamente uma adenina de uma região conservada do RNA ribossomal, resultando na inibição da síntese proteica.

Fatos curiosos também marcaram o histórico das RIPs. Em 1978, a ricina foi utilizada como arma biológica em um crime político conhecido como

“assassinato do guarda-chuva” (figura 2). Neste caso, a vítima o jornalista da BBC Georgi Markov sofreu um atentado do governo búlgaro, em Londres, enquanto cruzava a ponte Westminster. Um agente da KGB teria utilizado um dispositivo adaptado no guarda-chuva para disparar um projétil contendo a toxina. O jornalista morreu, três dias após o atentado (SHARON e LIS, 2004). Um outro episódio recente do uso da ricina como arma biológica, foi em 2013, quando uma carta anônima contendo ricina foi enviada ao atual presidente dos EUA, Barack Obama. Esse episódio ganhou grande repercussão internacional.

Desde a década de 90, novas RIPs vem sendo identificadas, purificadas e caracterizadas, resultando tanto na obtenção de informações estruturais como também na aplicação dessas proteínas nas pesquisas médica e na agricultura. Um exemplo do crescimento das pesquisas envolvendo as RIPs, é o número de trabalhos encontrados na plataforma *Science Direct* quando se busca o termo “Ribosome inactivating protein”, cerca de 5.630 trabalhos até o presente momento. Ao utilizar o mesmo termo no *Protein Data Bank* é possível encontrar 163 modelos de estruturas tridimensionais depositadas. No *GenBank* já são 187 depósitos de sequências correspondentes aos genes codificadores de RIPs. Esses dados mostram, em termos quantitativos, que as pesquisas relacionadas as RIPs aumentaram ao longo do tempo.

Figura 2 - O jornalista búlgaro Georgi Markov. Markov foi assassinado em 1978 num atentado no qual utilizou-se um guarda-chuva adaptado para ocultar um mecanismo pneumático que disparava pequenos projéteis contendo a toxina vegetal ricina.



Fonte: Adaptada do autor.

2.2. Classificação das RIPs

Mundy *et al.* (1994), relata que as RIPs estão classificadas em três grupos, de acordo com suas propriedades físicas e estruturais em RIPs do tipo 1, 2 e 3.

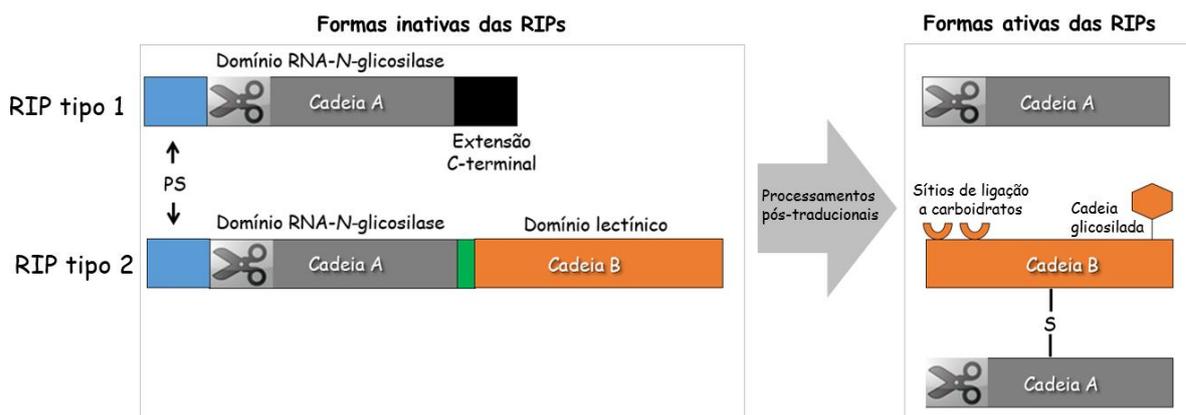
As RIP do tipo 1 (*type 1 RIP*) são proteínas monoméricas com um único domínio RNA *N*-glicosidase. A maioria das RIPs tipo 1 possui peso molecular na faixa de 27 a 30 kDa (figura 3), como a saporina (*Saponaria officinalis*) e a PAP, proteína antiviral de *Phytolacca americana* (STIRPE *et al.*, 1983; HUR *et al.*, 1995). Essas RIPs normalmente são proteínas básicas que apresentam resíduos conservados dentro do sítio ativo e/ou em regiões próximas ao sítio ativo (ROBERTUS e MONZINGOS, 2004). Por não possuírem uma cadeia ligante a glicoconjugados, geralmente as RIPs tipo 1 apresentam uma baixa citotoxicidade. No entanto, algumas proteínas desta classe podem entrar na célula através do mecanismo endocitose fase-fluída, um exemplo é a saporina, que se liga ao receptor α_2 -macroglobulina expresso em muitas células humanas (CAVALLARO, 1995).

As RIPs do tipo 2 (*type 2 RIP*) são proteínas heterodiméricas, geralmente muito tóxicas, com propriedades lectínicas e enzimáticas em subunidades polipeptídicas separadas, com pesos moleculares na faixa de 28 e 32 kDa (Figura 3). A subunidade catalítica (cadeia A) RNA-*N*-glicosidase é ligada por pontes dissulfeto a uma cadeia lectínica (cadeia B) (ROBERTUS e MONZINGOS, 2004). Essa cadeia lectínica é capaz de reconhecer especificamente e se ligar a carboíbratos, glicoproteínas ou glicoconjugados presentes na superfície de células eucarióticas e mediar o transporte da cadeia A para o citosol (Hartley *et al.*, 1996). Uma vez no citosol, a cadeia A das RIPs tipo 2 tem acesso à maquinaria de tradução e interrompe a síntese protéica. Pertencem a esta classe das RIPs tipo 2, as proteínas abrina (de *Abrus precatorius*) e a ricina (de *Ricinus communis*), ambas isoladas de sementes.

Já as RIPs do tipo 3 (*type 3 RIP*) são sintetizadas como precursoras inativas (proRIPs) que requerem um processamento proteolítico entre os aminoácidos envolvidos na formação do sítio ativo (figura 4). Essas RIPs são bem incomuns que os outros dois tipos, pois até o momento, somente 2 (a b-32 de milho e a JIP60 de cevada) foram completamente caracterizadas (LEE *et al.*, 2012). A JIP60 é formada por um domínio N-terminal longo, semelhante às RIPs

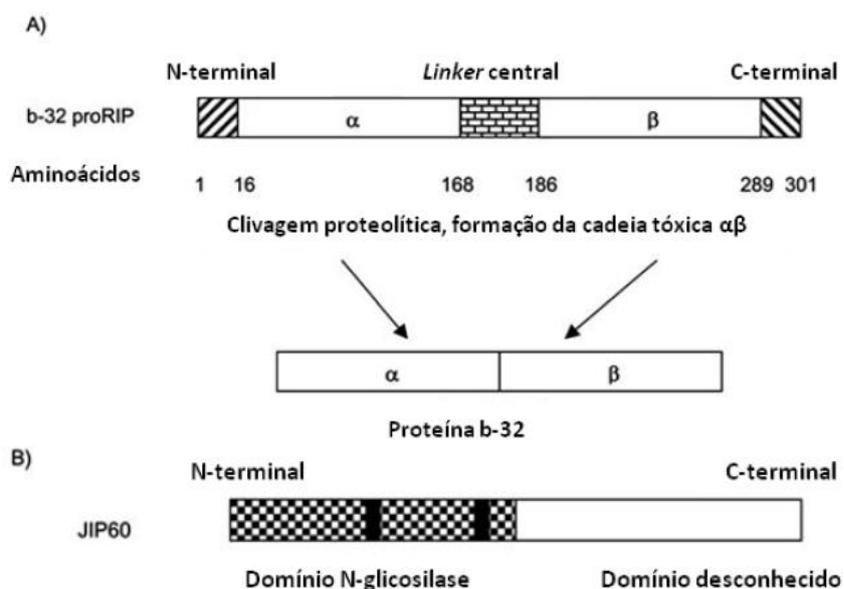
tipo 1, ligado a um domínio C-terminal com função ainda desconhecida e sequência não semelhante a nenhuma outra proteína de planta. Sua ativação se dá por clivagem proteolítica que remove domínios internos -COOH, além do domínio C-terminal (GIRBES *et al.*, 2004).

Figura 3 – Representação esquemática da organização molecular das RIPs tipo 1 e 2. Os dois tipos de RIPs apresentam uma sequência N-terminal de aproximadamente 24 resíduos de aminoácidos (um peptídeo sinal – PS – em azul) que é eliminada durante o processamento pós-traducional. Nas RIPs tipo 2 existe uma sequência de 12 resíduos (destacado em verde) que também é eliminada pós-traducionalmente para a formação de um heterodímero ativo, formado pela ligação covalente entre as cadeias A e B.



Fonte: Adaptada do autor.

Figura 4 – Esquema da estrutura molecular das RIPs tipo 3. A) Forma imatura (proRIP) da b-32 de milho, mostrando os fragmentos proteoliticamente clivados para a formação da toxina ativa; B) A JIP60 de cevada, com os seus dois domínios distintos: um domínio N-glicosidase e outro de função desconhecida. Em preto destacam-se dois fragmentos que são provavelmente removidos durante a maturação da toxina.



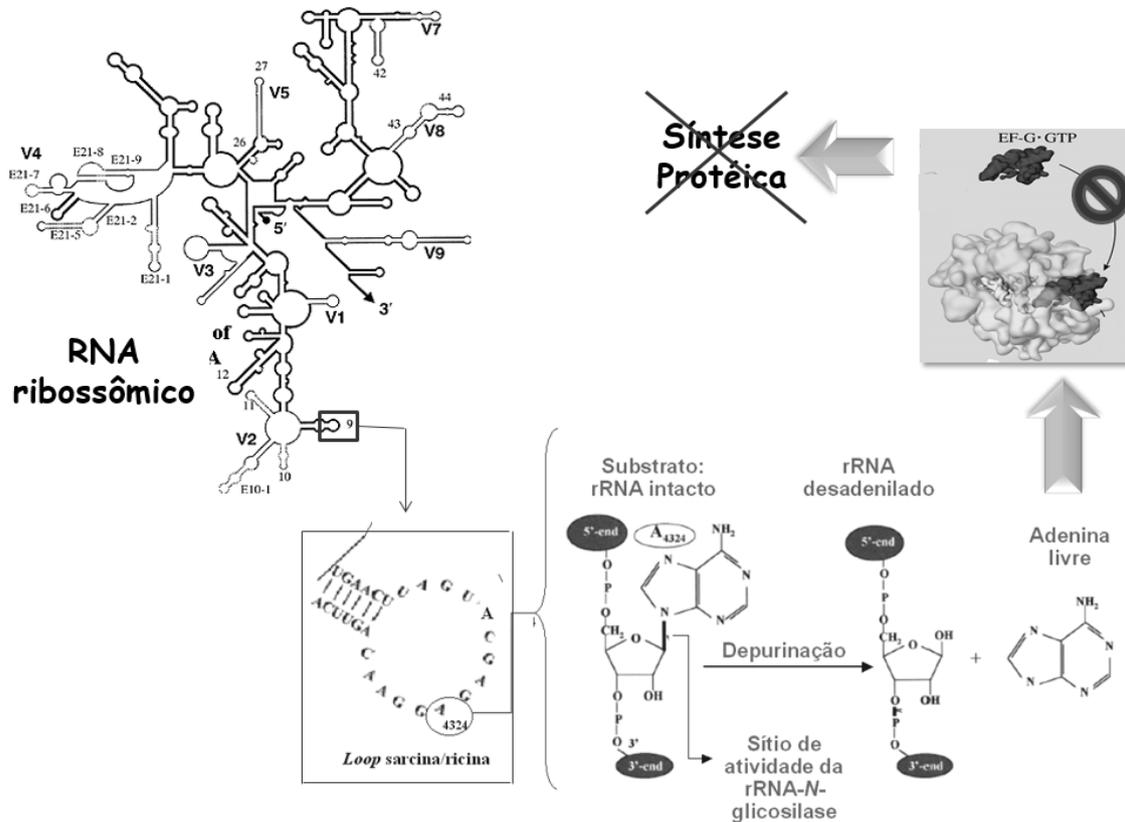
Fonte: Adaptada de Motto e Lupotto (2004)

2.3. Mecanismo de ação e internalização das RIPs.

De acordo com o mecanismo proposto Endo *et al.* (1987a), todos os resíduos de adenina clivados estão localizados em um “loop” (nomeado “loop” sarcina/ricina) de uma região do RNA ribossomal, que possui uma sequência conservada GAGA, sugerindo então, que as RIPs reconhecem esta estrutura específica e clivam no sítio específico A₄₃₂₄ (Figura 5). O efeito direto das RIPs na estrutura e função da célula promove um dano irreversível ao ribossomo, mais precisamente na subunidade 60S, o qual impossibilita a ligação de fatores de alongamento (EF-1 e EF-2) envolvidos na ligação aos aminoacil-t-RNA e na catálise da hidrólise de GTP e translocação, respectivamente, impedindo a síntese protéica. Assim, a “depurinação” evita que estes fatores de alongação se liguem na subunidade ribossomal 60S e, conseqüentemente, levam à inibição da síntese proteica. Atualmente o modelo de Endo é o mais aceito e citado em trabalhos envolvendo RIPs (STIRPE e LAPPI, 2014).

Figura 5 – Representação esquemática do sítio específico de ação das RIPs em ribossomos de ratos. Uma vez dentro das células, as RIPs reconhecem e se ligam a uma sequência conservada GAGA localizada num *loop* da subunidade 28S do RNA ribossomal 60S. Após a ligação, elas catalisam a quebra da ligação N-glicosídica que liga uma adenina (na posição 4324) à ribose. Essa depurinação

promove uma alteração estrutural no ribossomo a ligação dos fatores de alongamento (EF) 1 e 2, inibindo conseqüentemente a síntese proteica.



Fonte: Adaptada de Silva (2005)

Apesar de ser bastante estudado, o mecanismo de entrada das RIPs nas células ainda é alvo de grande especulação. O interesse nesse mecanismo de internalização aumentou devido a esse processo ser um ponto chave na possível utilização terapêutica dessas proteínas. Além disso, estudos desse tipo são de extrema importância para o discernimento do transporte intracelular e da distribuição de ligantes fisiológicos. Atualmente, muitas evidências sugerem que essas toxinas entram e distribuem-se por vias específicas.

A maioria dessas observações está voltada para as RIPs tipo 2 e sugerem que mais de um mecanismo de internalização esteja envolvido (ROBERTUS e MONZINGO, 2004). Segundo Barbieri e colaboradores (1993) a interação RIP-célula parece ser seguida de três fatos comuns: (1) a inibição da síntese proteica geralmente não é detectada nas células antes de 30 minutos; (2) apenas poucas moléculas tóxicas são captadas pelas células e transferidas para o citosol,

alcançando assim o seu alvo; e (3) uma única molécula RIP pode ser suficiente para induzir a morte celular.

A primeira etapa da internalização das RIPs é a interação RIP-célula que consiste na ligação dessas proteínas aos sítios de receptores presentes na superfície da membrana celular. No caso de algumas RIPs tipo 2, esse processo geralmente ocorre à temperatura fisiológica e pode ser suprimido pela adição do açúcar pelo qual a proteína apresenta especificidade (STIRPE e LAPPI, 2014).

O número de sítios de ligação nas células varia bastante para as diferentes RIPs tipo 2. Por exemplo, para a ricina esses sítios foram estimados, podendo ser de 0,2 a 8,0 x 10⁷/célula (VAN DEURS *et al.*, 1985). Um número similar de ligantes foi encontrado para a abrina (CHAN *et al.* 1985). No entanto, as células apresentaram um menor número de sítios (1,0 a 2,0 x 10⁵/célula) para a modicina (GLEESON e HUGHES, 1985).

Como comentado anteriormente, as RIPs 2 são potentes toxinas que possuem atividade lectínica. Essas proteínas podem ser captadas por um maior número de células devido à presença de glicoconjugados na superfície celular. A adição do açúcar ligante ao meio promove uma competição com os receptores da membrana pela toxina, conseqüentemente inibindo a ligação da proteína à membrana e reduzindo drasticamente a toxicidade (PEUMANS e VAN DAMME, 1998).

Outro processo de reconhecimento é a interação de receptores com as cadeias laterais de carboidratos presentes nas proteínas. As cadeias A e B da ricina apresentam grupos de oligossacarídeos contendo manose, os quais são os principais responsáveis pela ligação e toxicidade da proteína em células não parenquimais de fígado de rato (FRIGERIO *et al.*, 1998; MAGNUSSON *et al.* 1991). A ligação da ricina a essas células é inibida na presença de galactose, porém inibida com mais eficiência por manose ou manana, sendo completamente suprimida na presença de ambos os carboidratos (STIRPE e LAPPI, 2014). Isso indica que a ricina pode ligar-se a células não parenquimais através de dois diferentes mecanismos: (1) via sítio de ligação à galactose da cadeia B que se liga a resíduos galactosídicos presentes na membrana celular, e (2) pela presença de resíduos de manose em ambas às cadeias, que são ligados por receptores de manose presentes nas células não parenquimais. O elevado efeito

inibitório da manose sobre a citotoxicidade da ricina, causada nas células não parenquimais do fígado, sugere que esse mecanismo é bastante eficiente. Porém, a ricina entra essencialmente em hepatócitos de rato através da via de reconhecimento galactosídico (LORD *et al.*, 1994).

Até o momento, o mecanismo de internalização das RIPs tipo 1 ainda não foi totalmente elucidado e somente algumas hipóteses foram formuladas sobre esse assunto. Segundo uma dessas hipóteses, por conta da presença de resíduos glicosil nas cadeias laterais de várias RIPs tipo 1, muitas dessas proteínas podem ser internalizadas depois de se ligarem a receptores de carboidratos presentes na superfície da membrana celular (NIELSEN e BOSTON, 2001). As células de exudato peritoneal (PEC) de ratos foram capazes de internalizar a gelonina (uma RIP tipo 1 isolada de sementes de *Gelonium multiflorum*) através dos receptores de manose presentes nessa proteína. Inibidores de manana também foram capazes de se ligarem especificamente aos receptores manosídicos, alterando assim, o padrão de captação da gelonina pelas PEC (MADAN e GHOSH, 1992). Diferentes estudos apontam o fato de que as RIPs também podem ser internalizadas pelo mecanismo de endocitose fase-fluída, a qual permite a entrada de moléculas sem um mecanismo mediador receptor (NIELSEN e BOSTON, 2001; ROBERTUS e MONZINGO, 2004)

Um quarto mecanismo de internalização tem sido proposto para ambas as RIPs e está relacionado à presença de receptores concentrados em invaginações da membrana, denominadas *coated pits* e *uncoated*. Esse é um mecanismo não seletivo, o qual é menos eficiente na captação dessas moléculas quando comparado aos demais. A clatrina é uma proteína fibrosa da superfície celular e que possui a capacidade de promover um mecanismo energético (*coated pits clathrin*), que combinado com a sua flexibilidade, ajuda a vesícula a ser contraída (CROWTHER e PEARSE, 1981; SANDVIG e VAN DEURS, 1999). As RIPs contendo manose podem utilizar esse mecanismo para internalização depois de ligadas a receptores localizados nos *coated pits* (CAVALLARO, 1995; MAGNUSSON, 1991).

2.4. Distribuição das RIPs na natureza.

Nos últimos anos, estudos revelaram que as RIPs estão amplamente distribuídas entre plantas, fungos, bactérias e algas (GIRBÉS *et al.*, 2004; HAUF e CHAKRABORTY, 2003; LIU *et al.*, 2002).

A maioria das RIPs isoladas até o momento são tipo 1. As RIPs tipo 2 foram encontradas em mais de 20 espécies de plantas de diferentes famílias: Euphorbiaceae, Cucurbitaceae, Sambucaceae, Leguminosae, Passifloraceae, Caprifoliaceae, Viscaceae e Liliaceae (GIRBÉS *et al.*, 2004).

As RIPs não estão presentes apenas em sementes, mas também podem ser encontradas em outras partes das plantas (GIRBÉS *et al.*, 2004; STIRPE *et al.*, 1992). Como exemplo dessa distribuição, as RIPs tipo 1 e tipo 2 já foram encontradas em: folhas de *Dianthus sinensis* e de *Poligonatum multiflorum* (CHO *et al.*, 2000; VAN DAMME *et al.*, 2000); raízes de *Mirabilis jalapa* e de *Curcubita foetidissima* (VIVANCO *et al.*, 1999; ZHANG e HALAWIESH, 2003); frutos de *Cucurbita moschata* e de *Sambucus nigra* (WU; GAN; XIA, 2000; CHEN *et al.*, 2002); sementes de *Momordica charantia* e de *Cinnamomum camphora* (PARKASH *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2002); bulbos de *Iris hollandica*, látex de *Hura crepitans* e de *Euphorbia tirucalli* (VAN DAMME *et al.*, 1997; SANTANA *et al.*, 2014). Já as RIPs tipo 3 somente foram detectadas em sementes, como a b-32 de milho e a JIP60 de cevada (WALSH *et al.*, 1991; CHAUDHRY *et al.*, 1994; BECKER e APEL, 1992).

2.5. Propriedades físico-químicas e estruturais das RIPs.

Pesquisas demonstram que as massas moleculares das RIPs variam entre 27 e 31 KDa, tanto para as do tipo 1 como para a cadeia A das RIPs tipo 2. Valores um pouco maiores foram encontrados para a cadeia B das RIPs tipo 2 (BARBIERI *et al.*, 1993)

A maioria das RIPs tipo 1 apresentam um pl básico ($\geq 9,5$), no entanto existem algumas exceções, como é o caso da camphorina (de sementes de *Cinnamomum camphora*) que apresenta um pl de 6,1 (LING *et al.*, 1995). Já a cadeia A das RIPs tipo 2 pode ser ácida ou básica com o pl variando entre 4,6 (no caso da abrina) e 8,6 (no caso de algumas isoformas da ricina) (BARBIERI *et al.*, 1993; FONG *et al.*, 1991).

Com os avanços biotecnológicos, a composição de aminoácidos de um grande número de RIPs já é conhecida (ROBERTUS e MONZINGO, 2004; HARTLEY e LORD, 2004). A cadeia B das RIPs tipo 2, semelhantes às lectinas vegetais, são ricas em aminoácidos ácidos e hidrofóbicos, e possuem uma certa quantidade de aminoácidos sulfurados, como é o caso da abrina e de suas isoformas (HERMAN e BEHNKE, 1981; TAHIROV *et al.*, 1995).

A grande maioria das RIPs conhecidas, são glicoproteínas. Alguns trabalhos relatam que os componentes carboidratos não têm um papel relevante na atividade enzimática das RIPs, pois essa atividade também tem sido observada em algumas proteínas não glicosiladas (DEN HARTOG *et al.*, 2002; QING e QU, 2002; CHAMBERY *et al.*, 2008). Entretanto, esses carboidratos apresentam uma grande importância no processo de endocitose dessas proteínas pelas células. A porção glicídica das diferentes RIPs varia tanto em quantidade como na composição do açúcar (BARBIERI *et al.*, 1993). A gelonina e a cadeia A da ricina podem ser desglicosiladas sem afetarem sua capacidade de inibir a síntese protéica em reticulócitos lisados de coelho. As cadeias A recombinantes da abrina e da ricina, expressas não glicosiladas em *Escherichia coli*, são completamente funcionais (QING e QU, 2002). Os açúcares presentes nas RIPs são geralmente glicose, galactose, manose, fucose, xilose e *N*-acetil D-glicosamina (BARBIERI *et al.*, 1993; FALASKA *et al.*, 1982).

Até o início dos anos 90, a ricina era a única RIP que tinha a estrutura tridimensional resolvida em detalhe por difração de raios-X (MONTFORT *et al.*, 1987; KARZIN *et al.*, 1991; HARTLEY *et al.*, 1996), apesar dos estudos cristalográficos com RIPs tipo 2 datarem de 1973. A partir da referida data, várias outras RIPs têm sido cristalizadas e suas estruturas resolvidas pela mesma técnica (ROBERTUS e MONZINGO, 2004). Como exemplo, a abrina-a, que apresentou um cristal cujos dados estruturais foram obtidos com uma resolução de 2.14 Å (TAHIROV *et al.*, 1995). Esse estudo mostrou que o sítio ativo (na cadeia A) da abrina é composto por cinco resíduos invariantes (Tyr₇₄, Tyr₁₁₃, Glu₆₄, Arg₁₆₇ e Trp₁₉₈) e cinco resíduos conservados (Asn₇₂, Arg₁₂₄, Gln₁₆₀, Glu₁₉₅ e Asn₁₉₆). Estudos envolvendo o alinhamento da sequência de aminoácidos também revelaram que todos esses resíduos são extremamente conservados em diversas RIPs (KARZIN *et al.*, 1991; FUNATSU *et al.*, 1991). Análises

cristalográficas das estruturas da ricina, tricosantina, PAP, momordina e abrina-a mostraram uma elevada identidade estrutural entre os sítios ativos dessas proteínas. Porém, a estrutura fina incluindo a orientação de algumas cadeias laterais, o número de moléculas de água e de pontes de hidrogênio pode variar consideravelmente (TAHIROV *et al.*, 1995).

2.6. Atividades e potencial biotecnológico das RIPs

Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) exibem importantes propriedades antivirais de amplo espectro, sendo poderosas armas contra vírus de animais, plantas e fungos. RIPs inativam os ribossomos da célula hospedeira, levando à inibição da tradução da proteína viral e morte desta célula. A atividade enzimática das RIPs não se limita à depurinação do RNA ribossomal (rRNA), além disso eles podem depurinar DNA viral, assim como RNA. A investigação antiviral tem o foco sobre a capacidade de RIPs de agir contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (KAUR *et al.*, 2011; PURI, 2010), mas elas também têm ação contra os vírus da hepatite B e da herpes (BOURINBAIAR; HUANG, 1996; FAN *et al.*, 2009; HE; GUO; PAN, 2008).

Outra aplicação biotecnológica das RIPs faz uso das suas propriedades antimicrobianas, tanto antifúngica como antibacteriana. Estas aplicações direcionam-se à melhoria de culturas agrônômicas, uma vez que o gene de uma RIP com estas atividades pode ser inserido em espécies de interesse agrônômico, tornando-as resistentes a microrganismos. A expressão induzida de um RIP de *Phytolacca heterosepala* e de aspargos (*Asparagus officinalis*) causou aumento de resistência das plantas de tabaco frente aos fungos *Alternaria alternate* e *Botrytis cinerea* (CORRADO *et al.*, 2005). RIPs foram altamente eficazes na inibição do crescimento de *Trichoderma reesei* e *Fusarium sporotrichioides* (patógeno de cevada), *Rhizoctonia solani* (patógeno de batata) e *Botrytis cinerea* (patógeno de ervilha) (BARBIERI *et al.*, 1993), e podem ser usadas como ferramenta para produção de plantas resistentes a estes fungos. Há possíveis diferenças tanto na atividade das diferentes RIPs quanto na sensibilidade das espécies fúngicas em relação a elas. Mais duas proteínas avaliadas como RIPs, oriundas dos cogumelos *Hypsizygus marmoreus* e *Lyophyllum shimeji*, têm se mostrado ativa contra fungos (LAM; NG, 2001).

Já é sabido que as RIPs são, geralmente, mais tóxicas para células tumorais do que para células normais. É sugerido que essas proteínas sejam mais prejudiciais para células neoplásicas porque essas células possuem uma alta taxa de síntese de proteínas resultado de sua proliferação ativa e também porque são mais suscetíveis a toxinas (STIRPE; BATTELLI, 2006). Em geral células tratadas com RIPs exibem eventos relacionados com a morte celular programada, porém o mecanismo de indução dessa morte celular não é bem entendido. Um dos mecanismos pelo qual essas proteínas induzem apoptose é através da alteração de uma via mitocondrial dependente de caspase gerando perda do potencial de membrana da mitocôndria, liberação rápida de citocromo c, ativação de caspases e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (NARAYANAN *et al.*, 2005). MAP30 mostrou efeito antitumoral contra determinadas linhagens de células cancerígenas originárias de câncer de rins, pulmão e de mama. Também foi estudado o efeito antitumoral de MAP30 recombinante contra diversas linhagens tumorais. Os efeitos antitumorais de MAP30 nativa e recombinante foram idênticos no que diz respeito a sua sensibilidade a tipos particulares de tumores (PURI *et al.*, 2009). Foi mostrado recentemente que a RIP Tricosantina (TH-R) foi capaz de induzir a apoptose de células de câncer de fígado HEPG2 e que esse efeito foi potencializado pelo glicocorticoide dexametasona (LI *et al.*, 2010). Aralina uma RIP tipo 2 extraída da planta *Aralia elata* induz apoptose seletivamente em vários tipos de células de tumores humanos sendo muito mais tóxica para células cancerígenas em comparação com células não-cancerígenas. É sugerido que a aralina afeta a atividade de uma proteína caspase-1 que participa em processos apoptóticos dessa forma a RIP consegue afetar as células cancerígenas induzindo a morte celular (TOMATSU *et al.*, 2003). Visto isso nota-se a importância dessas proteínas na terapia do câncer.

Outra aplicação biotecnológica das proteínas inativadoras de ribossomos é a construção de imunotoxinas através da ligação dessas proteínas geralmente a anticorpos monoclonais ou seus fragmentos. O anticorpo liga especificamente ao antígeno na superfície da célula alvo e o conjugado é internalizado por endocitose. A RIP é então translocada para o citosol e mata a célula através da inibição da síntese proteica e indução de apoptose. RIPs tipo 2 isoladas de

algumas espécies do gênero *Sambucus* se mostraram bons candidatos como componentes tóxicos na construção de imunotoxinas e conjugados sendo aplicados para direcionamento contra alvos específicos. No trabalho, nigrina b e ebulina 1 foram conjugadas com transferrina e anti-CD105 para atingir alvos como o receptor de transferrina ou células superexpressando endoglin, essas imunotoxinas mostraram-se altamente seletivas para células tumorais indicando importantes aplicações (FERRERAS *et. al.*, 2011).

Moschatina uma RIP tipo 1 extraída de sementes de abóbora (*Cucurbita moschata*) foi utilizada para a construção de uma imunotoxina Moschatina-NG74 e testada quanto a sua toxicidade contra células de melanoma humano, como resultado se verificou que a imunotoxina era bastante eficiente no direcionamento e na indução de morte nas células tumorais (XIA *et. al.*, 2003).

Tran *et. al.* (2013) estudaram a expressão heteróloga de uma imunotoxina no sistema de expressão *Chlamydomonas reinhardtii*. Utilizando-se técnicas de biologia molecular foi realizada a fusão de um gene codificante para um anticorpo que reconhece o tipo de célula CD22 com o gene da gelonina, uma proteína inativadora de ribossomos presente em sementes de *Gelonium multiflorum*, como resultado se obteve que as imunotoxinas produzidas eram bastante efetivas contra todas as linhagens de células tumorais testadas. Pirie *et. al.* (2011) mostrou que a expressão recombinante dessa imunotoxina em bactéria mostrou-se altamente eficiente na redução da viabilidade de células cancerígenas alvo. Saporina-S6 é uma RIP tipo 1 extraída de sementes de *Saponaria officinalis* que tem sido extensivamente utilizada para a construção de diversos conjugados com atividade anticâncer. A alta eficácia desses conjugados é frequentemente reportada em muitos modelos de tumores hematológicos. As imunotoxinas baseadas em saporina também foram testadas contra tumores sólidos com resultados interessantes, sendo geralmente mais eficientes do que outras drogas testadas. Estudos clínicos mostraram a aplicação dessas imunotoxinas em terapia de linfoma. Juntos, esses estudos mostraram que as imunotoxinas baseadas em saporinas são quase sempre agentes muito poderosos *in vitro* e mantem bom efeito antitumoral *in vivo* (POLITO *et. al.*, 2011). Os dados mostrados aqui indicam que esses conjugados RIPs anticorpos tem diversas aplicações terapêuticas de alta importância sendo considerados importantes produtos biotecnológicos.

Muitos estudos têm sido realizados na aplicação das RIPs no desenvolvimento de novos compostos de interesse para a agricultura devido a toxicidade dessas proteínas contra insetos e fitopatógenos. Muitas RIPs estão envolvidas em mecanismos de defesa das células vegetais devido a sua capacidade de interromper a síntese proteica em situações fisiológicas apropriadas e seu envolvimento nos processos de regulação metabólica (RAJ; VENNILA, 2011). Especificamente na aplicação de RIPs na agricultura utiliza-se a tecnologia do DNA recombinante para introduzir o gene de uma RIP de outra planta ou para manipular os níveis de RIPs endógenas. Uma proteína inativadora de ribossomos extraída de *Phytolacca americana* foi expressa em tabaco e a planta transgênica mostrou aumento da resistência contra vírus em diversos casos (LODGE *et. al.*, 1993). Muitas RIPs, como por exemplo ricina e saporina mostraram alta toxicidade contra larvas de insetos e, devido a isso, várias pesquisas têm sido realizadas no intuito de verificar se a transfecção dos genes codificantes para RIPs podem proteger as plantas contra a infestação de insetos, os resultados obtidos por esses estudos têm sido bastante promissores porque normalmente se observa o aumento da resistência das plantas a insetos em diversos casos (STIRPE, 2013). Aumento de resistência a insetos também foi conseguido pelo aumento da expressão de uma RIP endógena em milho (DOWD *et. al.*, 2012). Em uma abordagem mais recente se verificou que a expressão de uma RIP de cevada em amoreira aumentou a resistência da planta contra seca, salinidade e frio (CHECKER *et. al.*, 2011). Isso mostra através de um ponto de vista prático que o aumento da expressão de RIPs em plantas transgênicas deixá-las mais resistentes a infecções, infestações e estresses abióticos, com consideráveis vantagens econômicas se os resultados forem confirmados em campo (STIRPE, 2013).

3. Curcina

O pinhão-mansão (figura 6) é uma espécie perene, pertencente à família das Euforbiáceas, a mesma da mamona, mandioca e seringueira (DIAS *et al.*, 2007; DHYANI *et al.*, 2011). Embora várias evidências indiquem que o pinhão-mansão não é originário do Brasil (ROSADO *et al.*, 2010), a planta vegeta espontaneamente em diversas regiões do país há muito tempo. Apesar de serem

ricas em proteínas, até o momento, o seu uso está impossibilitado devido à presença de fatores tóxicos, dentre eles a curcina (GONÇALVES *et al.*, 2009; DURÃES *et al.*, 2011).

Figura 6 – Pinhão-mansó (*Jatropha curcas* L.) e suas partes vegetativas.



Fonte: Adaptada do autor.

A curcina é uma RIP tipo 1 presente nas sementes de *J. curcas* (STIRPE *et al.*, 1976). Essa RIP é uma glicoproteína que representa 20% das proteínas solúveis totais de sementes, sendo capaz de inibir fortemente a tradução em células livres obtidas a partir do lisado de reticulócitos de coelho apresentando um IC₅₀ de 0,19 nmol/L. Quando administrada por via oral e por injeção intraperitoneal em ratos, curcina de sementes apresentou uma DL₅₀ (dose letal média) de 104,7 ± 29,4 mg/kg e 67,2 ± 10,4 mg/kg, respectivamente, confirmando a toxicidade aguda da proteína (LIN *et al.* 2010). Esses dados reforçam o fato de que mesmo após a extração do óleo das sementes de variedades não

comestíveis de pinhão-mansão, a utilização do resíduo para a alimentação animal só é viável se a curcuma for inativada.

Estudos mostraram que variedades *J. curcuma* possuem uma família de genes que codificam para 4 isoformas da curcuma (HARTLEY e LORD, 2004). Pesquisadores chineses identificaram e caracterizaram dois genes da curcuma, dos quais um é altamente expresso em sementes (LIN *et al.*, 2003) e o outro é expresso em folhas, mas apenas sob condições de estresse (WEI *et al.*, 2005). Estes dois genes foram denominados *CURCIN1* e *CURCIN2*. Outro gene denominado *CURCIN3* codifica uma terceira isoforma que só foi detectado em folhas e sementes quiescentes de uma variedade comestível mexicana de *J. curcuma*. Um quarto gene (*CURCIN4*) também foi identificado somente em folhas de uma variedade não comestível de *J. curcuma* encontrada na Tanzânia.

As massas moleculares da curcuma e de suas isoformas podem variar de 29,5 a 30,9 kDa, assim como os pIs que variam de 8,3 a 4,8. Com relação a sequência de aminoácidos, o número de resíduos varia de 265 a 281 (HE *et al.*, 2011). De acordo com os dados obtidos nas análises de difração circular, a estrutura secundária da curcuma é constituída predominantemente por folhas- β (LIN *et al.*, 2010).

Em 2003, DNA genômico e o cDNA da curcuma de sementes foi clonado por LIN e colaboradores. A sequência ORF (fase de leitura aberta) que codifica o curcuma foi usada para produzir a proteína recombinante em *E. coli*. No entanto, a atividade catalítica da curcuma recombinante foi menor do que a da proteína nativa (WEI *et al.*, 2005; LOU *et al.*, 2006).

Ao longo dos anos as pesquisas com a curcuma têm apresentado várias abordagens. Um exemplo, é a utilização dessa RIP como modelo em estudos contra o câncer em células de animais (LUO *et al.*, 2006). No entanto, abordagens básicas como o estudo do comportamento bioquímico da curcuma durante os diferentes estágios de desenvolvimento da planta e dos seus órgãos sob condições naturais ou controladas, ainda são escassas.

OBJETIVO

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade do aproveitamento da torta residual de sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para a obtenção da forma bioativa da curcina, uma RNA-*N*-glicosidase com potencial biotecnológico.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar um protocolo de extração de proteínas da torta residual de sementes de pinhão-manso;
- Otimizar o processo de isolamento e purificação da curcina a partir da torta residual de sementes de pinhão-manso;
- Avaliar a integridade e o grau de pureza da curcina obtida da torta residual de sementes por métodos bioquímicos e biofísicos;
- Avaliar as atividades biológicas (RNA-*N*-glicosidase; toxicidade e inibição da síntese proteica) da curcina isolada da torta residual de sementes;
- Produzir anticorpos policlonais anti-curcina para os testes de imunodeteção;
- Avaliar a eficiência de interação do anticorpo anti-curcina com a curcina da torta residual através de técnicas de imunodeteção;

MATERIAIS

4. Materiais

4.1. 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 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, secadas e armazenadas na geladeira até o uso.

4.2. Animal

Foram utilizados camundongos Swiss, machos e sadios, pesando em média entre 25 e 30 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos em repouso por no mínimo 24 horas em caixas de plásticos forradas com serragem e de livre acesso à ração e água. Também foram utilizados 3 coelhos albinos (raça Nova Zelândia) adultos e sadios obtidos do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia-UFC, mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, em gaiolas apropriadas de livre acesso à ração e água.

A linhagem de *Pichia pastoris* usada foi a KM71.

4.3 Reagentes

Cloreto de sódio; corantes (*Coomassie brilliant blue*); albumina sérica bovina; acrilamida; bis-acrilamida; adjuvante completo e incompleto de Freund's; acetona; 2-mercaptoetanol; tampão fosfato de sódio (PBS); fenol; anticorpos primários e secundários; metanol; matriz cromatográfica de proteína A; Sephadex G-100; Tris [2-Amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol]; ácido clorídrico; ácido acético; sulfato de amônio e outros reagentes de grau analítico.

MÉTODOS

5. Métodos

5.1. Preparação da torta residual das sementes de pinhão-manso.

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. Após a presagem para remoção do óleo, a torta foi submetida ao processo de secagem por 15 dias em estufa, a temperatura de 37 °C. Após esse período, a torta seca foi submetida à delipidação com hexano (1:5 p/v) por 12 horas, com trocas a cada 3 h. Após a delipidação, amostra foi submetida a secagem por mais 12 h, à temperatura ambiente. Em seguida, o material delipidado foi triturado e peneirado até a obtenção de uma farinha fina e homogênea. Essa farinha foi acondicionada em tubos Falcon hermeticamente fechados e armazenada até a realização das análises previstas no trabalho.

5.2. Obtenção do extrato protéico a partir da farinha da torta de pinhão-manso.

O extrato protéico da torta foi obtido com tampão PBS pH 7,2 (1:10, p/v) sob agitação constante, por 4 horas e a temperatura ambiente (25 °C). Após esse período, o extrato foi centrifugado a 12000 x g, por 20 min e a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante (denominado extrato bruto da torta ou EB_t) foi filtrado e armazenado à -20 °C para ser utilizado nas demais etapas.

5.3. Precipitação das proteínas do EB com sulfato de amônio.

O EB_t foi submetido à precipitação com sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, utilizando 60% de saturação conforme a metodologia utilizada por Lin *et al.* (2010). O EB_t saturado foi mantido em repouso por 6 h à 5 °C e, em seguida, centrifugado a 12000 x g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi coletado, solubilizado com PBS pH 7,2, dialisado por 12 h contra água destilada e por mais 4 h com o mesmo tampão PBS. Esse solubilizado (denominado de Fração 0/60) foi submetido a dosagem de proteínas.

5.4. Dosagem de proteínas da Fração 0/60.

As dosagens de proteínas da fração 0/60 da torta foi realizada conforme o método de Bradford (1976), utilizando a albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

5.5. Purificação da curcina da Fração 0/60 da torta por cromatografia de exclusão molecular.

A fração 0/60, obtida conforme descrito no item 5.3, foi aplicada em coluna de Sephadex G-100 (0.8 X 100 cm), previamente equilibrada 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. As frações cromatográficas foram coletadas, quantificadas em espectrofotômetro pela medida da absorbância a 280 nm e analisadas por ensaios eletroforéticos (SDS-PAGE).

5.6. 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 protéicas 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*®.

5.8. 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 10 ng da fração referente ao pico cromatográfico 4 (obtido conforme o item 5.5), num volume final de 500 µL. A reação foi interrompida pela adição de SDS 1%. O RNA ribossomal foi obtido através da extração com fenol-clorofórmio e precipitado pela 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 xg 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 adição de 0,1 volume de NH₄OAc 2 M, 2,5 volumes de etanol 100% e centrifugadas a 15000 rpm 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 ultravioleta (UV) do transluminador.

5.7. Dicroísmo circular e termoestabilidade da curcina obtida da torta de sementes (CTS).

A avaliação do padrão conformacional da CTS 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 de amostra proteica (contendo aproximadamente 20 µg da CTS em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,2 com NaCl 150 mM). 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 190 a 250 nm aplicando a velocidade de 50 nm/min, registrando 8 acumulações.

A termoestabilidade da CTS também foi avaliada por CD, utilizando um intervalo de temperatura de 10 a 80 °C. 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®*

5.9. Toxicidade aguda da CTS.

Para avaliar a toxicidade aguda, diferentes doses pré-estabelecidas da CTS foram injetadas na cavidade intraperitoneal de camundongos (5 animais para cada dose) sendo observadas as sintomatologias e o tempo de sobrevivência. A mortalidade foi expressa em termos de DL₅₀ sendo esta definida como a quantidade de proteína (mg de proteína/Kg de peso corpóreo) capaz de matar 50% dos animais testados.

5.10. Ensaio de inibição da síntese protéica em sistema livre de células.

A capacidade da CTS de inibir a síntese de proteínas foi utilizando o kit *TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems* (Promega). O funcionamento desse kit baseia-se na medida da expressão *in vitro* da proteína repórter luciferase num sistema livre de células e que tem a vantagem de ter acopladas as etapas de transcrição e de tradução gênica num extrato celular eucarioto. Portanto, esse sistema pode ser aplicado para avaliar a capacidade inibitória *in vitro* da síntese protéicas das RIPs. Neste ensaio, diferentes concentrações da FRC_T foram usadas. Como controle positivo da reação da luciferase, apenas água ultrapura (MilliQ) foi adicionada a reação. Como controle positivo da reação de inibição, foi utilizada a ricina (RIP tipo 2 de *Ricinus communis*) comercial. As reações contendo a FRC_T, 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/s (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.

5.11. Produção de anticorpos policlonais anti-CTS.

Os anticorpos policlonais anti-CTS foram produzidas em um coelho macho adulto, da raça Califórnia (com 8 meses de idade). Para a imunização inicial, foi utilizado uma dose de 50 µg da CTS. Antes da imunização, o animal foi submetido a uma primeira sangria para coletar o soro controle (pré-imune). A sensibilização inicial foi feita por via intramuscular, na parte interna da coxa do animal, com uma

emulsão contendo a proteína e o adjuvante completo de Freund (1:1; v/v). Após 15 dias, foi administrada subcutaneamente, no dorso, uma dose-reforço de igual conteúdo proteico emulsionado com adjuvante incompleto de Freund (1:1; v/v). Após 21 dias, uma nova sangria foi realizada e sangue coletado foi mantido em repouso por 1 h a 37 °C para obtenção soro. Esse soro foi então centrifugado a 4.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi coletado e submetido à precipitação com sulfato de amônio com 33 % de saturação, para obtenção da fração rica em imunoglobulinas (IgG). Esta fração foi posteriormente submetida à diálises sequenciais com água ultrapura e tampão acetato 50 mM a pH 5,0, alternadamente (3X). A fração dialisada foi centrifugada a 15.000 rpm por 20 min (a 4 °C) e o precipitado descartado. O sobrenadante (contendo os anticorpos anti-curcina) foi submetido a purificação de imunoglobulinas (IgGs) por cromatografia de afinidade em Sepharose-Proteína A. A fração de IgGs (anti-CTS) purificada na coluna de afinidade foi dialisada e concentrada por dialofiltração para ser utilizada nos ensaios de imunodeteção

5.12. Ensaio de imunodeteção da curcina de sementes utilizando o anticorpo anti-CTS.

Para esse ensaio foi utilizada a técnica de *Western blotting*. Inicialmente, a curcina de sementes e a CTS 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-CTS). Após esse tempo, a membrana foi lavada (3X) 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.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

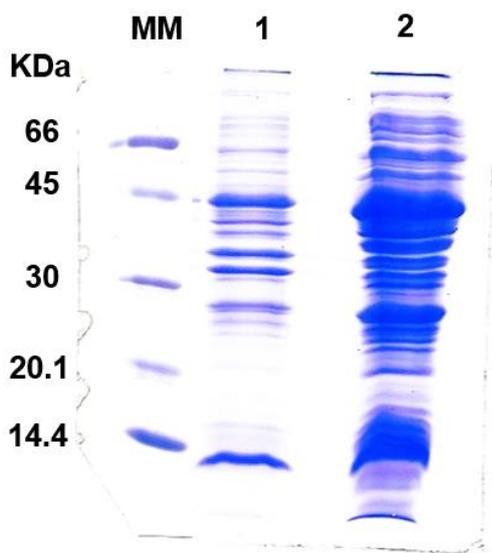
6. Resultados e discussões

Após os processos de prensagem das sementes e delipidação da torta residual de sementes de pinhão-manso utilizadas neste trabalho, o rendimento da farinha produzida foi de $93,8 \pm 0,4$ g por 100 g de resíduo da torta. A determinação de proteínas solúveis da torta mostrou que a fração precipitada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% (denominada Fr0/60) apresentou um conteúdo proteico de 1,8 mg/g da fração precipitada. Lin *et al.* (2010) obtiveram um valor menor (1,17 mgProteína/g da fração proteica precipitada) nas mesmas condições, quando analisaram o teor proteico da farinha de sementes pelo método de Lowry *et al.* (1951). Devappa e Swamylingappa (2008), ressaltaram que uma característica marcante das sementes de *J. curcas* (pinhão-manso) é o elevado teor de proteína bruta.

A diferença de resultados entre ensaios de quantificação proteica da torta e das sementes pode ter ocorrido por que o método de Bradford (1976) é mais sensível e está sujeito a bem menos interferentes que o método de Lowry *et al.* (1951). O sulfato de amônio, usado na precipitação de proteínas, é um interferente no método de Lowry *et al.* (1951) e pode ter sido, também, um motivo de um menor valor de concentração proteica quando este método foi usado. O sulfato de amônio, na concentração maior que 15%, diminui a absorvidade devido ao aumento do pH (alcalinização) da amostra (LOWRY *et al.*, 1951; FRYER *et al.*, 1986).

Alíquotas, tanto do extrato bruto (EB_t) quanto da fração Fr0/60 da torta, foram submetidas a eletroforese (PAGE-SDS) para comparar o perfil proteico das duas amostras. Conforme pode ser observado na figura 7, fica evidente que o fracionamento com sulfato de amônio permite uma concentração significativa das proteínas presentes no EB_t de sementes de pinhão manso.

Figura 7 – Análise eletroforética (SDS-PAGE 15%) do extrato bruto da farinha da torta de sementes de pinhão-manso e da fração proteica precipitada com sulfato de amônio. MM – Marcadores moleculares; coluna 1 – Extrato protéico bruto; colunas 2 – Fração proteica saturada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60%. Foram aplicadas no gel, 20 μL de cada amostra analisada.

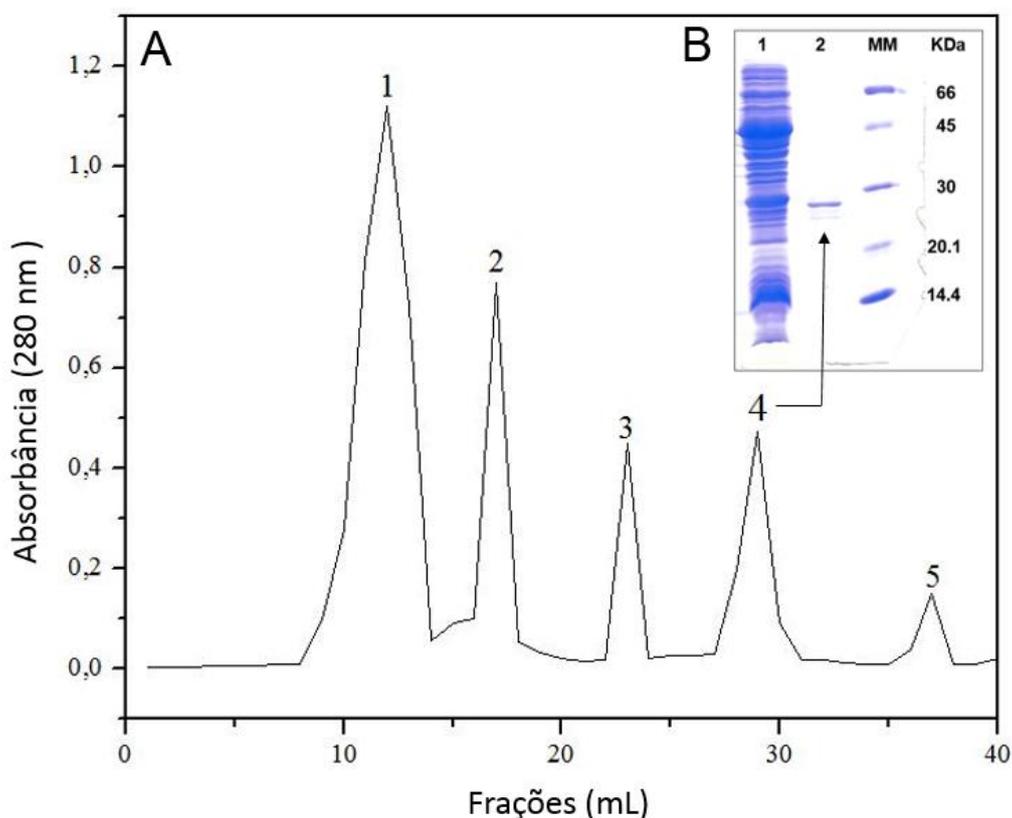


Fonte: Elaborada pelo autor (2015)

Quando submetida a cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-100, a fração 0/60 apresentou cinco picos proteicos bem distintos (Figura 8A). A eficiência dessa etapa cromatográfica na separação das proteínas foi melhor do que a utilizada por Lin *et al.* (2010), o quais, utilizando a mesma matriz cromatográfica, observaram a presença de apenas dois picos proteicos.

As frações correspondentes aos picos cromatográficos foram coletadas e analisadas separadamente por eletroforese e quanto à presença de atividade RNA *N*-glicosidase. Somente a fração proteica correspondente a ao pico cromatográfico 4 apresentou uma única banda de peso molecular aparente de 28 KDa (Figura 8B), correspondente ao valor de peso citado na literatura para a curcina (STIRPE *et al.*, 1976). Essa fração foi analisada quanto a atividade RNA *N*-glicosidase, característica das RIPs. As outras frações foram descartadas por apresentarem bandas contaminantes e por não terem o peso molecular esperado para curcina de sementes (dados não mostrados).

Figura 8 - Isolamento e análise eletroforética da curcina da torta de sementes de pinhão-mansão. (A) Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex-G100: A coluna foi equilibrada e eluída com o PBS pH 7,2. A cromatografia foi realizada numa coluna de 70 mL, utilizando um fluxo de 1 mL/min e coletando frações de 2 mL. (B) Análise eletroforética feita sob condição redutora em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS. Aliquotas de 15 μ L da fração Fr0/60 e da fração 4 foram aplicadas no gel.

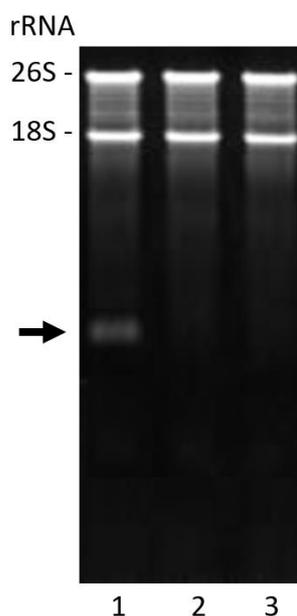


Fonte: Elaborada pelo autor (2015)

Na avaliação da atividade RNA *N*-glicosidase *in vitro*, a fração referente ao pico cromatográfico 4 foi incubada com ribossomos isolados de levedura (*Pichia pastoris*). Em seguida o RNA ribossomal (RNAr) foi extraído e tratado com anilina. Como resultado, 10 μ g dessa fração foi capaz de depurinar o RNAr (Figura 8). 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; Van Damme *et al.*, 2001). 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 (SMITH *et al.*, 2003). De acordo com a figura 9, a amostra tratada com a FRC_T apresentou uma banda similar ao fragmento de Endo liberado da subunidade 26S do rRNA de levedura e detectado após o tratamento com anilina. Este fragmento não foi detectado nas amostras controle (contendo apenas o RNAr e o RNAr tratado somente com a anilina). Esses resultados confirmaram que a fração referente ao pico cromatográfico 4 é rica em curcina ativa. Essa fração passou a ser representada pela abreviatura CTS (curcina da torta de sementes).

Figura 9 - Análise da atividade RNA *N*-glicosidase da CTS através de eletroforese em gel de agarose/formamida. Colunas: 1) RNA ribossomal de levedura (*Pichia pastoris*) incubado com 10 µg da CTS; 2) RNA ribossomal incubado apenas com anilina; 3) RNA ribossomal sem tratamento (controle negativo). A seta indica o fragmento de Endo liberado e detectado após o tratamento com RIP e a anilina.



Fonte: Elaborada pelo autor (2015)

Para avaliar toxicidade aguda da CTS, diferentes doses da proteína foram injetadas na cavidade intraperitoneal de camundongos adultos e os resultados

foram expressos como dose letal média (DL₅₀). Conforme demonstrado na tabela 1, após 48 h de ensaio, a dose equivalente a 60 mg de proteína/Kg de peso corpóreo do animal foi capaz de matar 50% dos animais. Esse resultado foi similar ao obtido por Lin *et al.* (2010) que estabeleceram uma DL₅₀ de aproximadamente 67 mg/Kg. Esses resultados reforçam a característica de que as RIPs tipo 1, geralmente apresentam uma toxicidade para mamíferos, bem menor que as das RIPs tipo 2, cujas doses letais para ratos ficam na ordem de µg/Kg. Foi observado também que os animais testados apresentaram os seguintes efeitos da intoxicação: diarreia, olhos semi-fechados, pêlos eriçados e hipoatividade. Segundo Batelli e colaboradores (2004), esses sintomas são bastante comuns em casos de intoxicação com RIPs.

Tabela 1 – Toxicidade aguda determinada através de injeção intraperitoneal em camundongos, utilizando diferentes doses da CTS.

Dose (mg.kg ⁻¹)*	Mortalidade(%)
100	100
80	100
60**	50
40	30
20	-

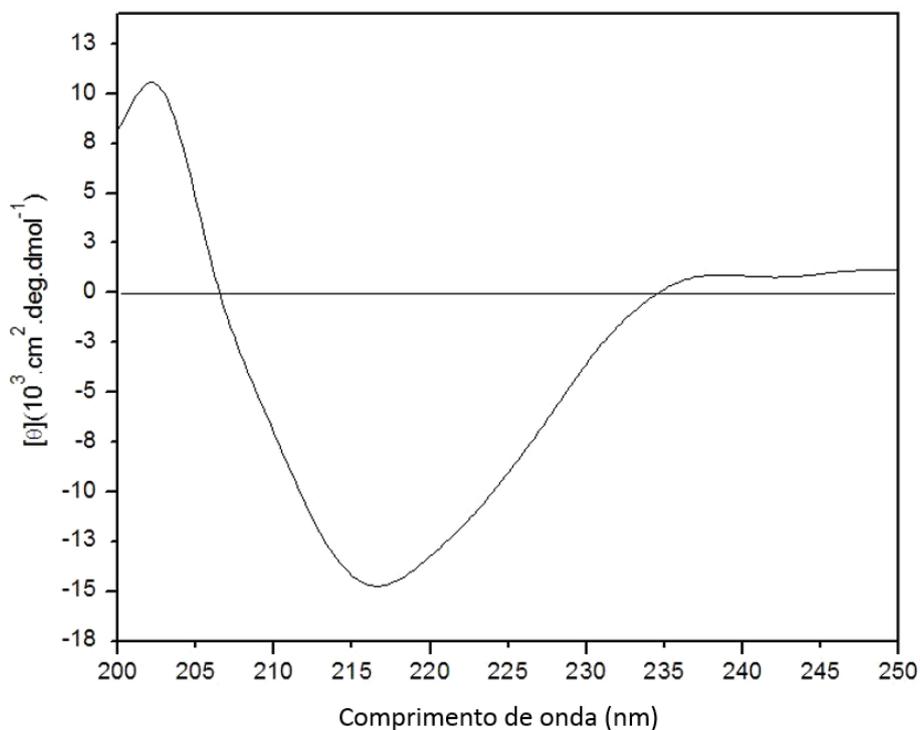
*mg de proteína por Kg de peso corpóreo animal

**DL₅₀: dose letal capaz de matar 50% dos animais testados

Para avaliar a integridade conformacional em termos de estrutura secundária, a CTS foi analisada por espectrofotometria de dicroísmo circular (CD). A CTS apresentou um padrão conformacional característico de enovelamento proteico e com predominância de estruturas folhas-β (44,2 %), representado pela presença de uma banda negativa com mínimo em 217 nm, e uma banda positiva em torno de 200 nm (Figura 10). Esse resultado reforça aquele obtido no ensaio da atividade RNA-*N*-glicosidase, quando se relaciona estrutura e função. Os dados de CD obtidos da variação térmica foram analisados assumindo-se que este é um processo irreversível de dois estados (nativo e desnaturado) (ARROYO-REYNA e HERNANDEZ-ARANA, 1995). A curva de

transição foi determinada em função da temperatura, monitorando-se o ponto em 217 nm. Como resultado, foi constatado que a CTS manteve sua estrutura praticamente estável até 40 °C. No entanto, mudanças significativas foram observadas a partir da temperatura de 50 °C, sugerindo a perda de estrutura secundária e conseqüentemente a desnaturação da proteína. O ensaio de termoestabilidade da CTS também demonstrou que essa RIP apresenta uma temperatura de *melting* em torno de 65 °C (Tabela 2). O fato da curcina ser uma proteína monomérica (SRIVASTAVA *et al.*, 2012), glicosilada e por ligação dissulfeto intracadeia, pode ser o motivo dessa termoestabilidade.

Figura 10 – Espectro de dicroísmo circular da CTS. As medidas foram realizadas com uma solução protéica de aproximadamente 20 µg de CTS em 100 µL de PBS 5 mM pH 7,2 contendo NaCl 0,2 M. Os espectros foram obtidos variando o comprimento de onda entre 200 a 250 nm e registrados como uma média de 8 varreduras, a temperatura ambiente (25 °C), utilizando cubeta retangular de caminho óptico de 1 mm.



Fonte: Elaborada pelo autor (2015)

Tabela 2 – Predição da estrutura secundária e da temperatura de transição (*melting*) da CTS.

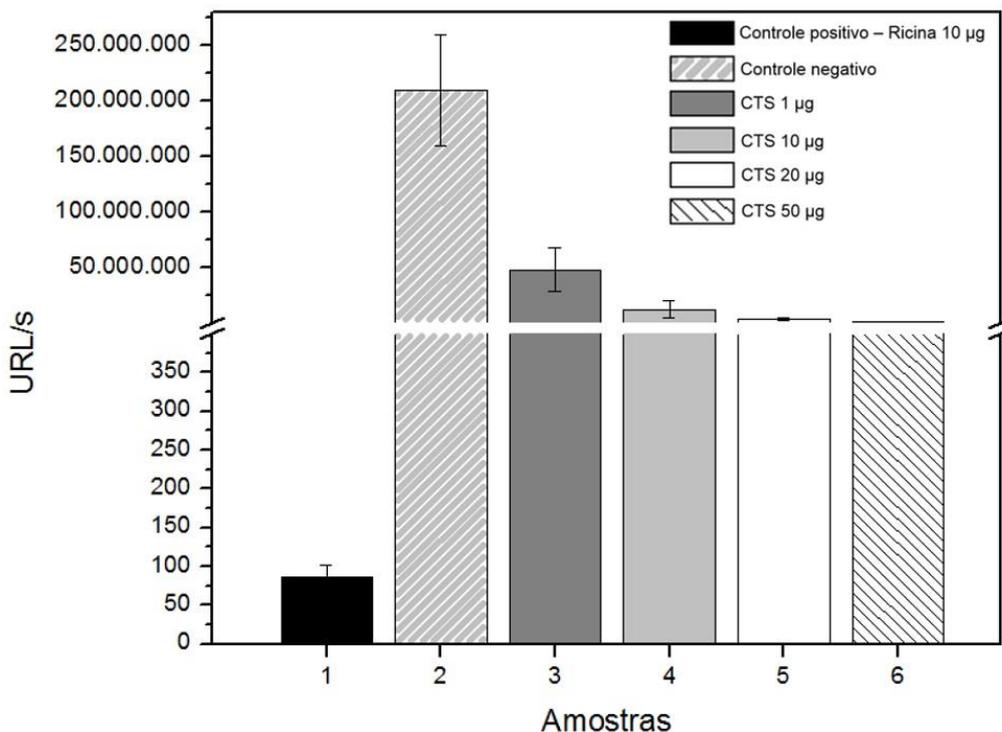
Estrutura secundária	(%)
Folhas- β	44,2
Hélices- α	22,4
Voltas	23,1
Não ordenadas	10,1
*T _m (°C)	65

*Temperatura de *Melting* calculada com base no monitoramento do ponto em 217 nm dos espectros de CD da CTS obtidos em diferentes valores de temperatura.

A capacidade da CTS de inibir a síntese proteica foi avaliada *in vitro* utilizando sistema acoplado de transcrição-tradução da luciferase, livre de células, denominado *TNT Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega). A vantagem desse sistema é acoplamento do processo de transcrição gênica 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. De acordo com os resultados obtidos, a CTS apresentou maior inibição da síntese proteica da luciferase nas concentrações de 20 e 50 μg (Figura 11). Pesquisas mostram que as RIPs apresentam uma variação na sua capacidade de inativar a síntese proteica *in vitro* e que esta 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). Isso pode ser comprovado quando os resultados da CTS são comparados com os do controle positivo, no qual foi utilizado 10 μg de ricina. Apesar da notável diferença de atividade entre as duas RIPs, esses resultados mostram que a CTS se encontra na sua forma bioativa e capaz de inibir a síntese proteica *in vitro*.

Figura 11 – Ensaio da inibição da síntese proteica promovida pela CTS em sistema livre de células (TNT® *Coupled Reticulocyte Lysate System*). Na ausência das RIPs (coluna 2, controle negativo) o gene repórter da luciferase é

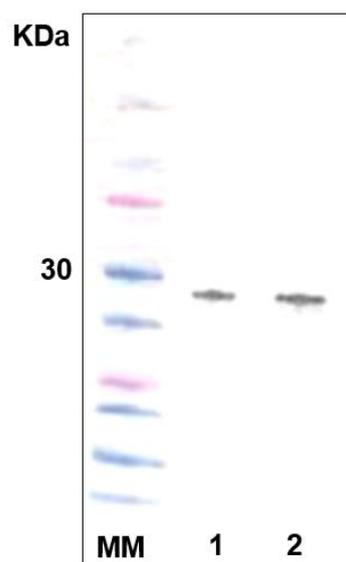
expresso normalmente e a sua atividade pode ser quantificada em URL/s (unidades relativas de luz por segundo, emitidas pela reação da luciferase). A RIP tipo 2 ricina foi utilizada como controle positivo da inibição da síntese proteica.



Existem poucos trabalhos envolvendo a produção de anticorpos policlonais anti-RIPs, possivelmente devido a toxicidade dessa classe de proteínas e a dificuldade do estabelecimento de doses sub-letais que permitam a imunização do animal. O fato de a curcina ser uma RIP tipo 1 e de se trabalhar com uma quantidade de proteína bem menor que a DL_{50} , permitiu a imunização dos animais sem ocasionar a morte dos mesmos.

Antes de ser utilizado nos ensaios de *Western blotting*, o soro obtido após 28 dias de imunização do coelho com a CTS foi submetido ao processo de purificação em coluna de Sepharose-Proteína A. As IgGs purificadas foram dialisadas, concentradas por dialofiltração e usadas no ensaio de *Western blotting*. Como resultado, foi observado que o anticorpo policlonal anti-CTS reconheceu e interagiu fortemente tanto com a curcina de sementes quanto com a CTS imobilizadas na membrana de nitrocelulose (Figura 12).

Figura 12 – Ensaio de *Western blotting* da curcina de sementes e da CTS utilizando anticorpos policlonais anti-CTS. Amostras: MM – Marcador molecular Full Ranger Rainbow™ Recombinant (GE Healthcare); 1) Curcina curcina de sementes; 2) Curcina da torta de sementes (CTS)



Fonte: Elaborada pelo autor (2015)

Todos os resultados mencionados reforçam a hipótese de que a CTS é mesmo a RIP tipo 1 que está presente nas sementes de pinhão-mansó e confirmam o êxito da obtenção da curcina ativa a partir do resíduo resultante da extração do óleo das sementes.

CONCLUSÕES

7. Conclusões

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que mesmo após 15 dias de armazenamento, o resíduo proveniente da extração de óleos das sementes de pinhão-manso (também conhecido como torta) pode ser aproveitado como matéria-prima para o isolamento da curcina bioativa. Essa RIP do tipo 1, foi facilmente isolada da torta utilizando métodos de precipitação proteica e cromatografia de exclusão molecular, apresentando atividades biológicas, características bioquímicas e biofísicas similares aos da curcina isolada das sementes. Ressaltando que, a curcina, assim como RIPs, apresenta um variado potencial de aplicações biotecnológicas, que inclui seu uso na produção de imunotoxinas com ação anticâncer.

Por fim, podemos afirmar que a torta residual de sementes do pinhão-manso pode ser utilizada como matéria-prima em outros estudos de prospecção molecular, agregando valor a esse resíduo como uma forte alternativa para obtenção de compostos biativos e funcionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências bibliográficas

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com daphnia spp (Cladocera, Crustácea)*. Rio de Janeiro: p. 17. 2004e.

ADAM, S. E. I. Toxic effects of *Jatropha curcas* in mice. **Toxicology**, Limerick, v. 2, p.67-76, 1974.

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**, Amsterdam, v. 67, p. 223-243, 1997.

AHMED, O. M. M.; ADAM, S. E. I. Effects of *Jatropha curcas* on calves. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 16, p. 476-482, 1979a.

AHMED, O. M. M.; ADAM, S. E. I. Effects of *Jatropha curcas* in sheep and goat. **Research in Veterinary Science**, London, v. 27, p. 89-96, 1979b.

BARBIERI, L.; BATTELLI, M. G.; STIRPE, F. Ribosome inactivating protein from plants. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1154, p. 237-282, 1993.

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.

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, p. 485–490, 1996.

BECKER, W.; APEL, K. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a novel jasmonato induced protein of barley (*Hordeum vulgare. L.*). **Plant Mol. Biol.**, v. 19, n. 6, p. 1065-1067, 1992.

BOURINBAIAR, A. S.; HUANG, S. L. The activity of plant-derived antirretroviral proteins MAP30 and GAP31 against Herpes Simplex Virus infection *in vitro*. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 219, p. 923-929, 1996.

CAVALLARO, U. α -macroglobulin receptor mediates binding and cytotoxicity of plant ribosome-inactivating proteins. **Eur. J. Biochem.**, v. 232, p.165-171, 1995.

CHAN, L. L.; LI, J.; LIU, S. Differential effects of abrin on normal and tumor cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 123, p. 132-138, 1985.

CHAMBERY, A.; DI MARO, A.; PARENTE, A. Primary structure and glycan moiety characterization of PD-Ss, type 1 ribosome-inactivating proteins from *Phytolacca dioica* L. seeds, by precursor ion discovery on a Q-TOF mass spectrometer. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1973-1982, 2008.

CHAUDHRY, B.; MÜLLER-URI, F.; CAMERON-MILLS, V.; GOUGH, S.; SIMPSON, D.; SKRIVER, K.; MUNDY, J. The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. **Plant J.**, v. 6, p. 815-24, 1994.

CHECKER, V. G.; CHHIBBAR, A. K.; KHURANA, P. Stress-inducible expression of barley Hva1 gene in transgenic mulberry displays enhanced tolerance against drought, salinity and cold stress. **Transgenic Res.**, v. 21, p. 939–957, 2011.

CHEN, Y; ROUGE, P; PEUMANS, W. J; VAN DAMME, E. J. Mutational analysis of the carbohydrate-binding activity of the NeuAc(α -2,6)Gal/GalNAc-specific type 2 ribosome-inactivating protein from elderberry (*Sambucus nigra*) fruits. **Eur. J. Biochem.**, v. 364, p. 587-592, 2002

CHO, H. J., KIM, S.; KIM, M.; KIM, B. D. Production of transgenic male sterile tobacco plants with the cDNA encoding a ribosome inactivating protein in *Dianthus sinensis* L. **Mol. Cells.**, v. 10, n. 2, p. 135-141, 2000.

CORRADO, G.; DELLI BOVI, P.; CILIENTO, R.; GAUDIO, L.; DIMARO, A.; ACETO, S.; LORITO, M.; RAO, R. Inducible expression of a *Phytolacca heterotepala* ribosome-inactivating protein leads to enhanced resistance against major fungal pathogens in tobacco. **Phytopathology**, v. 95, p. 206–215, 2005.

CROWTHER, R. A.; PEARSE, M. F. Assembly and packing of clathrin into coat. **J. Cell Biol.**, v. 91, p. 790-797, 1981.

DEN HARTOG, M. T., LUBELLI, C.; BOON, L.; HEERKENS, S.; ORTIZ BUIJSSE, A. P.; DE BOER, M.; STIRPE, F. Cloning and expression of cDNA coding for bouganin. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, n. 6, p.1772-9, 2002.

DEVAPPA, R. K.; SWAMYLINGAPPA, B. Biochemical and nutritional evaluation of *Jatropha* protein isolate prepared by steam injection heating for reduction of toxic and antinutritional factors. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 5, p. 911-919, 2008.

DHYANI, S. K.; KUMAR, R. V.; AHLAWAT, S. P. *Jatropha curcas*: a potential biodiesel crop and its current R&D status. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v. 81, n. 4, p. 295-308, 2011.

DIAS, L. A. S.; LEME, L. P.; LAVIOLA, B. G.; PALLINI, A.; PEREIRA, O. L.; DIAS, D. C. F. S.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E.; SANTOS, A. S.; SOUSA, L. C. A. de; OLIVEIRA, T. S.; PRETTI, L. A. **Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível**. Viçosa, MG: L. A. S. Dias, 2007. 40 p.

DIXON, T. *Ricinus communis*. **Austr. Med. Gazette**, v. 6, p. 137-155, 1887.

DOWD, P. F.; JOHNSON, E. T.; PRICE, N. P. Enhanced pest resistance of maize leaves expressing monocot crop plant-derived ribosome-inactivating protein and agglutinin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 10768–10775, 2012.

DURAES, F. O. M.; LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A. Potential and challenges in making physic nut (*Jatropha curcas* L.) a viable biofuel crop: the Brazilian perspective. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, Sunnyvale, v. 6, n. 43, 2011.

EHRlich, P. Experimentelle Untersuchungen über Immunität, I: Euber Ricin. **Deutsch Med Wochenschr.** v. 17, p. 976–979, 1891.

EL BADWI, S. M. A; MOUSA, H. M.; ADAM, S. E. I.; HAPKE, H. J. Response to Brown Hissek chicks to low levels of *Jatropha curcas*, *Ricinus communis* or their mixture. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 34, p. 304-306, 1992.

ENDO, Y.; MITSUI, K.; MOTIZUKI, M.; TSURUGI, K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes - the site and the characteristics of the modification in 28-S Ribosomal-RNA caused by the toxins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262(12), p. 5908-5912, 1987a.

ENDO, Y.; TSURUGI, K. RNA N-glycosidase activity of ricin a-Chain - Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262. n. 17: p. 8128-8130.1987b.

FAN, J. M.; ZHANG, Q.; XU, J.; ZHU, S.; KE, T.; GAO DE, F.; XU YB. Inhibition on hepatitis B virus *in vitro* of recombinant MAP30 from bitter melon. **Mol Biol Rep.** V. 36, p. 381-388, 2009.

FERRERAS, J. M.; CITORES, L.; IGLESIAS, R.; JIMÉNEZ, P.; GIRBÉS, T. Use of ribosome-inactivating proteins from *Sambucus* for the construction of immunotoxins and conjugates for cancer therapy. **Toxins**. v. 3, p. 420-441, 2011.

FLEXNER, S. The histological changes produced by Ricin and Abrin intoxications. **J. Exp. Med.**, v. 2, n. 2, p. 197–216, 1897.

FRIGERIO, L., VITALE, A., LORD, J.M., CERIOTTI, A., ROBERTS, L.M. Free ricin A chain, proricin, and native toxin have different cellular fates when expressed in tobacco protoplasts. **J. Biol. Chem.**, **273**, 14194-14199, 1998.

FRYER, H. J.; DAVIS, G. E.; MANTHORPE, M.; VARON, S. Lowry protein assay using an automatic microtiter plate spectrophotometer. **Anal. Biochem.**, v. 153, n. 2, p. 262-6. 1986.

FUNATSU, G.; ISLAM, M. R.; MINAMI, Y.; SUNG-SIL, K.; KIMURA, M. Conserved amino acid residues in ribosome-inactivating proteins from plants. **Biochimie**, v. 73, p. 1157–1161, 1991.

GIRBÉS, T.; FERRERAS, J. M.; ARIAS, F. J.; STIRPE, F. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. **Mini-Reviews in Medical Chemistry**, v. 4, p. 461-467, 2004.

GLEESON, P. A.; HUGHES, R. C. Binding and uptake of the toxin lectin modeccin by baby hamster kidney (BHK) cells. **J. Cell. Sci.**, v. 75, p. 283-301, 1985.

GONCALVES, S. B.; MENDONCA, S.; LAVIOLA, B. G. **Substâncias tóxicas, alergênicas e antinutricionais presentes no pinhão-mansão e seus derivados e procedimentos adequados ao manuseio**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. 5 p. il. (Embrapa Agroenergia. Circular técnica, 001)

HARTLEY, M. R.; LORD, J. M. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1701, n. 1-2, p. 1-14, 2004.

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

HAUF, N.; CHAKRABORTY, T. Suppression of nf-kappa b activation and proinflammatory cytokine expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Immunol.**, v. 170, p. 2074-2082, 2003.

HE, W.; KING, A. J.; KHAN, A. M.; CUEVAS, J. A.; RAMIARAMANANA, D.; GRAHAM, I. A. Analysis of seed phorbol-ester and curcumin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* (L.) from Madagascar and Mexico. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 49, p. 1183-1190, 2011.

HE, Y. W.; GUO, C. X.; PAN, Y. F. Inhibition of hepatitis B virus replication by pokeweed antiviral protein. **World J Gastroenterol**. V. 14, p. 1592-1597, 2008.

HELLIN, H. Der giftig Eiweisskörper abrin und dessen wirkung auf das blut. Tese de doutorado, Universidade de Dorpad, Dorpad (Tartu), 1891 *apud* Liener, I.J.; Sharon, N.; Goldstein, I.J. The lectins. **Properties, functions and applications in biology and medicine**. New York, Academic Press Inc, 600 pp., 1986.

<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1889724/publicacao-aborda-destoxificacao-e-aproveitamento-de-tortas-de-pinhao-manso-e-mamona>.

HERMANN, M.S.; BEHNKE, W.D. A characterization of abrin A from the seeds of the *Abrus precatorius* plant. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 667, p. 397-410, 1981.

HUR, Y. *et al.* Isolation and characterization of pokeweed antiviral protein mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of residues important for toxicity. **PNAS**, v. 92, p. 8448-8452, 1995.

KARZIN, B. J.; COLLINS, E. J.; ROBERTUS, J. D. Structure of ricin A-chain at 2.5 Å. **Proteins: Struct. Funct. Genet.**, v. 10, p. 251-259, 1991.

KAUR, I.; YADAV, S. K.; HARIPRASAD, G.; GUPTA, R. C.; SRINIVASAN, A.; BATRA, J. K.; PURI, M. Balsamin, a novel ribosome inactivating protein from

the seeds of Balsam apple *Momordica balsamina*. **Amino Acids**, v. 43, n. 2, p.973-81, 2012.

KRICH, G. F. *Experimenta quaedam phamacologica de oleis ricini crotinis et Euphorbia lathryridis*. Tese, Dorpati Livonorun, (1857) *apud* Ilomets, T. Centenary of the Discovery of Lectins at Tartu University.// Lectins-Biology, **Biochemistry, Clinical Biochemistry**, v. 7, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri USA, p. 3 – 8, 1990.

KURTH, R.; SCHWERDTFEGE, W. K. **Current Topics in Biomedical Research**. Springer Science & Business Media, 2012. 185 p.

LAM, S.K.; NG, T.B. First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects. **Arch Biochem Biophys.**, v. 393, p. 271–280, 2001.

LEE, B. G.; KIM, M. K.; KIM, B. W.; SUH, S. W.; SONG, H. K. Structures of the ribosome-inactivating protein from barley seeds reveal a unique activation mechanism. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v. 68, n. 11, p.1488-500, 2012.

LIBERALINO, A. A. A.; BAMBIRRA, E. A.; MORAES-SANTOS, T.; VIEIRA, C. E. *Jatropha curcas* L. Seed. Chemical analysis and toxicity. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 31, p. 539-550, 1988.

LI, M.; CHEN, F.; LIU, C. P.; LI, D. M.; LI, X.; WANG, C., LI, J. C. Dexamethasone enhances trichosanthin-induced apoptosis in the HepG-2 hepatoma cell line. **Life Sci.** v. 86, p. 10–16, 2010.

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

LIN, J.; ZHOU, X.; WANG, J., JIANG, P.; TANG, K. Purification and characterization of curcin, a toxic lectin from the seed of *Jatropha curcas*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 40, p. 107–118, 2010.

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, p. 4746-4552, 2002.

LODGE, J. K.; KANIEWSKI, W. K.; TUMER, N. E. Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, p. 7089–7093, 1993.

LORD, J. M.; ROBERTS, L. M.; ROBERTUS, J. D. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. **FASEB J.** , v. 8, n. 2, p.201-8, 1994.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUO, M.-J.; YANG, X.-Y.; LIU, W.-X.; YING, X.; HUANG, P.; YAN, F.; CHEN, F. Expression, purification and anti-tumor activity of curcin. **Acta Biochim Biophys Sin.**, v. 9, n. 38, p. 663-668, 2006.

MACIEL, F. M.; LABERTY, M. A.; OLIVEIRA, N. D.; FELIX, S. P.; SOARES, A. M. S.; VERICIMO, M. A.; MACHADO, O. L. T. A new 2S albumin from *Jatropha curcas* L., seeds and assessment of its allergenic properties. **Peptides.**, v. 30, n. 12, p. 2103-7, 2009.

MADAN, S.; GHOSH, P. C. Interaction of gelonin with magrophages: effects of lysosomotropic amines. **Exp. Cell Research**, v.198, p. 52-58, 1992.

MAGNUSSON, S., BERG, T., TURPIN, E., FRÉNOY, J.P. Interactions of ricin with sinusoidal endothelial rat liver cells. **Biochem. J.**, v. 277, p. 855-861, 1991.

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 factors. **Food Chem.**, v. 62, p.207-215, 1998.

MARTINEZ-HERRERA, J.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G.; DAVILA-ORTIZ, G.; BECKER, K. Chemical composition, toxic/ antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. From Mexico. **Food Chemistry**, London, v. 96, p. 80-89, 2006.

MONTANARO, L.; SPERTI, S.; STIRPE, F. Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro. Ribosomes as the target of the toxin. **Biochem. J.**, v. 136, n. 3, p. 677-83, 1973.

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.

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

NARAYANAN, S.; SURENDRANATH, K.; BORA, N.; SUROLIA, A.; KARANDE, A.A. Ribosome inactivating proteins and apoptosis. **FEBS Lett.**, v. 579, p. 1324-1331, 2005.

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

OBRIG, T. G.; IRVIN, J. D.; HARDESTY, B. The effect of an antiviral peptide on the ribosomal reactions of the peptide elongation enzymes, EF-I and EF-II. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 155, p. 278-289, 1973.

OLIVEIRA, A. J. de; RAMALHO, J. **Plano Nacional de Agroenergia: 2006 - 2011**. 2. ed. rev. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 110 p

OLSNES, S. The history of ricin, abrin and related toxins. **Toxicon**, v. 44. n. 4: p. 361-70, 2004.

OLSNES, S.; PIHL, A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. **Biochemistry**, v. 12. n. 16: p. 3121-6, 1973.

OLSNES, S.; SPAEREN, U.; HEIBERG, R.; PIHL, A. Protein synthesis in the presence of non-ionic detergents in a cell-free system from rabbit reticulocytes. **Biochem J**, v. 130, n. 1, p.297-9, 1972.

OLSNES, S; PIHL, A. Abrin, Ricin, and their Associated Agglutinins. **The Specificity and Action of Animal, Bacterial and Plant Toxins Receptors and Recognition**, p. 129-173, 1977.

PARKASH, A., NG, T. B., TSO, W. W. Isolation and characterization of luffacylin, a ribosome inactivating peptide with anti-fungal activity from sponge gourd (*Luffa cylindrica*) seeds. **Pept. Res.**, v. 59, n. 2, p. 197-202, 2002.

PEUMANS, W. J.; HAO, Q.; VAN DAMME E. J. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? **FASEB J.**, v. 15, n. 9, p. 1493-506, 2001.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation and characterization of O-linked glycans. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 33, n. 3, p. 209-258, 1998.

PIRIE, C. M.; HACKEL, B. J.; ROSENBLUM, M. G.; WITTRUP, K. D. Convergent potency of internalized gelonin immunotoxins across varied cell lines, antigens, and targeting moieties. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 4165– 4172, 2011.

POLITO, L.; BORTOLOTTI, M.; PEDRAZZI, M.; BOLOGNESI, A. Immunotoxins and other conjugates containing saporin-s6 for cancer therapy. **Toxins**. v. 3, p. 697-720, 2011.

PURI, M. Biotechnological potential of *Momordica balsamina* revealed. **Curr. Pharma. Biotechnol.**, v. 11, p. 229, 2010.

PURI, M.; KAUR, I.; KANWAR, R. K. Ribosome inactivating protein (RIPs) from *Momordica charantia* for antiviral therapy. **Curr. Mol. Med.**, v. 9, p. 1080-1094, 2009.

QING, L. T.; QU, X. L. Cloning, expression of the abrin-a A-chain in *Escherichia coli* and measurement of the biological activities *in vitro*. **Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)**, v. 34, n.4, p.405-10, 2002.

RAJ, D. S.; VENNILA, J. J. Progress in ribosomal inactivating protein (RIP) studies: recent review of potential applications. **IJPBS**. v. 3, p. 88-100, 2013.

REYES, L. F. Proteínas inativadoras de ribossomos: identificação de novas proteínas e estudos de interação da cadeia-A da pulchellina (PAC) com monocamada de Langmuir. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

ROBERTUS, J. D., MONZINGO, A. F. The structure of ribosome inactivating proteins. **Mini-Rev. Med. Chem.**, v. 4, n. 5, p. 477-486, 2004.

ROSADO, T. B.; LAVIOLA, B. G.; FARIA, D. A.; PAPPAS, M. R.; BHERING, L. L.; QUIRINO, B.; GRATTAPAGLIA, D. Molecular markers reveal limited genetic

diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, Madison, v. 50, n. 6, p. 2372-2382, 2010.

SANDVIG, K.; VAN DEURS, B. Endocytosis and intracellular transport of ricin: recent discoveries. **FEBS Lett.**, v. 452, p. 67-70, 1999.

SANTANA, S. S.; GENNARI-CARDOSO; M. L., CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SANTIAGO ADA, S.; ALVIM, F. C.; PIROVANI, C. P. Eutirucallin, a RIP-2 type lectin from the latex of *Euphorbia tirucalli* L. presents proinflammatory properties. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

SILVA, A. L. C. Pulchellina: uma potente toxina vegetal inativadora de ribossomos - RIP tipo 2. estudos in vitro e in vivo. 2005. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005. doi:10.11606/T.76.2005.tde-07012009-112409. Acesso em: 2023-10-18.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, p. 53-62, 2004.

SMITH, D. C.; MARSDEN, C. J.; LORD, 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.

SRIVASTAVA, M.; GUPTA, S. K.; ABHILASH, P. C.; SINGH, N. Structure prediction and binding sites analysis of curcin protein of *Jatropha curcas* using computational approaches. **J. Mol. Model.**, v. 18, n. 7, p. 2971-9, 2012.

STIRPE, F.; PESSON-BRIZZI, A.; LORENZONI, E.; STROCCHI, P.; MONTANARO, L.; SPERTI, S. Studies on the proteins from the seeds of *Croton tiglium* and *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.; FALASCA A.; ABBONDANZA, A.; STEVENS, W. A. Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (corn cockle) and of *Asparagus officinalis* L. (asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree). **Biochem. J.**, v. 216, p. 617-625, 1983.

STIRPE, F.; BARBIERI, L.; BATTELLI, M. G.; SORIA, M.; LAPPI, D. A. Ribosome inactivating proteins from plants: present status and future prospects. **Biotechnology**. v. 10, p. 405-412, 1992.

STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins: from toxins to useful proteins. **Toxicon**. v. 67, p. 12- 6, 2013.

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

STIRPE, F.; LAPPI, D. **Ribosome-inactivating Proteins: Ricin and Related Proteins**. John Wiley & Sons. 2014. 328 p.

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, 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, p. 2826-2835, 2013.

TAHIROV, T. H.; LU, T. H.; LIAW, Y. C.; CHEN, Y., L.; LIN, J. Y. Crystal structure of abrin-a at 2.14 Å. **J. Mol. Biol.**, v. 250, n. 3, p.354-67, 1995.

VAN DAMME, E. J.; BARRE, A.; BARBIERI, L.; VALBONESI, P.; ROUGE, P.; VAN LEUVEN F.; STIRPE, F.; PEUMANS; W. J. Type 1 ribosome-inactivating

proteins are the most abundant proteins in iris (*Iris hollandica* var. Blaauw) bulbs: characterization and molecular cloning. **Biochem. J.**, v. 324, p. 963-970, 1997.

VAN DAMME, E.J.M., HAO, Q., CHEN, Y., BARRE, A., VANDENBUSSCHE, F., DESMYTER, S., ROUGE, P., PEUMANS, W.J. Ribosome-inactivating proteins: A family of plant proteins that do more than inactivating ribosomes. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 20, n. 5, p. 395-465, 2001.

VAN DEURS, B., PEDERSEN, L.R., SUDAN, A., OLSNES, S., SANDVIG, K. Receptor-mediated endocytosis of a ricin-colloidal gold conjugate in vero cells. *Exp. Cell Research*, v. 159, p. 287-304, 1985.

VIVANCO, J. M.; SAVARY, B. J.; FLORES, H. E. Characterization of two novel type I ribosome-inactivating proteins from the storage roots of the Andean crop *Mirabilis expansa*. **Plant. Physiol.**, v. 119, p. 1447-1456, 1999.

WALSH, T. A.; MORGAN, A. E.; HEY, T. D. Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize: novel mechanism of proenzyme activation by proteolytic removal of a 2.8-kilodalton internal peptide segment. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 23422-27, 1991.

WARDEN, C. J. H.; WADDEL, L. A. The nature of poison with observations on its chemical and physiological properties. Bengal Secretarial Press, 1884 *apud* KOCOUREL, J. Historical background. In: LIENER, I.J.; SHARON, N. & GOLDSTEIN, I.J., eds The lectins. **Properties, functions and applications in biology and medicine**. London, ACADEMIC PRESS, p. 3-32, 1986.

WEI, Q.; HUANG, M.-X.; XU, Y.; ZHANG, X.-S.; CHEN, F. Expression of a ribosome inactivating protein (curcin 2) in *Jatropha curcas* is induced by stress. **Journal of Biosciences**, v.30, p. 351-357, 2005

WU, J.; GAN, J. H.; XIA, Z. X. Crystallization and preliminary crystallographic studies of trichomaglin, a novel ribosome inactivating protein. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v. 56, p. 1466-1467, 2000.

XIA, H. C.; LI, F.; LI, Z.; ZHANG, Z. C. Purification and characterization of Moschatin, a novel type I ribosome-inactivating protein from the mature seeds of pumpkin (*Cucurbita moschata*), and preparation of its immunotoxin against human melanoma cells. **Cell Res.** v. 13, p. 369-374, 2003.

YANG, Q.; LIU, R. S.; GONG, Z. Z.; LIU, W. Y. Studies of three genes encoding cinnamomin (a type II RIP) isolated from the seeds of camphor tree and their expression patterns. **Genes**, v. 284, p. 215-223, 2002.

ZHANG, D.; HALAWIESH, F. T. Isolation and identification of foetidissimin: a novel ribosome-inactivating protein from *Cucurbita foetidissima*. **Plant Sci.**, v. 164, p. 387-393, 2003.