



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

WALLADY DA SILVA BARROSO

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOATIVIDADE DE
UMA PROTEÍNA INATIVADORA DE RIBOSSOMOS DE *Jatropha podagrica*
HOOK.

FORTALEZA

2019

WALLADY DA SILVA BARROSO

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOATIVIDADE DE UMA
PROTEÍNA INATIVADORA DE RIBOSSOMOS DE *Jatropha podagrica* HOOK

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia de
Recursos Naturais da Universidade
Federal do Ceará, como requisito para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia de Recursos Naturais.
Área de Concentração: Biotecnologia

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

Coorientadora: Dra. Fábila Karine Andrade

FORTALEZA

2019

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)

B285p Barroso, Wallady da Silva.

Purificação, caracterização físico-química e bioatividade de uma proteína inativadora de ribossomos de *Jatropha podagrica* Hook / Wallady da Silva Barroso. – 2019.

62 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2019.

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

Coorientação: Prof. Dr. Fábria Karine Andrade.

1. Proteínas inativadoras de ribossomos. 2. *Jatropha podagrica* Hook. 3. Podagrina. I.
Título.

CDD 660.6

WALLADY DA SILVA BARROSO

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOATIVIDADE DE UMA
PROTEÍNA INATIVADORA DE RIBOSSOMOS DE *Jatropha podagrica* HOOK

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia de
Recursos Naturais da Universidade
Federal do Ceará, como requisito 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)

Dra. Fábila Karine Andrade (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Tavares
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

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

Dra. Juliana Rabelo de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Capes e CNPQ pelo auxílio financeiro necessário a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus, pelo dom da Vida.

Agradeço à minha família, Evelene da Silva Barroso, José Gomes Barroso e Evelyn da Silva Barroso, por proverem todos os recursos necessários para que eu chegasse aqui, mas principalmente por me incentivar e motivar a estudar e continuar buscando minha formação acadêmica. Acima de tudo, obrigado por seu amor.

Agradeço ao Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva pela orientação neste trabalho. Pelas horas e paciência dedicadas ao projeto e por seus ensinamentos.

Agradeço aos meus amigos de laboratório, Talita, Samara, Vanessa, Mario, Vinicius, Germana, Bruna e Jessica, por todo aprendizado, carinho e suporte que tivemos juntos.

Agradeço aos meus amigos/irmãos de curso, Rafael, Larissa, Lia, Artur e Ellivelton, por todo amor e suporte no qual é baseada nossa convivência.

“Construímos muros demais e pontes de menos.”
(Isaac Newton)

RESUMO

Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) são toxinas que possuem atividade enzimática rRNA-*N*-glicosidase. Essas proteínas inibem a síntese proteica clivando especificamente o resíduo da adenina 4324 (A_{4324}) do RNA ribossomal 28S da subunidade ribossomal maior 60S. Esse processo para a maquinaria celular de síntese proteica, levando à morte celular. As RIPs podem ser classificadas nos tipo 1, 2 e 3. O objetivo deste trabalho foi detectar, purificar e caracterizar a RIP de *Jatropha podagrica* Hook. Em adição, testar as suas diferentes atividades biológicas *in vitro*. Após os processos de coleta, limpeza das sementes, produção da farinha e delipidação das mesmas, foi realizada a extração de proteínas de *J. podagrica* e estabelecidas as melhores condições de extração e purificação da RIP podagrina. Foram realizadas extrações com diferentes tampões e pHs. A condição de extração com maior quantidade de proteínas solúveis foi a realizada em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4, seguida de precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ 60%. A fração 0/60 (Fr0/60) foi então utilizada em cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-100. Após o processo cromatográfico foi obtido uma RIP tipo 1 pura denominada de podagrina. A podagrina possui atividade rRNA-*N*-glicosidase com padrões de estrutura secundária, avaliados por dicroísmo circular, com predominância de folhas- β . A podagrina foi ainda avaliada quanto sua ação anti-helmíntica, contra *Ascaridia galli*, apresentando a maior eficiência na concentração de 5 mg/mL, sendo a taxa de mortalidade de 100% após 72h de ensaio. Com os resultados, é possível concluir que a podagrina é uma RIP tipo 1.

Palavras-chaves: proteínas inativadoras de ribossomos; *Jatropha podagrica* Hook; Podagrina.

ABSTRACT

Ribosome inactivating proteins (RIPs) are toxins with enzymatic activity rRNA-N-glycosidase. These proteins inhibit protein synthesis by specifically cleaving the adenine residue 4324 (A₄₃₂₄) from ribosomal RNA 28S of the ribosomal subunit 60S. This process stops the protein synthesis, leading to cell death. RIPs can be classified in type 1, 2 e 3. The main goal of this work was to isolate e characterize *Jatropha podagrica* Hook RIP and test its different *in vitro* biological activities. After collecting, cleaning the seeds, producing a flour and removing the lipids, the best protein extraction condition and purification protocols were determined. For the crude extracts (CE) the best buffer were Tris-HCl 20 mM pH 7,4. After that, a proteins precipitation with (NH₄)₂SO₄ at 60% saturation was performed and denominated Fr0/60. The Fr0/60 was used for size exclusion chromatography (Sephadex G-100). After chromatography, it was obtained only one type 1 RIP, named podagrin. The podagrin showed rRNA-N-glycosidase activity and when submitted to dichroism circular analysis, podagrin presented a conformational pattern with predominance of β sheet secondary structures. It was also performed with podagrin an anti-helminth assay, against *Ascaridia galli*. The most efficient concentration was 5 mg/mL of podagrin, with a 100% mortality of the parasite after 72 h. With these data, it is possible to conclude that podagrin is a type 1 RIP.

Keywords: ribosome inactivating proteins; *Jatropha podagrica* Hook; Podagrin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	O mecanismo de ação das proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs).....	15
Figura 2 –	Mecanismos de ação das RIPs em células eucarióticas.	17
Figura 3 –	Distribuição taxinômica de RIPs catalogadas.	18
Figura 4 –	SDS-PAGE (12,5%) do extrato bruto da farinha de sementes de <i>Jatropha podagrica</i> e da fração proteica precipitada com sulfato de amônio.	38
Figura 5 –	Purificação da RIP tipo 1 de sementes de <i>Jatropha podagrica</i> . (A)39	
Figura 6 –	SDS-PAGE (15%) das frações cromatográficas referentes aos picos 1, 2, 3 e 5 da exclusão molecular.....	40
Figura 7 –	Análise da atividade RNA- <i>N</i> -glicosidase da podagrina através de eletroforese em gel de agarose/formamida..	41
Figura 8 –	Dicroísmo circular da podagrina.	42
Figura 9 –	Curva de termoestabilidade da estrutura secundária da podagrina obtida a partir dos espectros de dicroísmo circular.....	43
Figura 10 –	Espectro de emissão de fluorescência da podagrina.	44
Figura 11 –	Purificação do anticorpo policlonal anti-podagrina por cromatografia de afinidade em Sepharose-Proteína A.....	45
Figura 13 –	Análise da atividade do anticorpo anti-podagrina por <i>Western blotting</i>	46
Figura 14 –	Inibição da síntese proteica promovida pela podagrina em sistema livre de células (TNT® <i>Coupled Reticulocyte Lysate System</i>).	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	RIPs isoladas de <i>Jatropha curcas</i> L.	19
Tabela 2 –	Tabela de estruturas secundárias da RTA.	20
Tabela 3 –	Atividade anti-tumoral de RIPs tipo I e tipo II.	21
Tabela 4 –	Dosagem de proteínas solúveis extraída das farinhas de sementes sob diferentes condições pH.	36
Tabela 7 –	Predição da estrutura secundária e da temperatura de <i>melting</i> da podagrina.	42
Tabela 8 –	Percentual médio de mortalidade da podagrina sobre <i>Ascaridia galli</i> , no teste <i>in vitro</i> , ao longo de 72 horas de tratamento.	48
Tabela 9 –	Toxicidade da podagrina contra nauplios de <i>Artemia salina</i>	49

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
nM	Nanomolar
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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs)	13
1.2	Mecanismos de ação	14
1.3	Distribuição das RIPs na natureza	17
1.4	Características estruturais das RIPs	19
1.5	Atividades e potencial biotecnológico das RIPs	21
1.6	A espécie <i>Jatropha podagrica</i> Hook.	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	MATERIAIS	26
3.1	Vegetal	26
3.2	Animal	26
3.3	Reagentes	26
4	METODOLOGIA	27
4.1	Preparação da farinha de semente de <i>J. podagrica</i>	27
4.2	Obtenção do extrato proteico da farinha de <i>J. podagrica</i>	27
4.3	Dosagem de proteínas solúveis	27
4.4	Avaliação da atividade hemaglutinante dos EBs	27
4.5	Precipitação das proteínas do EB de <i>J. podagrica</i> com sulfato de amônio	28
4.6	Purificação da RIP de <i>J. podagrica</i>	28
4.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)	29
4.8	Atividade rRNA N-glicosidase <i>in vitro</i> dos EBs	29
4.9	Dicroísmo circular	30
4.10	Avaliação da termoestabilidade da podagrina via CD	31
4.11	Ensaio de fluorescência intrínseca	31
4.12	Ensaio de inibição da síntese proteica em sistema livre de células	32
4.13	Atividade anti-helmíntica	32
4.14	Produção de anticorpos policlonais	33
4.15	Western Blotting	34

4.16	Teste de toxicidade da podagrina com <i>Artemia salina</i> .	34
4.17	Análise estatística	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1	Extração de proteínas das farinhas de sementes	36
5.2	Atividade hemaglutinante dos extratos das farinhas (EBs)	37
5.3	Precipitação com Sulfato de Amônio	37
5.4	Purificação da RIP de sementes de <i>J. podagrica</i> .	38
5.5	Atividade rRNA- <i>N</i> -glicosidase da podagrina.	40
5.6	Análises de Dicroísmo Circular (CD), termoestabilidade e fluorescência da podagrina	41
5.7	Anticorpos policlonais anti-podagrina e ensaios de imunodeteção	44
5.8	Ensaio de inibição da síntese proteica em sistema livre de células	46
5.9	Atividade anti-helmíntica da podagrina	47
5.10	Toxicidade contra náuplios de <i>Artemia salina</i>	49
6	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins medicinais remonta aos tempos mais antigos da humanidade. Extratos vegetais são usados na medicina popular para diversos fins desde cólicas estomacais até ferimentos externos. Esse conhecimento popular vem sendo utilizado pelos cientistas para prospectar alvos na natureza que possuam moléculas com elevado potencial farmacológico (INTA *et al.*, 2013).

Dentro da grande diversidade de moléculas de origem vegetal, as toxinas vegetais possuem grande valor farmacológico quando administradas em doses subletais. Tais toxinas vem sendo relatadas com diversas ações de interesse médico como atividade anti-leishmania (VASCONCELOS *et al.*, 2018), anticâncer (BORTOLOTTI, 2018) e antiviral (HASSAN *et al.*, 2018). Dentre essas moléculas, as Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs) vêm tendo um destaque importante devido sua elevada toxicidade e potenciais aplicações biotecnológicas (STIRPE, 2013).

1.1 Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs)

Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) são toxinas que possuem atividade enzimática rRNA-*N*-glicosidase (EC 3.2.2.22) (ENDO E TSURUGI, 1986). RIPs inibem de forma irreversível a síntese proteica clivando especificamente um resíduo de adenina, comumente o resíduo 4324 (A₄₃₂₄), do RNA ribossomal 28S que compõe a subunidade ribossomal maior 60S. Esse processo para a maquinaria celular de síntese proteica, levando a morte celular (ENDO e TSURUGI, 1986; SCHROT *et al.*, 2015).

A primeira RIP foi identificada em *Ricinus communis*, conhecida popularmente como mamona, e nomeada ricina. Os primeiros casos registrados de intoxicação por ingestão de *R. communis* datam do século XIX e continuam acontecendo até os dias atuais, principalmente devido ao extenso uso do óleo de mamona pela indústria (BOZZA *et al.*, 2014). Apesar de serem relatadas mais comumente em plantas, essa classe de enzimas são também encontradas em fungos, bactérias e insetos (LAPADULA e AYUB, 2017).

Tradicionalmente é adotada como norma a classificação sugerida por Stirpe e Barbieri (1986), onde as RIPs podem ser classificadas em 3 tipos. As RIPs tipo 1

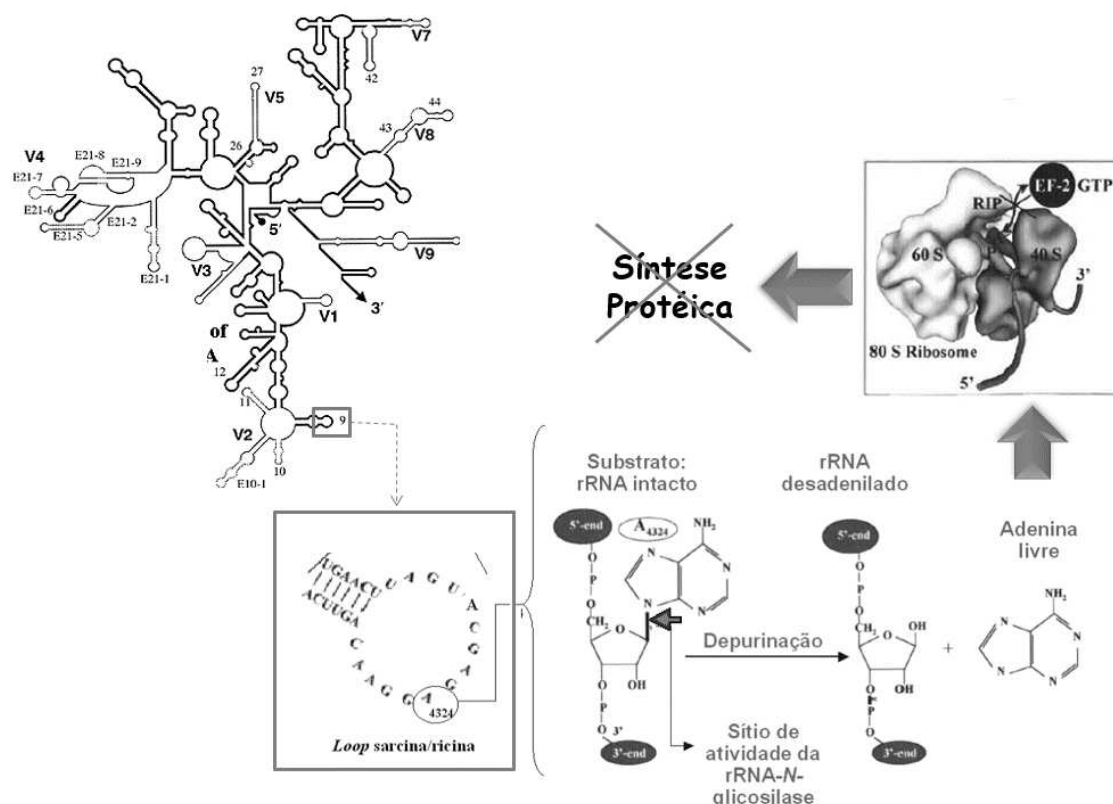
possuem uma única cadeia polipeptídica na qual pode ser encontrado o sítio catalítico com a atividade enzimática rRNA-*N*-glicosidase. Já as RIPs tipo 2 são proteínas formadas por duas cadeias ligadas por uma ligação dissulfeto. As cadeias são denominadas por cadeia *A* e cadeia *B*. A cadeia *A* possui a função catalítica (rRNA-*N*-glicosidase), característica dessa classe de enzimas. A cadeia *B* possui domínios ligantes à carboidratos (domínio lectínico). As RIPs tipo 3, diferem das demais devido a presença de estruturas próprias. A primeira a ser identificada foi a Proteína Induzida por Jasmonato (JIP60) identificada em folhas de cevada que sofreram estresse pelo uso de jasmonato (REINBOTHE *et al.*, 1994). A segunda enzima membro desse grupo foi encontrada no milho e chamada de b-32 na forma de pró-toxina e somente demonstrava ação catalítica após sofrer ação proteolítica (HEY *et al.*, 1995). Ambas as RIPs pertencentes à classe 3 possuem suas ações enzimáticas, porém suas estruturas e mecanismos de ação são muito diferentes das demais classes. Alguns autores consideram as RIPs tipo 3 como uma classe especial de RIPs tipo 1 (GIRBES *et al.*, 2004; SCHROT *et al.*, 2015; STIRPE, 2004).

As RIPs tipo 1 possuem geralmente um peso molecular variando entre 26 à 32 KDa com raríssimas exceções, como no caso de proteínas inibidoras da síntese proteica de baixo peso molecular (8 à 13,5 KDa). RIPs tipo 2 possuem peso molecular variando entre 60 à 65 KDa, tendo sua cadeia *A* com peso molecular similar as RIPs tipo 1 e a cadeia *B* variando de 30 à 35KDa (GIRBES *et al.*, 2004).

1.2 Mecanismos de ação

O mecanismo, pelo qual ocorre a depurinação característica das rRNA-*N*-glicosidases, foi inicialmente descrito por Endo e Tsurugi (1987). O mecanismo consiste no rompimento da ligação *N*-glicosídica que une a A₄₃₂₄ ao esqueleto de fosfatos do RNA ribossomal 28S da subunidade 60S do Ribossomo isolado do fígado de ratos (Figura 1) (ENDO e TSURUGI, 1987). Essa adenina se encontra em uma estrutura conhecida como *loop* da Sarcina/Ricina. Este *loop* da Sarcina/Ricina é extremamente conservado entre diferentes espécies e é responsável pela interação dos fatores de elongação 2 e G, componentes da maquinaria de síntese proteica, em eucariotos e procariotos, respectivamente (STIRPE e BARBIERI, 1986).

Figura 1 – O mecanismo de ação das proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs).



A maioria das RIPs cliva uma adenina (A₄₃₂₄ em rato) do RNA ribossomal (da subunidade maior 60S) impossibilitando a interação do rRNA com o Fator de Elongação 2 (EF2). Algumas RIPs são capazes de excisar mais de um resíduo de adenina.

Fonte: Adaptado de Girbes *et al.*, (2004)

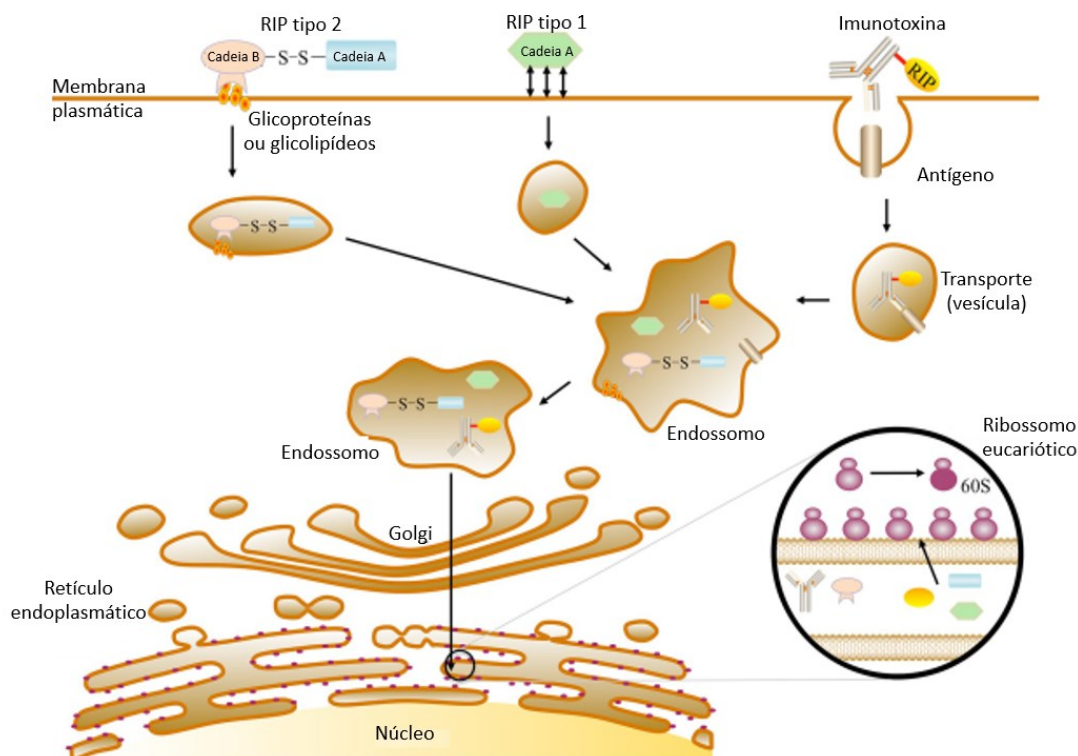
Entretanto, para que ocorra sua ação, a rRNA-N-glicosidase necessita alcançar ao citoplasma celular. As membranas celulares (membrana celular e o sistema de endomembranas das organelas) são as principais barreiras que necessitam ser vencidas para que a RIP seja capaz de exercer sua ação enzimática.

As RIPs tipo 2 são normalmente mais tóxicas do que as RIPs tipo 1 devido à presença da cadeia lectínica que desenvolve um papel essencial para entrada da RIP na célula. O mecanismo de entrada das RIPs tipo 2 é iniciado quando sua cadeia lectínica interage com glicoproteínas e glicolípídeos, geralmente ricas em resíduos de α -1,4 galactose, presentes na superfície da membrana celular, desencadeando os mecanismos de endocitose dependentes ou não de clatrina. O endossomo formado é então levado ao Aparato de Golgi (AG) e por transporte retrógrado é enviado para o

Reticulo Endoplasmático (RE). Uma vez no RE, a RIP encontra-se em estado desenovelado e através do mecanismo de degradação proteica associado ao RE, responsável por translocar proteínas mal enoveladas para o citoplasma a fim de que sejam degradadas por proteassomos, ela é translocada para o citoplasma e pode finalmente agir sobre os ribossomos lá presentes. (PURI et al., 2012; ZENG et al., 2015).

Devido à ausência da cadeia lectínica, as RIPs tipo 1 possuem maior dificuldade para adentrar o citoplasma. Seu provável mecanismo de entrada consiste na interação com os fosfolipídios da membrana levando a formação do endossomo, mas seu mecanismo exato continua incerto (ZENG et al., 2015). Apesar de RIPs tipo 1 possuírem menor toxicidade in vivo, sua ação in vitro pode ser superior ou equivalente as RIPs tipo 2. Devido a essa característica diversos estudos seguem criando imunotoxinas com essas moléculas (Flavell et al., 2006; Giansanti et al., 2018; Oriol et al., 2017; Polito et al., 2011; Tazzari et al., 1994). Estas, consistem na ligação de uma proteína tóxica a anticorpos monoclonais a fim de que facilite a entrada no citoplasma e as direcionem a tipos celulares específicos. Os mecanismos de entrada no citoplasma das RIPs tipo 1, tipo 2 e imunotoxinas estão esquematizados na figura 2 (ZENG et al., 2015; ZHU et al., 2018).

Figura 2 – Mecanismos de ação das RIPs em células eucarióticas.



Fonte: Adaptado de Zeng et al.(2015).

Mecanismos de entrada das RIPs tipo 1, tipo 2 e imunotoxinas. O processo ocorre por endocitose com a posterior liberação das moléculas para o citoplasma via retículo endoplasmático.

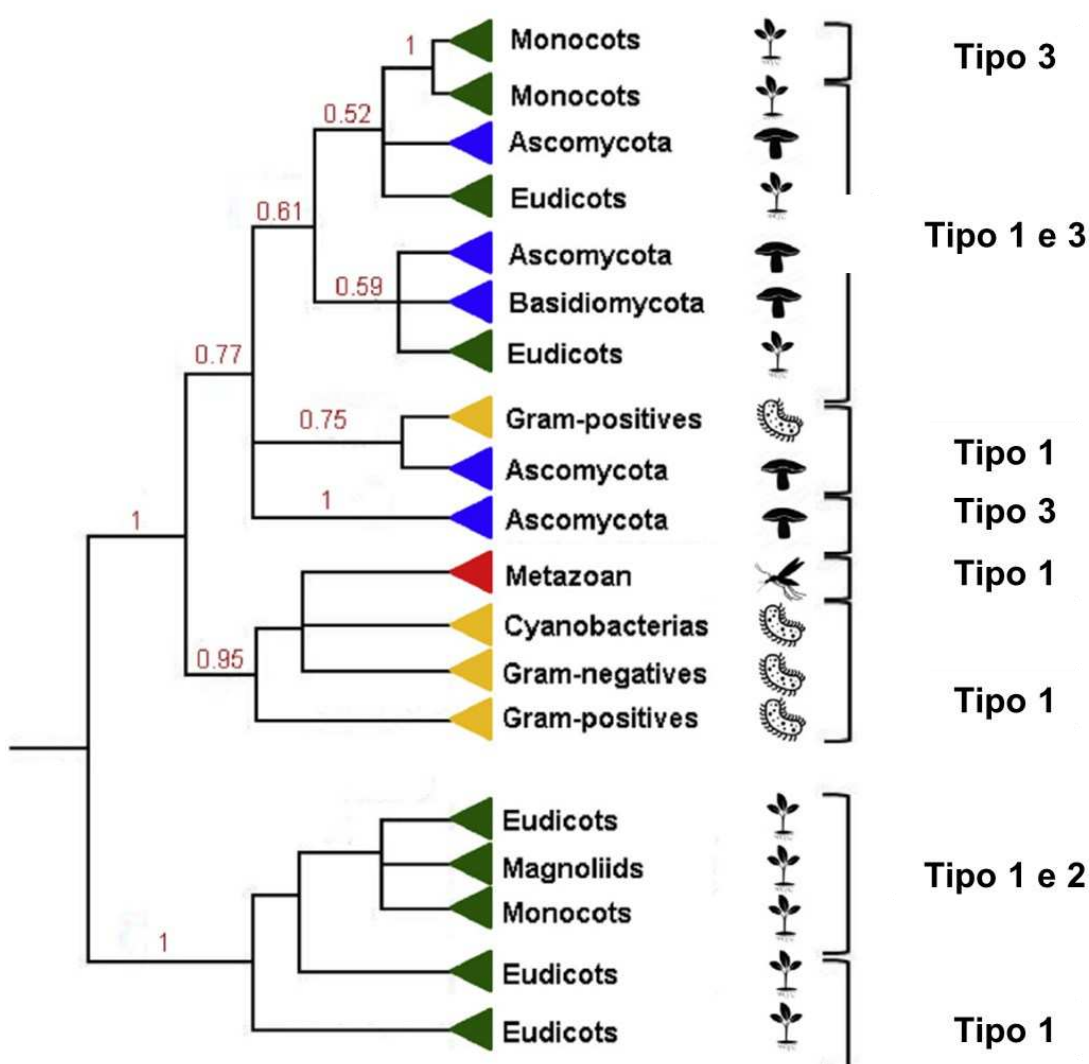
1.3 Distribuição das RIPs na natureza.

Devido à grande variedade de espécies nas quais as rRNA-*N*-glicosidases são encontradas, foi elaborada a hipótese de que elas poderiam ser uma classe ubíqua de proteínas (PURI et al., 2012). Entretanto essa hipótese deve ser rejeitada já que o trabalho de Stirpe e colaboradores (2013) relataram não ter encontrado no genoma de *Arabidopsis thaliana*, genes para produção de RIPs. Essas moléculas são encontradas principalmente em plantas, porém já foram descritas em outros reinos (LAPADULA e AYUB, 2017). RIPs provenientes de bactérias, fungos, macroalgas e insetos já foram prospectadas e caracterizadas. A *lamjapin* é uma RIP encontrada na espécie de alga *Saccharina japonica* (Liu et al., 2002), *pleuturegin* e *volvarin* são RIPs encontradas nos fungos *Pleurotus tuberregium* e *Volvariella volvaceae*, respectivamente (Yao et al, 1998; Wang and Ng, 2001), já a *shiga toxin* foi isolada da bactéria *Shigella dysenteriae* a *verotoxin 1* (uma proteína similar a shiga toxin) foi

isolada de uma cepa de *Escherichia coli* (BROWN *et al.*, 1980; HAUF e CHAKRABORTY, 2003).

Os estudos evolutivos mais recentes sobre a origem das rRNA-*N*-glicosidases mostram que estas moléculas tiveram uma única origem na árvore da vida e divergiram através de diferentes mecanismos evolutivos (duplicação de genes, perda de genes, transferências horizontais e fusões). Através das ferramentas *in silico* e dos bancos de dados genômico foi possível observar a ausência de genes de RIPs no domínio das Archeas e no reino Metazoa com a exceção da subfamília dos Culicinae (figura 3) (LAPADULA e AYUB, 2017).

Figura 3 – Distribuição taxinômica de RIPs catalogadas.



Fonte: Adaptado de Lapadula e Ayub (2017).

Algumas espécies podem apresentar mais de uma RIP, como a *Jatropha curcas* que possui já catalogadas 4 diferentes isoformas da curcina, uma RIP tipo 1 (Tabela 1). Através de análises genômicas foram encontrados 31 genes que podem codificar para RIPs tipo 1 no genoma do arroz que são expressas ou não como respostas a estresses bióticos e abióticos (JIANG *et al.*, 2008).

Tabela 1 – RIPs isoladas de *Jatropha curcas* L.

RIPs	Classificação	Massa molecular (KDa)	IC ₅₀ ¹	Fonte	Referência
Curcina	RIP 1	28,2	0,42 nM	Sementes	(LIN <i>et al.</i> , 2010)
Curcina 2	RIP 1	30,1	n/d	Recombinante	(QIN <i>et al.</i> , 2005)
Curcina-L	RIP 1	32,0	4 µg/mL	Folhas	(QIN <i>et al.</i> , 2009)
Jc-SCRIP	RIP 1	32,3	n/d	Cascas da semente	(NUCHSUK <i>et al.</i> , 2013)

Fonte: Adaptada de Schrot *et al.* (2015).

¹ Concentração inibitória que inibe em 50% o processo de tradução em um sistema de células livre. As concentrações foram listadas em Massa Molar ou mg/mL. n/d = não disponível.

A presença dessas enzimas nos tecidos vegetais é bastante variável desde em quantidades traço até centenas de miligramas por 100g de tecido. As rRNA *N*-glicosidases podem ser expressas nas folhas, flores, raízes, sementes, frutos, ramos, seiva e até em cultura de células, porém essa é uma característica que diverge de espécie para espécie. Quando presente em uma espécie é possível encontrá-las em todos esses tecidos vegetais simultaneamente ou exclusivamente em um deles (STIRPE, 2004).

1.4 Características estruturais das RIPs

Para que uma molécula seja classificada como uma nova RIP é necessário que esta possua estrutura característica e atividade rRNA *N*-glicosidase, incluindo os resíduos conservados do sítio ativo os quais acredita-se serem característicos dessa classe (Funatsu *et al.*, 1991). A esse domínio conservado foi designado o nome de domínio tóxico shiga/ricina (SCHROT *et al.*, 2015).

A ricina, RIP tipo 2 isolada da planta *R. communis*, é utilizada como principal modelo estrutural para RIPs. Esta foi a primeira RIP a ter sua estrutura tridimensional resolvida (MONTFORT *et al.*, 1983). A cadeia A da ricina (RTA) é utilizada como modelo para todas as cadeias catalíticas de RIPs tipo 2 e para as RIPs tipo 1, pois apresentam similaridades elevadas entre si. Ela é uma enzima globular com 267 resíduos de aminoácidos, e possui as estruturas secundárias de α -hélice e folhas- β como mostrados na tabela 2 (ROBERTUS e MONZINGO, 2004).

Tabela 2 – Tabela de estruturas secundárias da RTA.

Hélice- α	Resíduos	Folhas- β	Resíduos
A	18 – 32	A	7 – 13
B	99 – 104	B	56 – 64
C	122 – 127	C	68 – 76
D	141 – 152	D	79 – 86
E	161 – 180	E	88 – 93
F	184 – 192	F	113 – 117
G	202 – 210	G	230 – 234
H	211 – 219	H	237 – 242

Fonte: Adaptado de Robertus e Mozingo (2004)

Na tabela estão listadas as principais conformações estruturais secundárias presentes na RTA. 8 hélices- α identificadas de A-H e 8 folhas- β identificadas de A-H. A coluna de 'Resíduos' indica a posição, da posição N-terminal para a posição C-terminal, de quais resíduos de aminoácidos constituem cada estrutura secundária da RTA.

De forma geral, as RIPs possuem a estrutura secundária de seus domínios N e C terminais bem conservados apresentando pequenas diferenças entre si. O domínio N terminal, maior dos dois domínios, consiste em seis α -hélices e seis β -folhas. O domínio C terminal, com menor tamanho entre os dois, possui uma β -folha antiparalela e uma α -hélice com uma torção na região mediana. O bolsão catalítico também é uma região bastante conservada entre as RIPs já catalogadas e fica localizado entre os domínios C e N terminais. A manutenção da conformação tridimensional dessas enzimas somente é possível graças a ligações de hidrogênio entre os seus domínios N e C terminais (SHI *et al.*, 2016).

Os resíduos de aminoácidos da ricina que são conservados em outras RIPs são Tyr21, Phe24, Arg29, Tyr80, Tyr123, Gly40, Ala165, Glu177, Ala178, Arg180, Glu208, Asn209 e Trp211. Sendo destes, Tyr80, Tyr123, Glu177, Ala178, Arg180, Glu208, Asn209 e Trp211 resíduos que se encontram no sítio catalítico da RTA. A atividade rRNA-*N*-glicosidase é efetivamente ligada aos resíduos de Tyr80 e Tyr123. Os resíduos de Glu177 e Arg180 também aparentam ter uma atividade importante para o funcionamento do sítio catalítico da RTA (ROBERTUS e MOZINGO, 2004).

1.5 Atividades e potencial biotecnológico das RIPs

Desde a descoberta dessas moléculas tóxicas, já foram relatadas diversas atividades biológicas secundárias. Dentre as atividades enzimáticas mais relevantes foram descritas as atividades quitinásica (SHIH *et al.*, 1997), superóxido dismutase (LI *et al.*, 1997) e atividade DNásica (RUGGIERO *et al.*, 2007). Devido à presença destas atividades enzimáticas, pressupõe-se que as RIPs estão intrinsicamente ligadas a mecanismos de defesa vegetal contra infecções bacterianas, virais e fúngicas. Acredita-se ainda que elas possam ter um papel fundamental no processo de senescência foliar (STIRPE *et al.*, 1996). Dentre tantos potenciais usos, a principal tendência para essas moléculas tóxicas se concentra na sua atividade terapêutica no tratamento de doenças humanas. Uma das áreas de maior interesse para a saúde humana é a utilização dessas toxinas no tratamento de câncer como relatados nas revisões de Zeng *et al.* (2015) e de Tyagi *et al.* (2015). Diversas RIPs tipo 1 e tipo 2 já demonstraram atividade antineoplásica *in vitro* como listado na Tabela 3.

Tabela 3 – Atividade anti-tumoral de RIPs tipo I e tipo II.

RIP Tipo I	Tipo De Tumor	Linhagem Celular	Referência
<i>Trichosanthin</i>	Câncer de mama	MDA-MB-231a e MCF-7	(FANG <i>et al.</i> , 2012)
	Linfoma	CEM, Hut-78, Raji, e Daudi	(WANG <i>et al.</i> , 2007)
	Câncer de cólon	CT-26; LoVo	(HUANG <i>et al.</i> , 2010; Gao <i>et al.</i> , 2010)

	Leucemia	Molt-4 e Jurkat; K562	(WANG <i>et al.</i> , 2007; KONG <i>et al.</i> , 1998)
RIP Tipo I	Tipo De Tumor	Linhagem Celular	Referência
<i>Momordica anti-HIV proteina de 30 kDa</i>	Câncer de bexiga	T24	(SHI <i>et al.</i> , 2020)
	Câncer de mama	MDA-MB-231a; BT20;	(LEE-HUANG <i>et al.</i> , 2000; LEE <i>et al.</i> , 1995; QIU <i>et al.</i> , 2014)
	Carcinoma epidermóide	A431	(LEE <i>et al.</i> , 1995)
	Glioma	U87MG	(LEE <i>et al.</i> , 1995)
<i>Saporina</i>	Leucemia	NALM-6a; HSB-2a; CCRF CEMa	(FLAVELL <i>et al.</i> , 1995; MORLAND <i>et al.</i> , 1994)
	Glioma	U87MG	(ADWAN <i>et al.</i> , 2014)
	Linfoma	Ramos, Rajia, Daudi, DOHH-2, e Granta 519, SUDHL-4; HDLM2, KM/H2, e L428	(KATO <i>et al.</i> , 2012; VOOJIS <i>et al.</i> , 1997)
	Câncer de ovário	PA-1 ^a	(BEITZ <i>et al.</i> , 1992)
<i>α-Sarcina</i>	Astrocitoma	251-MG	(TURWAY <i>et al.</i> , 1993)
	Câncer de pâncreas	Patu II	(TURWAY <i>et al.</i> , 1993)
	Câncer de bexiga	EJ	(WAWRZYNCZAK <i>et al.</i> , 1991)
	Câncer de cólon	HT29 e BCS-TC2; SW1222	(TURWAY <i>et al.</i> , 1993; CARRERAS-SANGRA <i>et al.</i> , 2012)
<i>Curcina</i>	Câncer de pulmão	NCL-H446	(LUO <i>et al.</i> , 2006)
	Câncer gástrico	SGC-7901	(LUO <i>et al.</i> , 2006)
	Sarcoma	S-180	(ZHAO <i>et al.</i> , 2012)
RIP Tipo 2	Tipo De Tumor	Linhagem Celular	Referência
<i>Abrus aglutinina</i>	Hepatoma	HepG2a	(MUKHOPADHYAY <i>et al.</i> , 2014)
<i>Momordica charantia lectina</i>	Câncer de nazofaringe	CNE1 e CNE2	(FANG <i>et al.</i> , 2012)
<i>Articulatin-D</i>	Leucemia	Jurkat, Molt-4, e HL-60	(DAS <i>et al.</i> , 2011)

Fonte: adaptado de Zeng *et al.*, 2015.

A tabela mostra uma lista resumida de RIPs tipo I e II que possuem a capacidade de levar a morte celular linhagens de células cancerígenas *in vitro*.

Outra importante aplicação na saúde humana é a utilização da atividade antiviral da *trichosanthin* em teste anti-HIV 1 em células C8166. Foi ainda descrito que a subunidade A da *shiga toxin* inibe a replicação do vírus da imunodeficiência Bovina (Ng et al., 2010).

1.6 A espécie *Jatropha podagrica* Hook.

O gênero *Jatropha* (Euphorbiaceae) possui aproximadamente 175 representantes distribuídos entre plantas suculentas, arbustos e árvores. Independentemente da espécie, extratos de diferentes partes de plantas do gênero como folhas, ramos, raízes e cascas vêm sendo utilizadas pela medicina popular (SHARMA e SINGH, 2012).

As plantas desse gênero caracterizam-se por serem em sua maioria monoicas, raramente apresentando indivíduos dioicos. Apresenta exsudato claro, esbranquiçado, possuindo diversas substâncias tóxicas na seiva e nas suas sementes. Folhas em posição alterna, usualmente de formato digitiforme. Seu tegumento possui tricomas simples ou glandulares. Flores se dispõem usualmente em inflorescências das quais somente uma possui pistilo. Possui 5 sépalas livres que se sobrepõem nas suas bordas e possui 5 pétalas livres. Os frutos são capsulares e deiscentes (SHARMA e SINGH, 2012).

A *Jatropha podagrica* é uma planta arbustiva de tronco curto e inchado na sua base, com inflorescências vermelhas e que florescem durante todo o ano. Suas folhas são digitiformes com 3 a 5 lobos (NPARKS, 2021). A *J. podagrica* é comumente encontrada nos continentes Latino Americano, Africano e Asiático. Essa planta é utilizada pela medicina popular no combate de várias doenças como infecções cutâneas e doenças sexualmente transmissíveis (AIYELAAGBE et al., 2012, 2007). Foram isolados das raízes da *J. podagrica* 6 diterpenoides, dois em especial denominados japodagrina e japodagrone, possuem suas estruturas resolvidas e

atividades bactericida avaliadas. Japodagrina apresentou atividade bactericida contra *Bacillus subtilis* e *Stafilococcus aureus*. Japodagrone apresentou atividade bactericida contra *Bacillus subtilis* (AIYELAAGBE *et al.*, 2007). Apesar de já serem descritas atividades biológicas relacionadas a *J. podagrica* como atividade antitumoral, bactericida, inseticida e fungicida (LIU *et al.*, 2014). Pouco foi estudado sobre o *pool* proteico e as atividades biológicas relacionadas as proteínas de *J. podagrica*, tendo apenas dois peptídeos isolados da seiva de *J. podagrica* denominados Podacycline A e B (VAN DEN BERG *et al.*, 1996).

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Isolar e caracterizar uma Proteína Inativadora de Ribossomo (RIP) de *Jatropha podagrica* Hook. Em adição, testar suas possíveis atividades biológicas *in vitro*.

2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um protocolo de extração de proteínas das sementes da espécie *J. podagrica*;
- Isolar e purificar a RIP da semente de *J. podagrica*;
- Avaliar a integridade e o grau de pureza da RIP isolada por métodos bioquímicos e biofísicos;
- Caracterizar a estrutura secundária da RIP;
- Avaliar as atividades biológicas (RNA *N*-glicosidase; toxicidade, inibição da síntese proteica e atividade anti-helmintica) da RIP isolada;
- Produzir de anticorpos policlonais anti-RIP.

3 MATERIAIS

3.1 Vegetal

As sementes de *J. podagrica* Hook. foram coletadas de frutos maduros, na safra que ocorre no período compreendido entre os meses de junho e agosto. Depois de removidas dos frutos, as sementes foram lavadas com água destilada, secadas por 16 h a 30 °C em estufa de secagem e armazenadas a temperatura média de 12 °C até a utilização. A espécie vegetal utilizada no presente trabalho foi devidamente cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen (No. processo ADA415C).

3.2 Animal

Nos ensaios de toxicidade foram utilizadas larvas de *Artemia salina* L., um microcrustáceo da classe Anostracea (*Brine Shrimp Test*), na forma de metanúplios. Nos ensaios biológicos, também foram utilizados a linhagem de *Pichia pastoris* KM71H (*Thermo Fisher Scientific*) e helmintos adultos de *Ascaridia galli* (cedidos pela UFMG).

3.3 Reagentes

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

4 METODOLOGIA

4.1 Preparação da farinha de semente de *J. podagrica*

Após a coleta, as sementes das espécies selecionadas foram limpas, destegumentadas e fragmentadas para serem submetidas aos processos de delipidação (com hexano) (1:5 m/v) por 6 horas, com trocas a cada 2 h. Após esse processo, o material foi submetido a secagem por até 12 h a 25 °C. Em seguida, o material foi novamente triturado e peneirado até a obtenção de um pó fino e homogêneo. O rendimento foi calculado e a farinha foi acondicionada em tubos de centrifuga de 15 mL a 25 °C.

4.2 Obtenção do extrato proteico da farinha de *J. podagrica*

Depois de peneiradas, a farinha foi submetida à extração (1: 10 m/v) de proteínas utilizando diferentes tampões: Glicina 20 mM pH 2,6; Acetato de sódio 20 mM pH 4,0; Fosfato de sódio 20 mM pH 6,0; Tris-HCl 20 mM pH 7,4 e Borato 20 mM pH 9,0, todos contendo NaCl 150 mM. Cada extração durou três horas e foi realizada sob agitação a 10 °C. Em seguida, os extratos brutos (denominados EBs) foram centrifugados a 12.000 x *g*, por 30 minutos a 5 °C, e então filtrados e utilizados nos ensaios de dosagem de proteínas e de atividade hemaglutinante.

4.3 Dosagem de proteínas solúveis

As dosagens de proteínas dos EBs foram realizadas conforme a metodologia de Bradford (1976). Para cada 100 µL de EB, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. As misturas foram agitadas e mantidas em repouso por 10 minutos a 25 °C. Em seguida, foi medida da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas nos EBs foi calculada a partir de uma curva padrão obtida com BSA.

4.4 Avaliação da atividade hemaglutinante dos EBs

Neste ensaio foram utilizadas hemácias de coelhos adultos e sadios. Antes dos ensaios, o sangue coletado foi lavado quatro vezes com uma solução salina (NaCl 150 mM) para remover o plasma, os glóbulos brancos e o anticoagulante, deixando apenas as células vermelhas (hemácias). A atividade hemaglutinante dos EBs foi avaliada conforme a metodologia descrita por Moreira e Perrone (1976). Esse ensaio foi realizado em placa de microtitulação através de diluições seriadas. Resumidamente, 50 µL de cada EB (concentração de 1 mg/mL em NaCl 150 mM) analisado foi adicionado separadamente a igual volume de uma solução de NaCl 150 mM e desta mistura foram feitas diluições seriadas. Às diferentes diluições proteicas, foram adicionados 50 µL de uma suspensão de hemácias de coelho a 2 %. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 30 minutos, seguidos de mais 30 min a temperatura ambiente. A aglutinação foi observada a olho nu. A quantidade de proteína presente na maior diluição capaz de hemaglutinar representa a quantidade mínima de proteína necessária para aglutinar os eritrócitos e é definida como unidade de hemaglutinação (UH). A atividade específica é o número de unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína (UH/mgP).

4.5 Precipitação das proteínas do EB de *J. podagrica* com sulfato de amônio

O extrato bruto das sementes obtido com Tris-HCl 20 mM pH 7,4 foi submetido à precipitação com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, utilizando 60% de saturação conforme a metodologia utilizada por Lin *et al.* (2010). O extrato saturado com sulfato de amônio foi mantido em repouso por 6 h a 5 °C e em seguida, centrifugado a 12000 x g por 20 min. O precipitado foi coletado, solubilizado com o tampão de extração, dialisado por 12 h contra água destilada e por mais 4 h com o tampão PBS pH 7,4. Essa fração solubilizada (denominada Fr0/60) foi submetida à dosagem de método de Bradford (1976).

4.6 Purificação da RIP de *J. podagrica*

A fração Fr0/60 foi aplicada em uma coluna contendo a matriz Sephadex G-100 (0,8 x 100 cm), previamente equilibrada com tampão PBS pH 7,4 conforme a metodologia descrita por Lin *et al.* (2010). Em seguida, a matriz 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).

4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)

As frações cromatográficas da Fr 0/60 de *J. podagrica* foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras conforme a metodologia de Laemmli (1970), com modificações. Foi utilizado um gel de aplicação de 3,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) e um gel de separação com 12,5 % de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 8,8) contendo SDS 1%. A mobilidade eletroforética foi realizada a 25 mA e uma voltagem inicial de 100 V. As amostras foram preparadas em tampão Tris-HCl 62,5 mM (pH 8,3) contendo SDS 1%, β -mercaptoetanol 0,1%, sacarose e azul de bromofenol 1%. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 10 minutos e centrifugadas a 1.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. As bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 a 0,05 %, preparado em uma solução de metanol: ácido acético:água (1:3,5:8, v/v/v). Foram utilizados diferentes marcadores moleculares da *Ambresco*®.

4.8 Atividade rRNA *N*-glicosidase *in vitro* dos EBs

Os ribossomos de levedura (*Pichia pastoris*) foram obtidos conforme a metodologia descrita por Smith e colaboradores (2003). Resumidamente, 5 mL de um pré-inóculo (contendo a levedura) em meio YPD foi incubado a 37 °C, overnight, sob agitação (250 rpm). Esse pré-inóculo foi diluído em 500 mL de meio YPD suplementado com sacarose (2 %), adenina e uracila (0,2 %). As células foram crescidas a 37 °C, sob agitação de 250 x g até atingir uma D.O_{600nm} = 1 (cerca de 12 h). Uma vez atingida tal densidade, a cultura foi centrifugada, 5000 x g por 10 minutos, a 4 °C. O precipitado obtido foi lavado (3X) com água estéril RNase free e ressuspensão em 4 mL do tampão de lise (Tris-HCl 200 mM, pH 9,0, contendo KCl 200 mM, sacarose 200 mM, MgCl₂ 25 mM, EGTA 25 mM e β -mercaptoetanol 0,01%). Ao tubo contendo as células foi adicionado igual volume de “pérolas de vidro” para romper a parede celular através de agitação vigorosa por 10 minutos. A ressuspensão foi centrifugada

a 1.250 x g por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado a 20.000 x g por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi novamente coletado e submetido a uma ultracentrifugação de 100.000 x g por 1 h, a 4 °C. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo os ribossomos foi ressuspenso em 100 µL do tampão Endo (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 com KCl 25 mM e MgCl₂ 5 mM) e estocado (-80 °C) em alíquotas com 10 µg/µL de concentração.

A avaliação da atividade rRNA-*N*-glicosidase da fração cromatográfica referente ao pico 4 foi realizada conforme a metodologia descrita por Juri Ayub *et al.* (2008). Para esse ensaio, 3 µL de ribossomos de levedura (10 µg/µL) foram incubados a 30 °C por 1 h com 15 µL da podagrina (concentração de 1 mg/mL de PBS pH 7,4) em uma reação final contendo 50 µL do tampão Endo (Tris-HCl 250 mM pH 7,6; KCl 250 mM e MgCl₂ 50 mM) e 2 µL de *Ribonuclease Vanadyl Complex* (Biolabs), em um volume final de 500 µL. A reação foi interrompida pela a adição de SDS 1%. O RNA ribossomal foi obtido através da extração com reagente Trizol® (Invitrogen) conforme as instruções do fabricante. O RNA extraído foi ressuspenso em 20 µL de água ultrapura estéril e, em seguida, 10 µL desse foi misturado com 50 µL de anilina-acética pH 4,5 (1 anilina: 1,6 ácido acético: 7,4 H₂O ultrapura v/v/v) e incubado por 4 min, a 60 °C em banho-seco. Após a incubação, a reação foi interrompida pela a adição de 0,1 volume de acetato de amônio 2 M e 3 volumes de etanol 100% gelado. As amostras foram centrifugadas por 20 min, a 10000 x g, a 5 °C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados de RNA foram ressolubilizados em 15 µL de tampão Tris-Fosfato-EDTA (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 de agarose-formamida (1%), utilizando brometo de etídio e visualizados sob luz UV no transluminador. Como controle positivo foi utilizada a RIP tipo 2 ricina (Sigma). Como controle negativo, uma alíquota da reação da ricina foi processada com a adição água ultrapura no lugar da anilina-acética.

4.9 Dicroísmo circular

A avaliação do padrão conformacional da podagrina foi feita utilizando a técnica espectrofotométrica de dicroísmo circular (CD). As medidas de CD foram

realizadas em um espectropolarímetro J-815 (JASCO). Inicialmente foi utilizada uma alíquota de 100 µL do tampão PBS pH 7,4 contendo 20 µg da podagrina. As medidas foram feitas numa cubeta de quartzo com 1 mm de caminho ótico, à temperatura controlada de 25 °C. Primeiro, foi obtido um espectro do branco, ou seja, apenas da solução do tampão de solubilização da proteína, para que não houvesse interferência do tampão. As contribuições do tampão, obtidas sob condições idênticas, foram subtraídas e todos os espectros de CD foram corrigidos a fim de eliminar quaisquer efeitos de ruído. Foi feita então, uma varredura de 200 a 250 nm aplicando a velocidade de 50 nm/min, registrando 8 acumulações.

Todos os espectros de dicroísmo circular foram corrigidos com a subtração dos espectros do tampão utilizado e os dados gerados com a subtração desses espectros foram convertidos em elipticidade molar por resíduo, $[\theta]$, dado em graus cm² dmol⁻¹, calculado de acordo com a equação:

$$[\theta] = (\varphi \text{ MRW}) / (10 \text{ c l})$$

Onde φ é a elipticidade (em graus), MRW é o peso médio do resíduo, c é a concentração da proteína em g/mL e l é o caminho óptico em cm

A predição quantitativa das contribuições da estrutura secundária foi realizada pela desconvolução dos espectros de CD usando o programa SELCON 3, desenvolvido por Sreemana e Woody (2000). Outros programas utilizados para processar os dados foram Spectra Manager™ II e Origin®.

4.10 Avaliação da termoestabilidade da podagrina via CD

A técnica de CD também foi aplicada para a termoestabilidade da podagrina, utilizando um intervalo de temperatura de 20 a 90 °C. Neste ensaio também foi uma alíquota de 100 µL do tampão PBS pH 7,4 contendo 20 µg da podagrina. Os espectros foram obtidos a cada 5 °C, utilizando um tempo médio de equilíbrio de 2 min. O sinal de CD a 217 nm ($\theta_{217\text{nm}}$) foi utilizado para monitorar o efeito da temperatura e determinar a temperatura de transição para o estado desenovelado da proteína.

4.11 Ensaio de fluorescência intrínseca

As medidas de emissão da fluorescência foram feitas a 25 °C em um espectrofluorímetro Hitachi modelo FP-777. As amostras de podagrina foram excitadas em 295 nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 300 a 450 nm, usando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. A concentração final da podagrina usada nos ensaios foi 50 µg/mL. Após a coleta, foi feita a subtração do espectro do tampão a fim de excluir a interferência do espalhamento de luz. Em todas as medidas, foram usados filtros ópticos de 295 nm no compartimento de emissão do equipamento.

4.12 Ensaio de inibição da síntese proteica em sistema livre de células

O ensaio de inibição da síntese proteica com a podagrina foi realizado utilizando o kit *TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems* (Promega). Neste ensaio foram utilizadas diferentes concentrações da proteína (1, 10, 20 e 50 µg). Como controle negativo, apenas o tampão PBS foi adicionada a reação. Como controle positivo da reação de inibição, foi utilizada a ricina comercial (*Sigma-Aldrich*). As reações contendo a podagrina, 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 seg de tempo retardado e 20 seg 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.

4.13 Atividade anti-helmíntica

Esse ensaio foi realizado utilizando helmintos adultos, machos e fêmeas de *Ascaridia galli* cedidos pela UFMG. Os helmintos de tamanho entre 5 a 6 cm foram selecionados e lavados em solução salina 0,9%, e aqueles considerados ativos foram transferidos para placas de Petri descartáveis (150 × 15 mm), contendo solução Tyrode (KALEYSA, 1974) pré-aquecida (37 °C), totalizando 10 nematoides por placa. A seguir, foram adicionadas alíquotas da podagrina (nas concentrações de 1; 2; 3; 4 e 5 mg/mL). Os nematoides foram mantidos em estufa BOD, à temperatura de 37±1

°C, e examinados 6, 24, 48 e 72 h após o tratamento. Os nematoides imóveis, mesmo após breve pressão com agulha estéril, foram considerados mortos (SHILASKAR; PARASAR, 1985). O experimento foi realizado em triplicata para cada dose e a porcentagem de parasitas mortos em cada grupo foi calculada. Foram usados dois controles negativos constituídos por água e solução salina 0,9% e um controle com a droga referência, citrato de piperazina (5 mg/mL), administrada conforme as instruções do fabricante (Proverm Tortuga).

4.14 Produção de anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais (IgGs) específicos para a podagrina foram produzidos em um coelho machos adultos, da raça Nova Zelandia (com cerca de 8 meses. 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 (100 µg) e o adjuvante completo de Freund (1:1; v/v). Após 21 dias, foi administrada subcutaneamente, no dorso, as doses-reforço de iguais conteúdos proteicos emulsionados em adjuvante incompleto de Freund (1:1; v/v). O sangue coletado foi mantido em repouso por 1 h a 37 °C e o soro obtido, foi centrifugado a 4000 x g por 10 min. As sangrias dos animais foram feitas em intervalos de 7 dias até o 42º dia após a primeira imunização. Os soros coletados foram submetidos a fracionamentos com sulfato de amônio com 33 % de saturação, para obtenção da fração rica em imunoglobulinas. Esta fração foi posteriormente submetida à diálise sequencial usando-se água e PBS pH 7,4. Em seguida a fração foi centrifugada a 15000 x g, 20 min, a 4 °C, e o precipitado descartado. O sobrenadante foi submetido à cromatografia, de Sepharose-proteína A, previamente equilibrada contra PBS pH 7,4. A fração não-retida foi eluída com mesmo tampão. A fração retida (anticorpos antipodagrina) foi eluída com o tampão glicina 100 mM pH 2,6 contendo NaCl 150 mM. Essa fração foi dialisada com PBS 7,4, concentrada por dialofiltração e utilizada nas etapas posteriores de quantificação e avaliação da síntese dos anticorpos produzidos.

4.15 Western Blotting

Os anticorpos policlonais anti-podagrina foram produzidas em um coelho macho adulto, da raça Nova Zelândia (com 8 meses de idade) e purificados nas dependências do Grupo de Biotecnologia Molecular e Estrutural (GBME). Para ensaio de imunodeteção foi utilizada a técnica de *Western blotting*. Inicialmente, a podagrina foi submetida a uma SDS-PAGE (12,5%). Após a eletroforese, a banda proteica da RIP foi transferida para uma membrana de nitrocelulose utilizando PBS pH 7,4 como tampão de transferência. Os parâmetros utilizados para a transferência foram 38 mA, 40 V e 2 h. Após a transferência, a membrana foi incubada em PBS pH 7,4 com 5% de leite desnatado 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-podagrina). Após a incubação, a membrana foi lavada com o tampão PBS e incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG conjugado com a peroxidase) por mais 2 h, a 8 °C. O processo de revelação da membrana foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio 30%, cloreto de níquel e tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,2, no escuro e a temperatura ambiente.

4.16 Teste de toxicidade da podagrina com *Artemia salina*.

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

mesmas concentrações da podagrina. Após 24 h, foi calculado o percentual de mortalidade (MCLAUGHLIN *et al.* 1998).

4.17 Análise estatística

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Extração de proteínas das farinhas de sementes

Após os processos coleta, limpeza das sementes, destegumentação, trituração dos cotilédones e delipidação, o rendimento da farinha produzida foi 844 ± 22 mg de farinha/g de semente.

Quando a farinha processada de sementes de *J. podagrica* foi submetida à extração de proteínas solúveis em diferentes valores de pH, os maiores teores proteicos determinados pelo método de Bradford foram obtidos quando a extração foi realizada em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 com NaCl 150 mM (Tabela 4).

Tabela 4 – Dosagem de proteínas solúveis extraída das farinhas de sementes sob diferentes condições pH.

Tampão	mg de Proteína/g de Farinha*
Glicina pH 2,6	$11,4 \pm 0,3$
Acetado pH 4,0	$13,0 \pm 0,9$
Fosfato pH 6,0	$15,2 \pm 0,7$
Tris-HCl pH 7,4	$22,0 \pm 0,5$
Borato pH 9,0	$18,0 \pm 1,0$

Fonte: Autor

* A determinação foi realizada pelo método de Bradford

Sabe-se que a solubilidade de uma proteína é afetada pela: carga líquida, somatório das cargas de todos os resíduos de aminoácidos que a compõe, pelo seu tamanho e pela conformação tridimensional. O fator com maior influência na carga líquida das proteínas em solução é o pH da solução. Em geral, proteínas são mais solúveis em pH baixos (ácidos) ou elevados (alcalinos) devido ao excesso de cargas de mesmo sinal, as quais irão produzir repulsão entre as moléculas, o que diminui a formação de agregados (devido às interações eletrostática) e contribui para uma maior solvatação (MORAES *et al.*, 2013; NELSON COX, 2014).

5.2 Atividade hemaglutinante dos extratos das farinhas (EBs)

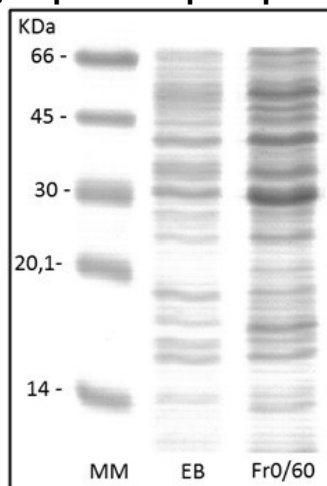
Ao contrário da RIPs tipo 1, as RIPs tipo 2 geralmente são capazes de aglutinar eritrócitos devido à presença de uma subunidade lectínica. A subunidade A com atividade rRNA *N*-glicosidase é ligada (por meio de uma ligação dissulfeto) a subunidade B que possui à atividade lectínica, geralmente com afinidade a resíduos de galactosil, que permite a aglutinação de eritrócitos (Stirpe, 2013). Desta forma, um simples ensaio de atividade hemaglutinante frente a hemácias pode ser utilizado para detectar a presença de RIPs do tipo 2. Como resultado, nenhum dos EBs da farinha de sementes de *J. podagrica* foi capaz de aglutinar os eritrócitos testados, evidenciando a ausência de RIPs tipo 2.

5.3 Precipitação com Sulfato de Amônio

A determinação de proteínas solúveis mostrou que EB (pH 7,4) precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% (denominada Fr0/60) apresentou um conteúdo proteico de 2,05 mg por grama da fração precipitada. Lin *et al.* (2010) obtiveram um valor menor em sementes de *J. curcas* (1,17 mg de proteína por grama da fração proteica precipitada) nas mesmas condições, quando analisada pela metodologia proposta por Lowry *et al.*, (1951). Essa diferença 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 (ZAIA *et al.*, 1998). O sulfato de amônio, usado na precipitação de proteínas, é um interferente no método de Lowry e pode ter sido, também, um motivo do menor valor de concentração proteica quando foi utilizado este método. O sulfato de amônio, na concentração maior que 15%, diminui a absorvidade devido ao aumento do pH da amostra (FRYER *et al.*, 1986; ZAIA *et al.*, 1998).

Alíquotas do EB (pH 7,4) e da fração Fr0/60 foram submetidas a eletroforese (SDS-PAGE) para comparar o perfil proteico das duas amostras. Conforme pode ser observado na figura 4, a precipitação com sulfato de amônio permitiu uma concentração significativa das proteínas solúveis totais presentes no extrato bruto da farinha de sementes de *J. podagrica*.

Figura 4 – SDS-PAGE (12,5%) do extrato bruto da farinha de sementes de *Jatropha podagrica* e da fração proteica precipitada com sulfato de amônio.



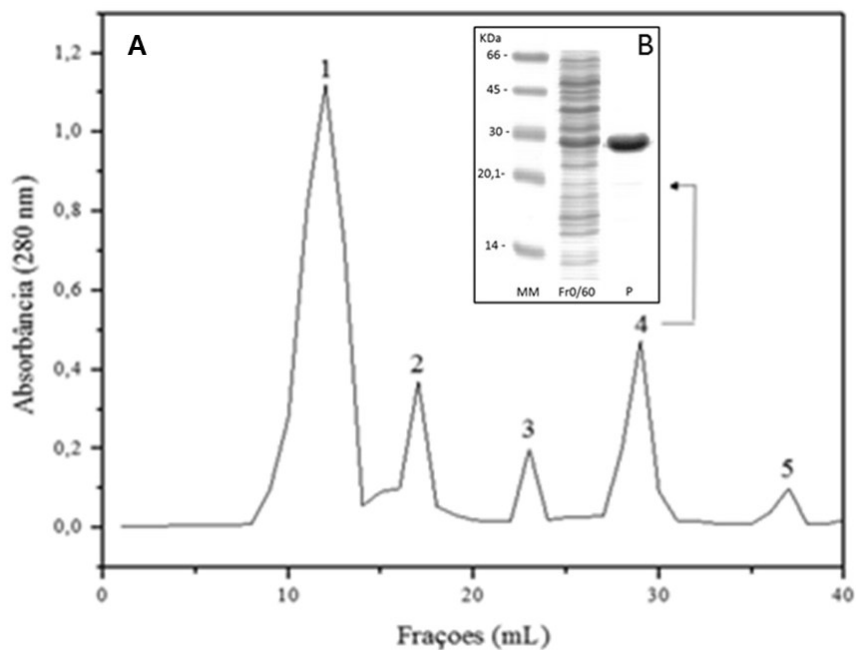
Fonte: Autor

MM – Marcadores moleculares; EB – Extrato bruto obtido com Tris HCl pH 7,4; Fr0/60 – Fração proteica saturada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60%. Foram aplicados no gel, 20 μL de cada amostra analisada

5.4 Purificação da RIP de sementes de *J. podagrica*.

Quando submetida a cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-100, a fração Fr0/60 foi separada em cinco picos proteicos com diferentes padrões de absorbância (Figura 5A). Esse procedimento cromatográfico mostrou-se mais eficiente na separação das proteínas do que o utilizado por Lin *et al.* (2010) os quais purificaram curcina a partir de semente de *Jatropha curcas*, utilizando a mesma matriz, observaram a presença de apenas dois picos proteicos. A análise eletroforética da fração correspondente ao pico cromatográfico 4 mostrou a presença de uma única banda proteica de peso molecular aparente de 29 KDa (Figura 5B). Esse peso molecular corresponde ao valor citado na literatura para a curcina, uma RIP tipo 1 presente em sementes de *J. curcas* (Lin et al., 2010).

Figura 5 – Purificação da RIP tipo 1 de sementes de *Jatropha podagrica*. (A)

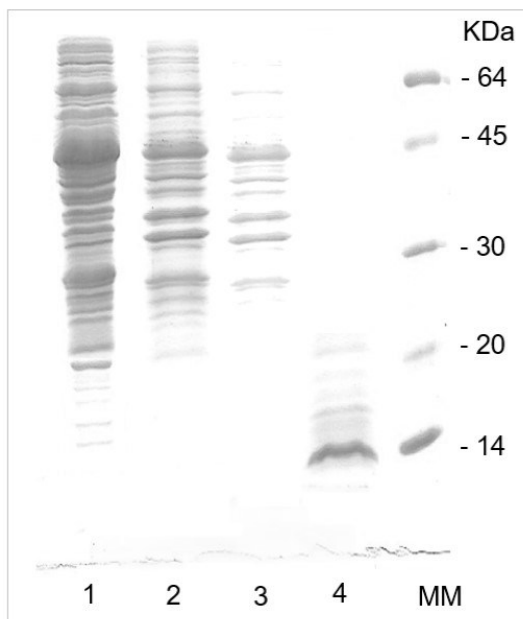


Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex-G100. A matriz foi equilibrada e eluída com o tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M. O fluxo usado foi de 1 mL/min e coletando frações de 2 mL. **(B)** SDS-PAGE (15 %) sob condições redutoras. Aliquotas de 15 μ L da fração proteica Fr0/60 obtida do extrato da farinha de sementes de *Jatropha podagrica* e da podagrina (P) foram aplicadas no gel.

Fonte: Autor

As frações referentes os picos cromatográficos 1, 2, 3 e 5 foram descartadas por apresentarem bandas proteicas contaminantes e por não terem os pesos moleculares compatíveis com RIP tipo 1 (Figura 6).

Figura 6 – SDS-PAGE (15%) das frações cromatográficas referentes aos picos 1, 2, 3 e 5 da exclusão molecular.



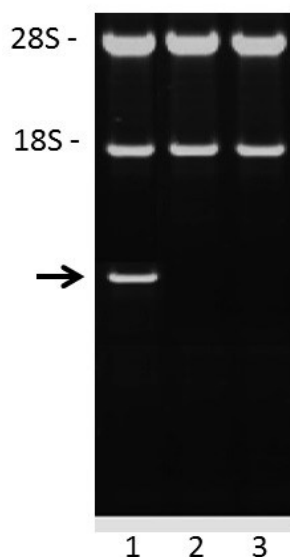
Fonte: Autor

1) Fração do pico 1; 2) Fração do pico 2; 3) Fração do pico 3; 4) Fração do pico 5 e MM) marcadores moleculares.

5.5 Atividade rRNA-*N*-glicosidase da podagrina.

Na avaliação da atividade rRNA-*N*-glicosidase *in vitro*, a podagrina foi incubada com ribossomos isolados de levedura. Em seguida o RNA ribossomal (rRNA) foi extraído e tratado com anilina. Como resultado, 20 µg da podagrina foi capaz de depurinar o rRNA (Figura 7). Estudos já realizados mostram que a cadeia catalítica das RIPs é capaz de depurinar a subunidade maior do RNA ribossômico, liberando um pequeno fragmento de 130-400 nucleotídeos da porção 3' do rRNA (ENDO e TSURUGI, 1986; 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).

Figura 7 – Análise da atividade RNA-*N*-glicosidase da podagrina através de eletroforese em gel de agarose/formamida..



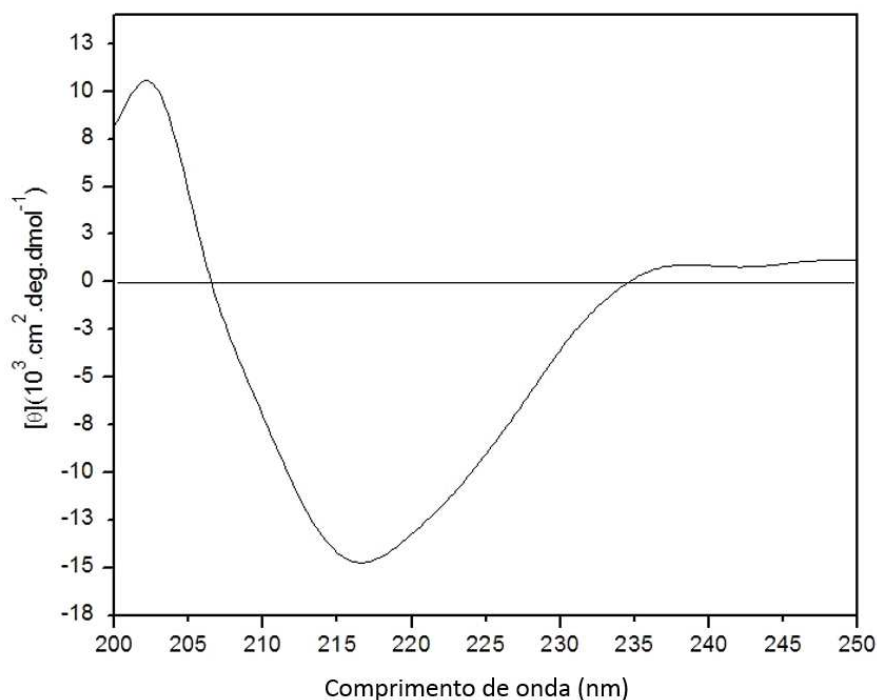
Fonte: elaborada pelo autor.

Colunas: 1) RNA ribossomal de *Pichia pastoris* incubado com 20 μ g da podagrina; 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 a RIP e a anilina

5.6 Análises de Dicroísmo Circular (CD), termoestabilidade e fluorescência da podagrina

Antes dos ensaios para avaliar as atividades biológicas da podagrina, foram realizadas análises de CD para verificar o padrão conformacional da proteína. De acordo com os resultados obtidos, a podagrina apresentou um padrão conformacional característico de enovelamento proteico e com predominância de estruturas folhas- β (Tabela 7). Esse padrão é representado pela presença de uma banda negativa com mínimo em 217 nm e uma banda positiva em torno de 200 nm (Figura 8). Os resultados do CD obtidos são bastante similares aos encontrados para a curcina (LIN *et al.*, 2010) que possui 43,5% de estruturas em β folha, enquanto a podagrina apresenta 41,3% de β folhas em sua estrutura secundária, indicando com isso que ambas as RIPs tipo 1 possuem similaridade elevada.

Figura 8 – Dicroísmo circular da podagrina.



As medidas foram realizadas com 25 µg de podagrina em 100 µL de Tris-HCl 20 mM pH 7,4 com NaCl 150 mM. Os espectros foram obtidos variando o comprimento de onda entre 200 a 250 nm e registrados como uma média de 16 varreduras, a temperatura ambiente (25 °C), utilizando cubeta retangular de caminho óptico de 1 mm.

Fonte: Autor

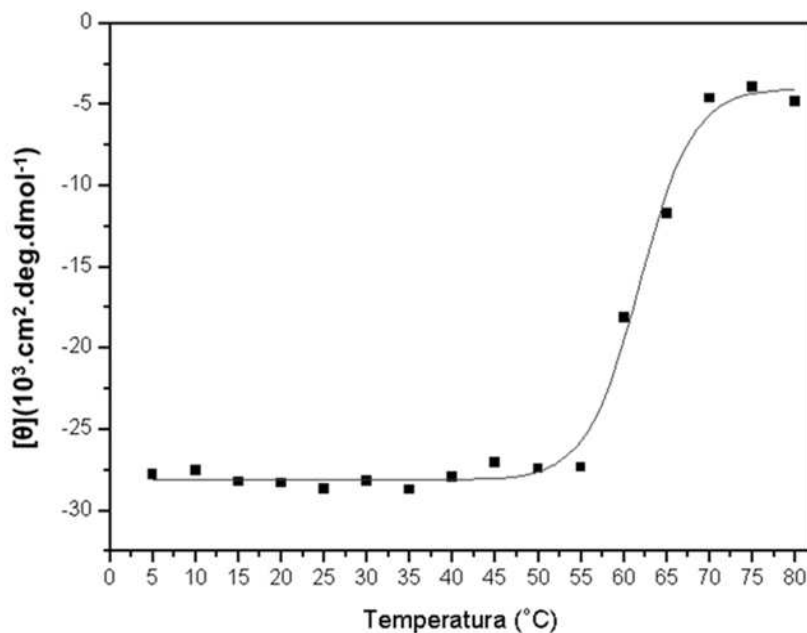
Tabela 7 – Predição da estrutura secundária e da temperatura de *melting* da podagrina.

Estrutura secundária	(%)
Folhas-β	41,3
Hélices-α	23,1
Voltas	20,8
Não ordenadas	10,4
*T_m (°C)	65

Fonte: Autor

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

Figura 9 – Curva de termoestabilidade da estrutura secundária da podagrina obtida a partir dos espectros de dicroísmo circular.



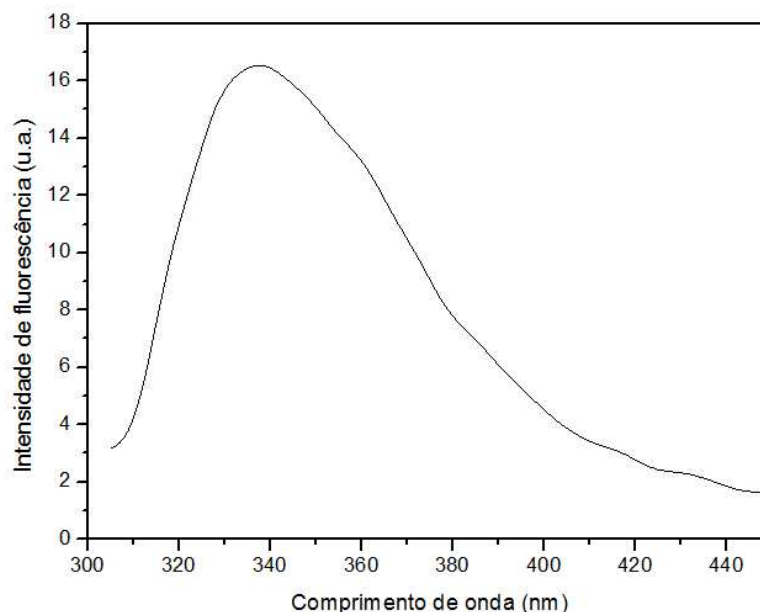
Fonte: Autor

Os dados de CD obtidos da variação térmica foram analisados assumindo-se que este é um processo irreversível de dois estados (nativo e desnaturado) (REYNA e ARANA, 1985). A curva de transição foi determinada em função da temperatura, monitorando-se o ponto em 218 nm. Como resultado, foi observado que a podagrina manteve seu padrão de estrutura secundária praticamente estável até 50 °C (Figura 9). No entanto, mudanças significativas foram observadas a partir da temperatura de 55 °C, sugerindo a perda de estrutura secundária e, conseqüentemente, a desnaturação da proteína. O ensaio de termoestabilidade da podagrina também demonstrou que ela apresenta uma temperatura de *melting* em torno de 65 °C (Tabela 7).

O ensaio de fluorescência intrínseca de uma proteína busca avaliar a emissão natural que alguns aminoácidos (fenilalanina, triptofano e tirosina) possuem ao serem excitados em comprimentos de ondas mais curtos (LACKOWICZ, 1992). Os resultados dos ensaios de fluorescência mostraram que a podagrina apresentou um comprimento de onda de emissão máxima de fluorescência em 340 nm, indicativo da presença de resíduos de triptofano em regiões parcialmente expostas da estrutura

molecular (Figura 10). A ricina apresenta uma emissão máxima em 325 nm indicando uma internalização maior dos resíduos com fluorescência natural (LIN *et al.*, 2010).

Figura 10 – Espectro de emissão de fluorescência da podagrina.

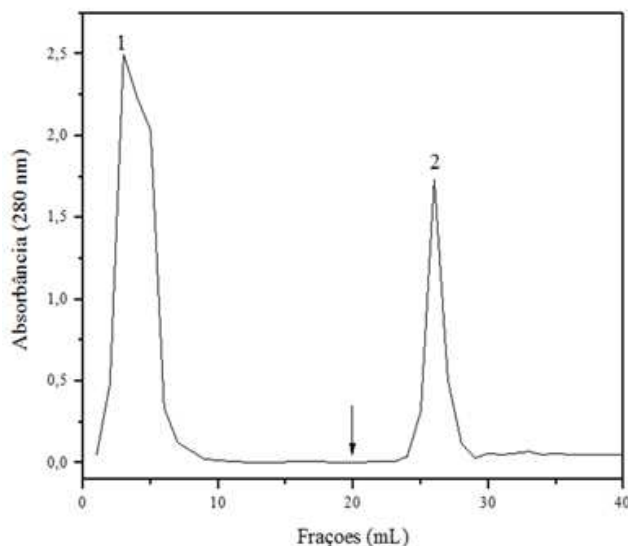


Fonte: Autor.

5.7 Anticorpos policlonais anti-podagrina e ensaios de imunodetecção

Antes de ser utilizado no ensaio de *Western blotting*, o soro obtido após 28 dias de imunização com a podagrina foi submetido ao processo de purificação em coluna de Sepharose-Proteína A (Figura 11). Foram obtidos dois picos cromatográficos: o pico 1 referente as proteínas que não interagiram com a matriz e o pico 2, referente a fração rica em IgG (correspondente a fração anti-podagrina) que interagiu com a matriz e foi eluída por redução do pH. A eletroforese (PAGE-SDS 15%) sob condição redutora mostrou a eficiência do processo de purificação da IgG utilizando a matriz de proteína A (Figura 11). O gel de eletroforese mostrou claramente as duas cadeias (pesada e leve, com 55 e 25 KDa, respectivamente) características das IgGs.

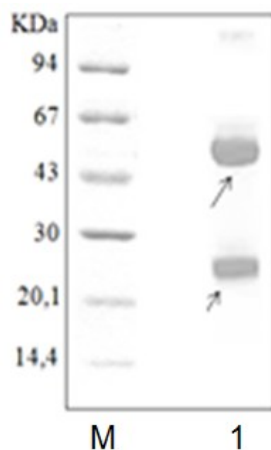
Figura 11 – Purificação do anticorpo policlonal anti-podagrina por cromatografia de afinidade em Sepharose-Proteína A.



Fonte: Autor

A matriz foi equilibrada e a fração não-retida (pico 1) foi eluída com o PBS pH 7,4. A cromatografia foi realizada numa coluna de 10 mL, utilizando um fluxo de 0,5 mL/min e coletando frações de 0,5 mL. A fração retida (pico 2) foi eluída com o tampão glicina 0,1 M pH 2,5 contendo NaCl 0,2 M.

Figura 12 – SDS-PAGE (15%) do anticorpo policlonal anti-podagrina.



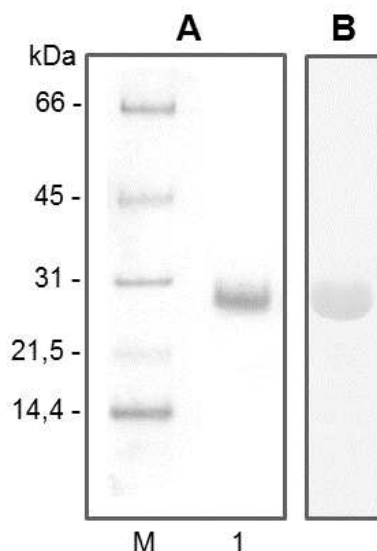
Fonte: Autor

Foi feita sob condições redutoras. Alíquotas de 20 μ L foram aplicadas no gel, sendo: M - marcadores moleculares; 1 - fração referente ao anticorpo anti-podagrina. As setas pequenas indicam as cadeias leves e pesadas dos anticorpos.

O ensaio de *Western blotting*, confirmou a capacidade e eficiência do anticorpo anti-podagrina em reconhecer especificamente a RIP (Figura 13B). Esse demonstra que a podagrina é uma proteína imunogênica e assim como outras RIPS (Ng *et al.*, 2010). A produção de anticorpos específicos é de grande valia para

identificação de podagrina em futuras amostras e no combate de possíveis contaminação com esta RIP.

Figura 13 – Análise da atividade do anticorpo anti-podagrina por *Western blotting*.



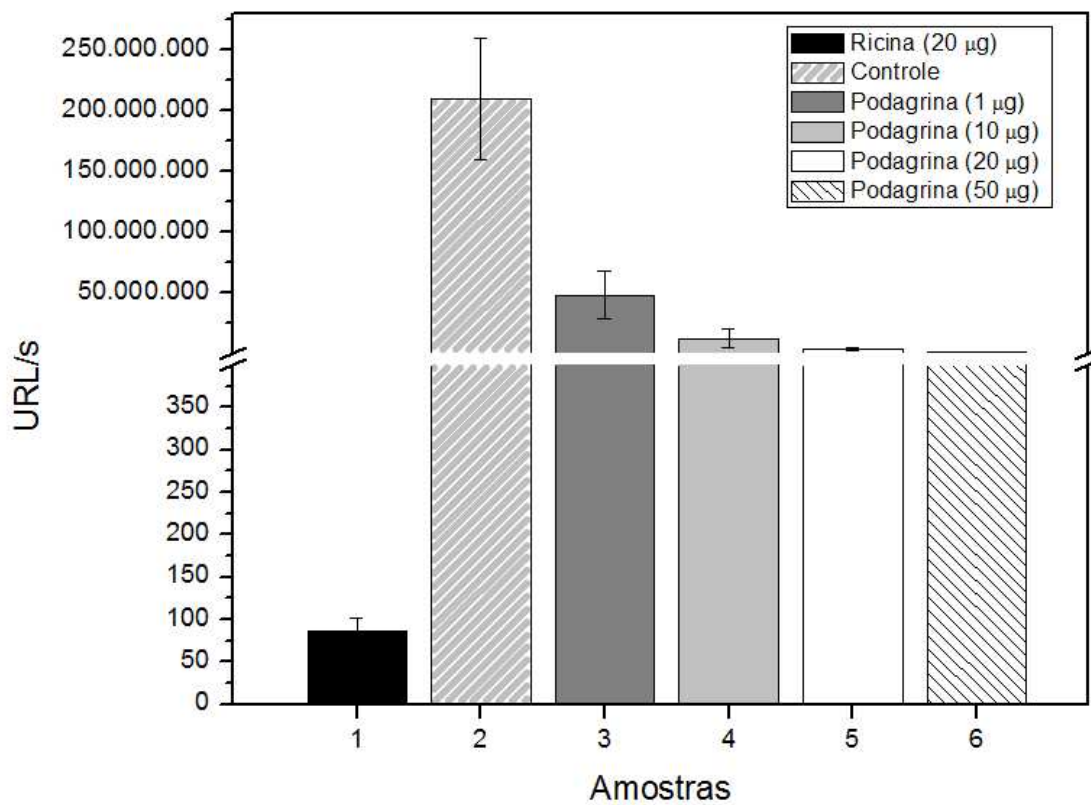
Fonte: Autor

(A) SDS-PAGE (15%): MM-marcadores moleculares e 1- podagrina purificada; (B) *Western blotting* com o anticorpo anti-podagrina.

5.8 Ensaio de inibição da síntese proteica em sistema livre de células

De acordo com os resultados obtidos, foi constatado que a podagrina possui uma atividade inibitória expressiva quando comparada ao controle, mas relativamente baixa quando comparada a RIP tipo 2 ricina, que apresentou quase 100% de inibição na concentração de 20 μg (Figura 14). É sabido 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) (BATTELLI, 2004). Isso pode ser comprovado quando os resultados da podagrina 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 podagrina encontra-se na sua forma bioativa e é capaz de inibir a síntese proteica *in vitro*.

Figura 14 – Inibição da síntese proteica promovida pela podagrina em sistema livre de células (TNT® *Coupled Reticulocyte Lysate System*).



Fonte: Autor

Na ausência das RIPs (coluna 2, controle positivo da síntese proteica) 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 ricina foi utilizada como controle positivo da inibição da síntese proteica.

5.9 Atividade anti-helmíntica da podagrina

A percentagem média de mortalidade nos testes *in vitro*, usando-se diferentes concentrações da podagrina, em diferentes tempos de exposição do parasito a RIP tipo 1, está disposta na Tabela 8.

Tabela 8 – Percentual médio de mortalidade da podagrina sobre *Ascaridia galli*, no teste *in vitro*, ao longo de 72 horas de tratamento.

Amostras	Concentração (mg/mL)	Taxa de mortalidade (%)				
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Água	-	0	0	0	0	0
Piperazina	5	0	12,2 ^a	25,0 ^a	50,0 ^a	100 ^a
	1	0	0	0,3 ^d	3,3 ^c	3,3 ^e
	2	0	0	3,3 ^d	13,3 ^b	16,7 ^d
Podagrina	3	0	3,3 ^c	6,6 ^c	16,7 ^b	40,0 ^c
	4	0	6,6 ^b	16,7 ^b	40,0 ^a	76,6 ^b
	5	0	6,6 ^b	16,7 ^b	40,0 ^a	100 ^a

Fonte: Autor

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

A podagrina começou a apresentar efeito a partir de 12 horas nas concentrações de 3 a 5 mg/mL, sendo esse efeito não muito significativo, quando comparado com o controle positivo. Porém, na 72^a hora, nas concentrações de 4 e 5 mg/mL, houve diferença estatisticamente significativa, considerando-se a podagrina, o controle positivo (piperazina) e o controle negativo (água). A maior concentração da podagrina (5 mg/mL) demonstrou melhor eficiência no combate ao parasito, sendo a taxa de mortalidade de 100%. Quarenta e oito horas pós-tratamento, foi verificado que tanto a podagrina na concentração de 4 mg/mL quanto na concentração de 5 mg/mL, demonstraram efeito anti-helmíntico igual ao da piperazina.

O parasito gastrointestinal *Ascaridia galli* afeta tanto animais selvagens como animais domésticos. Esse processo infeccioso possui um impacto negativo na produção pecuária, devido ocasionar perda de peso nos animais infectados (DAS *et al.*, 2010). Além desse problema, O uso contínuo das drogas existem causam problemas devido a resíduos de drogas em alimentos de origem animal. Devido a essas problemáticas novas moléculas com atividade anti-helmíntica são prospectadas (ABDELQADER *et al.*, 2012).

5.10 Toxicidade contra náuplios de *Artemia salina*

O teste de toxicidade contra náuplios de *A. salina* é uma opção simples e barata para ser realizada em laboratório e obter os primeiros parâmetros de toxicidade de uma molécula (CARBALLO *et al.*, 2002; PERVIN *et al.*, 2006). Testes como esse reduzem a necessidade do uso de animais vertebrados comumente utilizados para o mesmo fim. O resultado obtido mostra uma concentração letal média (CL₅₀) de aproximadamente 500 µg/mL de podagrina para levar a morte 50% dos náuplios de *A. salina* (Tabela 9).

Tabela 9 – Toxicidade da podagrina contra nauplios de *Artemia salina*.

Concentração (µg/mL)	Mortalidade (%)
1000	100 ^a
500	52,8 ± 0,4 ^b
250	20,3 ± 0,2 ^c
125	11,1 ± 0,5 ^d
62,5	1,2 ± 0,7 ^e

Fonte: Autor

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

A CL₅₀ é determinada não somente pela natureza da molécula testada, mas também é influenciada pelo organismo ou linhagem célula no qual estão sendo testados. A curcina apresenta uma CL₅₀ contra as linhagens de câncer de mama SK-BR-3 e MDA-MB-231 de 15,5 e 18,6 µg.mL⁻¹ respectivamente (JARAMILLO-QUINTERO *et al.*, 2015). Já as RIPs de *Phytolacca dioica* L demonstraram CL₅₀ de 1 a 1000 nM contra células HeLa e COLO 320 respectivamente (IGLESIAS *et al.*, 2016). Esses valores auxiliam na preparação de experimentos com animais (camundongos, ratos, coelhos e chimpanzés) e posteriormente humanos (fases clínicas).

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que foi obtido um protocolo eficiente de extração proteica para a *Jatropha podagrica*. Foi também possível isolar e purificar uma proteína das sementes de *J. podagrica*. Conclui-se ainda que essa proteína isolada é uma proteína inativadora de ribossomos do tipo 1, por apresentar características físico-químicas e biológicas similares aos das proteínas dessa classe proteica, tais como: é um monômero, apresenta atividade rRNA *N*-glicosidase; ser capaz de inibir o processo de tradução proteica através de depurinação; apresenta padrões conformacionais semelhantes aos da curcina, outra RIP tipo 1 isolada da espécie *J. curcas*.

REFERÊNCIAS

ABDELQADER, Anas; QARALLAH, Bassam; AL-RAMAMNEH, Diya *et al.* Anthelmintic effects of citrus peels ethanolic extracts against *Ascaridia galli*. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1-2, p. 78–84, 2012.

ADWAN, Hassan; BAYER, Helene; PERVAIZ, Asim *et al.* Riproximin is a recently discovered type II ribosome inactivating protein with potential for treating cancer. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1077–1090, 2014.

AIYELAAGBE, Olapeju O.; ADESOGAN, Kayode; EKUNDAYO, Olusegun *et al.* Antibacterial diterpenoids from *Jatropha podagrica* Hook. **Phytochemistry**, v. 68, n. 19, p. 2420–2425, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.05.021> . Acesso em: jan. 2019.

BATTELLI, Maria. Cytotoxicity and Toxicity to Animals and Humans of Ribosome-Inactivating Proteins. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 5, p. 513–521, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389557043403819> . Acesso em: jan. 2019.

BEITZ, Julie G.; DAVOL, Pamela ; CLARK, Jeffrey W. *et al.* Antitumor activity of basic fibroblast growth factor-saporin mitotoxin in vitro and in vivo. **CANCER RESEARCH**, v. 52, n. 1, p. 227–230, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1309225/> . Acesso em: jan. 2019.

BORTOLOTTI, Massimo; BOLOGNESI, Andrea ; POLITO, Letizia. Bouganin, an Attractive Weapon for Immunotoxins. **Toxins**, v. 10, n. 8, p. 323, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins10080323> . Acesso em: jan. 2019.

BOZZA, William P.; TOLLESON, William H.; RIVERA ROSADO, Leslie A. *et al.* Ricin detection: Tracking active toxin. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 117–123, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.11.012> . Acesso em: jan. 2019.

BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of protein-dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3) . Acesso em: jan. 2019.

BROWN, J. Edward; USSERY, Michael A.; LEPPLA, Stephen H. *et al.* Inhibition of protein synthesis by Shiga toxin. **FEBS Letters**, v. 117, n. 1-2, p. 84–88, 1980. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(80\)80918-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(80)80918-5) . Acesso em: 1 jan. 2019.

CARBALLO, José; HERNÁNDEZ-INDA, Zaira L; PÉREZ, Pilar *et al.* A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 17, 2002. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC130034/> . Acesso em: jan. 2019.

CARRERAS-SANGRA, N.; TOME-AMAT, J.; GARCIA-ORTEGA, L. *et al.* Production and characterization of a colon cancer-specific immunotoxin based on the fungal ribotoxin -sarcin. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 25, n. 8, p. 425–435, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22718791/> . Acesso em: jan. 2019.

DAŞ, Gürbüz; KAUFMANN, Falko; ABEL, Hansjörg *et al.* Effect of extra dietary lysine in *Ascaridia galli*-infected grower layers. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3, p. 238–243, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440171000107X> . Acesso em: jan. 2019.

DAS, Mrinal Kumar; SHARMA, Radhey Shyam ; MISHRA, Vandana. A cytotoxic type-2 ribosome inactivating protein (from leafless mistletoe) lacking sugar binding activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 5, p. 1096–1103, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813011003540> . Acesso em: jan. 2019.

ENDO, Y.; MITSUI, K.; MOTIZUKI, M. *et al.* 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, n. 12, p. 5908–5912, 1987. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818456608> . Acesso em: 13 jan. 2019.

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, 1987. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818475382> . Acesso em: jan. 2019.

FANG, E. F.; ZHANG, C. Z. Y.; NG, T. B. *et al.* Momordica Charantia Lectin, a Type II Ribosome Inactivating Protein, Exhibits Antitumor Activity toward Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells In Vitro and In Vivo. **Cancer Prevention Research**, v. 5, n. 1, p. 109–121, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21933914/> . Acesso em: jan. 2019.

FLAVELL, D J; BOEHM, D A; NOSS, A *et al.* Therapy of human T-cell acute lymphoblastic leukaemia with a combination of anti-CD7 and anti-CD38-SAPORIN immunotoxins is significantly better than therapy with each individual immunotoxin. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 4, p. 571–578, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11207056/> . Acesso em: jan. 2019.

FLAVELL, David J.; WARNES, Sarah L.; BRYSON, Christine J. *et al.* The anti-CD20

antibody rituximab augments the immunospecific therapeutic effectiveness of an anti-CD19 immunotoxin directed against human B-cell lymphoma. **British Journal of Haematology**, v. 134, n. 2, p. 157–170, 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2006.06155.x> . Acesso em: jan. 2019.

FLAVELL, DJ; FLAVELL, SU; BOEHM, DA *et al.* Preclinical studies with the anti-CD19-saporin immunotoxin BU12-SAPORIN for the treatment of human-B-cell tumours. **British Journal of Cancer**, v. 72, n. 6, p. 1373–1379, 1995.

FRYER, Hugh J.L.; DAVIS, George E.; MANTHORPE, Marston *et al.* Lowry protein assay using an automatic microtiter plate spectrophotometer. **Analytical Biochemistry**, v. 153, n. 2, p. 262–266, 1986. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269786900904?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

FUNATSU, G; ISLAM, MR; MINAMI, Y *et al.* Conserved amino acid residues in ribosome-inactivating proteins from plants. **Biochimie**, v. 73, n. 7-8, p. 1157–1161, 1991. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0300908491901603?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

GAO, D.-F.; WANG, B.-Q.; CAO, G.-M. *et al.* **Cloning of trichosanthin gene and its induction effects on the apoptosis of colorectal carcinoma LoVo cell.**

GIANSANTI, Francesco; FLAVELL, David; ANGELUCCI, Francesco *et al.* Strategies to Improve the Clinical Utility of Saporin-Based Targeted Toxins. **Toxins**, v. 10, n. 2, p. 82, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29438358/> . Acesso em: jan. 2019.

GIRBES, Tomas; FERRERAS, Jose M.; ARIAS, Francisco Javier *et al.* Description, Distribution, Activity and Phylogenetic Relationship of Ribosome-Inactivating Proteins in Plants, Fungi and Bacteria. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 5, p. 461–476, 2004. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/mrmc/2004/00000004/00000005/art00002> . Acesso em: 22 abr. 2022.

GOMES, F Pimentel. **Curso de estatística experimental**. 12. ed. São Paulo: Nobel, 1987.

HASSAN, Yasser; OGG, Sherry ; GE, Hui. Expression of novel fusion antiviral proteins ricin a chain-pokeweed antiviral proteins (RTA-PAPs) in Escherichia coli and their inhibition of protein synthesis and of hepatitis B virus in vitro. **BMC Biotechnology**, v. 18, n. 1, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30081895/> . Acesso em: jan. 2019.

HAUF, Nadja ; CHAKRABORTY, Trinad. Suppression of NF-κB Activation and

Proinflammatory Cytokine Expression by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 4, p. 2074–2082, 2003. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/170/4/2074/71051/Suppression-of-NF-B-Activation-and-Proinflammatory> . Acesso em: jan. 2019.

HEY, T D; HARTLEY, M ; WALSH, T A. Maize Ribosome-Inactivating Protein (b-32) (Homologs in Related Species, Effects on Maize Ribosomes, and Modulation of Activity by Pro-Peptide Deletions). **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 107, n. 4, p. 1323–1332, 1995. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article-abstract/107/4/1323/6069139?redirectedFrom=fulltext> . Acesso em: jan. 2019.

HUANG, Changxin; ZHAO, Jiangang; LI, Zhaoyang *et al.* Multi-chaperone-peptide-rich mixture from colo-carcinoma cells elicits potent anticancer immunity. **Cancer Epidemiology**, v. 34, n. 4, p. 494–500, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20451483/> . Acesso em: jan. 2019.

IGLESIAS, Rosario; CITORES, Lucía; RAGUCCI, Sara *et al.* Biological and antipathogenic activities of ribosome-inactivating proteins from *Phytolacca dioica* L. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 6, p. 1256–1264, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416516300666?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

INTA, Angkhana; TRISONTHI, Paritat ; TRISONTHI, Chusie. Analysis of traditional knowledge in medicinal plants used by Yuan in Thailand. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 344–351, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874113004807> . Acesso em: jan. 2019.

JARAMILLO-QUINTERO, Lidia Patricia ; CONTIS, Arturo; ROJAS, Andrés Romero *et al.* Cytotoxic effect of the immunotoxin constructed of the ribosome-inactivating protein curcin and the monoclonal antibody against Her2 receptor on tumor cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 79, n. 6, p. 896–906, 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/bbb/article/79/6/896/5939299> . Acesso em: jan. 2019.

JIANG, Shu-Ye; RAMAMOORTHY, R; BHALLA, Ritu *et al.* Genome-wide survey of the RIP domain family in *Oryza sativa* and their expression profiles under various abiotic and biotic stresses. **Plant Molecular Biology**, v. 67, n. 6, p. 603–614, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11103-008-9342-4> . Acesso em: jan. 2019.

JURI AYUB, Maximiliano; MA, Kit-Wan; SHAW, Pang-Chui *et al.* Trypanosoma cruzi: High ribosomal resistance to trichosanthin inactivation. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 3, p. 442–447, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489407002408?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

KALEYSA, Raj R. Screening of some Indigenous Plants for Anthelmintic Action Against Human *Ascaris Lumbricoides*. **Indian J Physiol Pharmacol** ., v. 18, n. 2, p. 129–131, 1974. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4415695/> . Acesso em: jan. 2019.

KATO, Jason ; O'DONNELL, Robert T. ; ABUHAY, Mastewal *et al.* Efficacy and toxicity of a CD22-targeted antibody-saporin conjugate in a xenograft model of non-Hodgkin's lymphoma. **Oncolmmunology**, v. 1, n. 9, p. 1469–1475, 2012. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/onci.21815> . Acesso em: jan. 2019.

KONG, M.; KE, Y. B. ; ZHOU, M. Y. *et al.* Study on Trichosanthin induced apoptosis of leukemia K562 cells. **Shi Yan Sheng Wu Xue Bao** ., v. 31, n. 3, p. 233–243, 1998. LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/227680a0> . Acesso em: jan. 2019.

LAKOWICZ, Joseph R. **Topics in fluorescence spectroscopy**. New York: Springer, 1992.

LAPADULA, Walter Jesús ; AYUB, Maximiliano Juri. Ribosome Inactivating Proteins from an evolutionary perspective. **Toxicon**, v. 136, p. 6–14, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010117301927?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

LEE-HUANG , S.; HUANG, P. L.; SUN, Y. *et al.* Inhibition of MDA-MB-231 human breast tumor xenografts and HER2 expression by anti-tumor agents GAP31 and MAP30. **Anticancer Research**, v. 20, n. 2A, p. 653–659, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10810336/> . Acesso em: jan. 2019.

LEE-HUANG, Sylvia; HUANG, Paul L.; CHEN, Hao-Chia *et al.* Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP30 from bitter melon. **Gene**, v. 161, n. 2, p. 151–156, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7665070/> . Acesso em: jan. 2019.

LI, Xiang-dong; CHEN, Wen-feng; LIU, Wang-yi *et al.* Large-Scale Preparation of Two New Ribosome-Inactivating Proteins—Cinnamomin and Camphorin from the Seeds of *Cinnamomum camphora*. **Protein Expression and Purification**, v. 10, n. 1, p. 27–31, 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592896907068?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

LIN, Juan; ZHOU, Xin; WANG, Jinya *et al.* Purification and characterization of curcin, a toxic lectin from the seed of *Jatropha curcas*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 107–118, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20213572/> . Acesso em: jan. 2019.

LIU, Ren-shui; YANG, Jia-hua ; LIU, Wang-Yi. Isolation and enzymatic characterization of lamjapin, the first ribosome-inactivating protein from cryptogamic algal plant (*Laminaria japonica* A). **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 19, p. 4746–4752, 2002. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1432-1033.2002.03165.x> . Acesso em: jan. 2019.

LIU, Wei-Wei; ZHANG, Yu; YUAN, Chun-Mao *et al.* Japodagricanones A and B, novel diterpenoids from *Jatropha podagrica*. **Fitoterapia**, v. 98, p. 156–159, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X14002019?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

LOWRY, Oliver H.; ROSEBROUGH, Nira J.; FARR, A. Lewis *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819524516?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

LUO, Meng-Jun; YANG, Xin-Yu; LIU, Wei-Xin *et al.* Expression, Purification and Anti-tumor Activity of Curcin. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 38, n. 9, p. 663–668, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16953306/> . Acesso em: jan. 2019.

MCLAUGHLIN, Jerry L.; ROGERS, Lingling L. ; ANDERSON, Jon E. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, n. 2, p. 513–524, 1998. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/009286159803200223> . Acesso em: jan. 2019.

MEYER, B.; FERRIGNI, N.; PUTNAM, J. *et al.* Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 05, p. 31–34, 1982. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17396775/> . Acesso em: jan. 2019.

MONTFORT, W.R; VILLAFRANCA, J E; MONZINGO, A.F *et al.* The three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 11, p. 5398–5403, 1987. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818612013#:~:text=The%20x%2Dray%20crystallographic%20structure,to%20be%20the%20active%20site.> . Acesso em: jan. 2019.

MORLAND, BJ; BARLEY, J; BOEHM, D *et al.* Effectiveness of HB2 (anti-CD7) – saporin immunotoxin in an in vivo model of human T-cell leukaemia developed in severe combined immunodeficient mice. **British Journal of Cancer**, v. 69, n. 2, p. 279–285, 1994. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/bjc199452#citeas> . Acesso em: jan. 2019.

MUKHOPADHYAY, Subhadip; PANDA, Prashanta Kumar; DAS, Durgesh Nandini *et al.* Abrus agglutinin suppresses human hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo by inducing caspase-mediated cell death. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 6, p. 814–824, 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/aps201415#citeas> . Acesso em: jan. 2019.

NELSON, David L; LEHNINGER, Albert L ; COX, Michael M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 8. ed. Macmillan Higher Education: Basingstoke, 2021.

NG, T.B; WONG, Jack Ho ; WANG, Hexiang. Recent Progress in Research on Ribosome Inactivating Proteins. **Current Protein and Peptide Science**, v. 999, n. 999, p. 1–6, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20201806/> . Acesso em: jan. 2019.

NUCHSUK, Chanthakan; WETPRASIT, Nuanchawee; ROYTRAKUL, Sittiruk *et al.* Bioactivities of Jc-SCRIP, a Type 1 Ribosome-Inactivating Protein from *Jatropha curcas* Seed Coat. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 82, n. 4, p. 453–462, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cbdd.12175> . Acesso em: jan. 2019.

ORIOLO, Roger Gilabert ; FURNESS, Sebastian G B; STRINGER, Brett W *et al.* Dianthin-30 or gelonin versus monomethyl auristatin E, each configured with an anti-calcitonin receptor antibody, are differentially potent in vitro in high-grade glioma cell lines derived from glioblastoma. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 66, n. 9, p. 1217–1228, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00262-017-2013-z> . Acesso em: jan. 2019.

PERVIN, F.; HOSSAIN, M.M. ; KHATUN, S. *et al.* Comparative Cytotoxicity Study of Six Bioactive Lectins Purified from Pondweed (*Potamogeton nodosus* Poir) Rootstock on Brine Shrimp. **Journal of Medical Sciences**, v. 6, n. 6, p. 999–1002, 2006. Disponível em: <https://scialert.net/abstract/?doi=jms.2006.999.1002> . Acesso em: jan. 2019.

POLITO, L; BOLOGNESI, A; TAZZARI, P L *et al.* The conjugate Rituximab/saporin-S6 completely inhibits clonogenic growth of CD20-expressing cells and produces a synergistic toxic effect with Fludarabine. **Leukemia**, v. 18, n. 7, p. 1215–1222, 2004. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/2403378> . Acesso em: jan. 2019.
POLITO, Letizia; BORTOLOTTI, Massimo; PEDRAZZI, Manuela *et al.* Immunotoxins and Other Conjugates Containing Saporin-S6 for Cancer Therapy. **Toxins**, v. 3, n. 6, p. 697–720, 2011. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/3/6/697> . Acesso em: jan. 2019.

PURI, Munish; KAUR, Inderdeep; PERUGINI, Matthew A. *et al.* Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 13-14, p. 774–783, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644612001110?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

QIN, Wei; MING-XING, Huang ; YING, Xu *et al.* Expression of a ribosome inactivating protein (curcin 2) in *Jatropha curcas* is induced by stress. **Journal of Biosciences**, v. 30, n. 3, p. 351–357, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16052073/> . Acesso em: jan. 2019.

QIN, Xiaobo; ZHENG, Xinglong; SHAO, Chang-Lun *et al.* Stress-induced curcin-L promoter in leaves of *Jatropha curcas* L. and characterization in transgenic tobacco. **Planta**, v. 230, n. 2, p. 387–395, 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-009-0956-9> . Acesso em: jan. 2019.

QIU , Hua-li; RANG, Jie; DING, Xue-zhi *et al.* Prokaryotic Expression of MAP30 from *Momordica charantia* and Its Biological Activity. **China Biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 40–46, 2014. Disponível em: <https://manu60.magtech.com.cn/biotech/EN/10.13523/j.cb.20140606> . Acesso em: jan. 2019.

REINBOTHE, S; REINBOTHE, C ; LEHMANN, J *et al.* JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 15, p. 7012–7016, 1994. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC44328/> . Acesso em: jan. 2019.

REYNA, Alfonso Arroyo ; ARANA, Andrés Hernández. The thermal denaturation of stem bromelain is consistent with an irreversible two-state model. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1248, n. 2, p. 123–128, 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016748389500014L?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

ROBERTUS, Jon D ; MONZINGO, Arthur F. The Structure of Ribosome Inactivating Proteins. **Mini-reviews in medicinal chemistry/Mini-reviews in medical chemistry**, v. 4, n. 5, p. 477–486, 2004. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/25761> . Acesso em: jan. 2019.

RUGGIERO, Alessia; CHAMBERY, Angela; DI MARO, Antimo *et al.* Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Analysis of PD-L4, a Ribosome Inactivating Protein from *Phytolacca dioica* L. leaves. **Protein & Peptide Letters**, v. 14, n. 1, p. 97–100, 2007. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/22509> . Acesso em: jan. 2019.

SCHROT, Joachim; WENG, Alexander ; MELZIG, Matthias. Ribosome-Inactivating and Related Proteins. **Toxins**, v. 7, n. 5, p. 1556–1615, 2015. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/7/5/1556> . Acesso em: jan. 2019.

SHARMA, Surendra Kr. ; SINGH, Harneet. A review on pharmacological significance of genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). **Chinese Journal of Integrative Medicine**,

v. 18, n. 11, p. 868–880, 2012. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11655-012-1267-8> . Acesso em: jan. 2019.

SHI, Wei-Wei; MAK, Amanda; WONG, Kam-Bo *et al.* Structures and Ribosomal Interaction of Ribosome-Inactivating Proteins. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1588, 2016. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/11/1588> . Acesso em: jan. 2019.

SHI, Zhenduo; PANG, Kun; YANG, Wen *et al.* Antitumor mechanism of MAP30 in bladder cancer T24 cells, and its potential toxic effects in mice. **Cellular and Molecular Biology**, v. 66, n. 1, p. 42–48, 2020. Disponível em:
<https://cellmolbiol.org/index.php/CMB/article/view/3155> . Acesso em: jan. 2025.

SHIH, N.Remi; MCDONALD, Karen A; JACKMAN, Alan P *et al.* Bifunctional plant defence enzymes with chitinase and ribosome inactivating activities from *Trichosanthes kirilowii* cell cultures. **Plant Science**, v. 130, n. 2, p. 145–150, 1997. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016894529700229X?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

SHILASKAR , DV ; PARASAR , GC. In vivo and kymographic studies on *Psoralea corylifolia* and *Piper betle* against avian *Ascaridia galli*. **Indian Veterinary Journal**, v. 62, n. 5, p. 387–294, 1985.

SMITH, Daniel C; MARSDEN, Catherine J; LORD, J Michael *et al.* Expression, purification and characterization of ricin vectors used for exogenous antigen delivery into the MHC class I presentation pathway. **Biological Procedures Online**, v. 5, n. 1, p. 13–19, 2003. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1251/bpo42> . Acesso em: jan. 2019.

SMITH, Valerie A ; MACMILLAN, Jake. Purification and partial characterization of a gibberellin 2 β -hydroxylase from *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 2, n. 1-4, p. 251–264, 1983. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02042254> . Acesso em: jan. 2019.

SREERAMA, Narasimha ; WOODY, Robert W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252–260, 2000. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269700948802> . Acesso em: jan. 2019.

STIRPE, Fiorenzo. Ribosome-inactivating proteins. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 371–383, 2004. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010104001904?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

STIRPE, Fiorenzo. Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins. **Toxicon**, v. 67, p. 12–16, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010113000664?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

STIRPE, Fiorenzo ; BARBIERI, Luigi. Ribosome-inactivating proteins up to date. **FEBS Letters**, v. 195, n. 1-2, p. 1–8, 1986. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0014-5793%2886%2980118-1> . Acesso em: jan. 2019.

STIRPE, Fiorenzo; BARBIERI, Luigi; GORINI, Paola *et al.* Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves. **FEBS Letters**, v. 382, n. 3, p. 309–312, 1996. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0014-5793%2896%2900188-3> . Acesso em: jan. 2019.

TAZZARI, Pier Luigi; BOLOGNESI, Andrea; DE TOTERO, Daniela *et al.* Immunotoxins containing saporin linked to different CD2 monoclonal antibodies: *in vitro* evaluation. **British Journal of Haematology**, v. 86, n. 1, p. 97–105, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7912101/> . Acesso em: jan. 2019.

TURNAY, Javier; OLMO, Nieves; JIMÉNEZ, alfredo *et al.* Kinetic study of the cytotoxic effect of α -sarcin, a ribosome inactivating protein from *Aspergillus giganteus*, on tumour cell lines: protein biosynthesis inhibition and cell binding. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 122, n. 1, p. 39–47, 1993. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00925735#citeas> . Acesso em: 1 jan. 2019.

TYAGI, Nikhil; TYAGI, Monika; PACHAURI, Manendra *et al.* Potential therapeutic applications of plant toxin-ricin in cancer: challenges and advances. **Tumor Biology**, v. 36, n. 11, p. 8239–8246, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13277-015-4028-4> . Acesso em: jan. 2019.

VAN DAMME, Els J. M.; HAO, Qiang; CHEN, Ying *et al.* Ribosome-Inactivating Proteins: A Family of Plant Proteins That Do More Than Inactivate Ribosomes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 20, n. 5, p. 395–465, 2001. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689.2001.10131826> . Acesso em: jan. 2019.

VAN DEN BERG, Albert J.J.; HORSTEN, Stephan F.A.J.; JANTINA KETTENES-VAN DEN BOSCH, J. *et al.* Podacycline A and B, two cyclic peptides in the latex of *Jatropha podagrica*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 129–133, 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942295009124?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

VASCONCELOS, Mayron Alves de ; PENHA, Samara Sena da ; SILVA, Vinícius Rodrigues Castro e *et al.* Fruticulosin: A novel type 2 ribosome-inactivating protein from *Abrus fruticulosus* seeds that exhibits toxic and antileishmanial activity.

Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 658, p. 46–53, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986118303242?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

VOOIJIS, WC; OTTEN, HG; VAN VLIET, M *et al.* B7-1 (CD80) as target for immunotoxin therapy for Hodgkin's disease. **British Journal of Cancer**, v. 76, n. 9, p. 1163–1169, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9365164/> . Acesso em: jan. 2019.

WANG, H.X. ; NG, T.B. Isolation of Pleuteregine, a Novel Ribosome-Inactivating Protein from Fresh Sclerotia of the Edible Mushroom *Pleurotus tuber-regium*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 288, n. 3, p. 718–721, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X01958164?via%3Dihub> . Acesso em: jan. 2019.

WANG, Yuan-Yuang; OUYANG, Dong-Yun ; ZHENG, Yong-Tan. [Mechanism of trichosanthin against human leukemia/lymphoma cells in vitro]. **Zhongguo shiyan xueyexue zazhi**, v. 15, n. 4, p. 729–32, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17708792/> . Acesso em: jan. 2019.

WAWRZYNCZAK, Edward J; HENRY, Raymond V; CUMBER, Alan J *et al.* Biochemical, cytotoxic and pharmacokinetic properties of an immunotoxin composed of a mouse monoclonal antibody Fib75 and the ribosome-inactivating protein α -sarcin from *Aspergillus giganteus*. **European journal of biochemistry**, v. 196, n. 1, p. 203–209, 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2001699/> . Acesso em: jan. 2019.

YAO, Qi-Zhi; YU, Marilyn M; LINDA, S. M. Ooi *et al.* Isolation and Characterization of a Type 1 Ribosome-Inactivating Protein from Fruiting Bodies of the Edible Mushroom (*Volvariella volvacea*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 788–792, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10554316/> . Acesso em: jan. 2019.

ZAIA, Dimas A. M.; ZAIA, Cássia Thaís B. V. ; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/pnCxFMPPrQkV5vj38BT5kbG/?lang=pt> . Acesso em: jan. 2019.

ZENG, Meiqi; ZHENG, Manyin; LU, Desheng *et al.* Anti-tumor activities and apoptotic mechanism of ribosome-inactivating proteins. **Chinese Journal of Cancer**, v. 34, n. 3, 2015. Disponível em: <https://cancercommun.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40880-015-0030-x> . Acesso em: jan. 2019.

ZHAO, Qi; WANG, Wenguo; WANG, Yuehua *et al.* The effect of curcin from *Jatropha*

curcas on apoptosis of mouse sarcoma-180 cells. **Fitoterapia**, v. 83, n. 5, p. 849–852, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22445551/> . Acesso em: 1 jan. 2019.

ZHU, Qing-li; GU, Heng ; KE, Zengguang. Congeneration biodiesel, ricinine and nontoxic meal from castor seed. **Renewable Energy**, v. 120, p. 51–59, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096014811731279X?via%3Dihub> . Acesso em: 1 jan. 2019.

NParks | Jatropha podagrica. www.nparks.gov.sg. Disponível em: <https://www.nparks.gov.sg/florafaunaweb/flora/2/1/2154> .