

AVALIAÇÃO DOS TEORES DE RICINA E DE PROTEASES
DURANTE O ARMAZENAMENTO DE TORTA DE MAMONA (*Ricinus
communis* L.)

HÉLIO ARÊAS CRESPO NETO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ.
NOVEMBRO - 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AVALIAÇÃO DOS TEORES DE RICINA E DE PROTEASES
DURANTE O ARMAZENAMENTO DE TORTA DE MAMONA (*Ricinus
communis* L.)

HÉLIO ARÊAS CRESPO NETO

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ.
NOVEMBRO - 2009

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

Financiamentos:

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

AVALIAÇÃO DOS TEORES DE RICINA E DE PROTEASES
DURANTE O ARMAZENAMENTO DE TORTA DE MAMONA (*Ricinus
communis* L.)

HÉLIO ARÊAS CRESPO NETO

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

Aprovada em 30 de novembro de 2009.

Comissão examinadora:

Dra. Antônio Elenir Amâncio Oliveira (UENF)

Dra. Valdirene Moreira Gomes (UENF)

Dra. Lucia Moreira Campos Paiva (UFRJ)

Dra. Olga Lima Tavares Machado (UENF)
(Orientadora)

Dedico este trabalho,

a todos que acreditaram que era possível e me impulsionaram para a conclusão desta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

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

À minha orientadora Olga, pela dedicação ao conhecimento, pelo zelo com seus alunos, pela companhia e força nas dificuldades e, principalmente, nas vitórias.

À revisora deste trabalho, professora Dr.^a Marílvia Dansa de Alencar Petretski, pela atenção, dedicação e profissionalismo dedicados a esta revisão.

Aos membros da banca, Dra. Valdirene Moreira Gomes, Dra. Antônio Elenir Amâncio Oliveira e Dra. Lucia Moreira Campos Paiva, pela atenção e profissionalismo já dispensados.

À minha família, que se faz presente no meu dia-a-dia me impulsionando para alcançar sempre as metas da vida.

À minha esposa e eterna namorada Natália, pela companhia, compreensão, sabedoria e paciência. Enfim, pela sua presença em minha vida.

Aos amigos do laboratório, pelo companheirismo, pelas conversas e pela alegria nos encontros.

À Fernanda Rebel, bolsista que contribuiu enormemente nos experimentos com um profissionalismo pouco comum nos dias atuais.

A todos os funcionários do LQFPP, em especial Isabela e Jucélia, pela disponibilidade e cooperação nos momentos de dificuldade.

Enfim, a todos que contribuíram com este trabalho.

"Quem sabe faz a hora, não espera acontecer."

Geraldo Vandré

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - A semente.....	2
1.1.1 - O óleo de mamona	3
1.1.1.1 - Biodiesel.....	5
1.1.2 - A torta.....	7
1.1.3 – A ricina.....	8
1.2 – Proteases em plantas	11
1.2.1 – Proteases nas sementes de mamona.....	12
1.2.2 - Proteases nas folhas de mamona.....	14
2- OBJETIVOS.....	16
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 - Materiais.....	17
3.1.1 – Sementes de mamona.....	17
3.1.2 - Materiais para eletroforese.....	17
3.1.3 – Materiais para cromatografia de exclusão molecular.....	17
3.1.4 - Materiais para revelação de proteínas com azul de coomassie ...	17
3.1.5 – Equipamentos.....	17
3.2 - Metodologia.....	18
3.2.1 – Obtenção da torta	18
3.2.2 – Armazenamento da torta	18
3.2.3 – Extração de proteínas da torta	18
3.2.3.1 – Extração de ricina	18

3.2.3.1a – Ácida.....	18
3.2.3.1b – Sem fervura	18
3.2.3.1c – Com fervura	18
3.2.3.2 – Extração de proteases	19
3.2.4 – Dosagem de proteínas	19
3.2.5 – Purificação de proteínas da torta.....	19
3.2.5.1- Cromatografia de exclusão molecular	19
3.2.6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes	19
3.2.6.1 – SDS-PAGE 12%	19
3.2.6.2 – Tricina	20
3.2.7 – Revelação de proteínas no gel	20
3.2.8 – Zimografia em gel contendo gelatina	20
3.2.9 – Efeito do pH sobre a atividade proteolítica	21
3.2.10 - Efeito de diferentes inibidores de proteases sobre a atividade proteolítica	21
4- RESULTADOS.....	22
4.1 - Comparação de diferentes protocolos de extração de proteínas na torta	22
4.2 – Mudanças no teor de ricina nas amostras de torta de mamona	23
4.2.1- SDS-PAGE 12%	23
4.2.2- Eletroforese em gel de tricina	24
4.2.3- Cromatografia de exclusão molecular	25
4.3 – Proteases na torta de mamona	29
4.4 – Efeito do pH sobre a atividade proteolítica	30
4.5 - Efeito de diferentes inibidores de proteases sobre a atividade proteolítica	31
5- DISCUSSÃO.....	33
6- CONCLUSÃO.....	37
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A mamoneira	1
Figura 2: Sementes de diferentes cultivares de mamona	3
Figura 3: Fórmula estrutural do ácido ricinoléico	4
Figura 4: Estrutura da molécula de ricina	9
Figura 5: Análise dos diferentes modos de extração de proteínas da torta de mamona por SDS-PAGE 12%	22
Figura 6: Análise do perfil protéico das amostras de torta de mamona armazenadas na estufa por SDS-PAGE 12%	23
Figura 7: Análise do perfil protéico das amostras de torta de mamona armazenadas no sol por SDS-PAGE 12%	24
Figura 8: Eletroforese em gel de tricina da torta de mamona armazenada em estufa e no sol	25
Figura 9: Cromatografia de exclusão molecular das amostras de torta de mamona armazenadas na estufa	27
Figura 10: Cromatografia de exclusão molecular das amostras de torta de mamona armazenadas no sol	28
Figura 11: Análise da atividade proteolítica das amostras de torta de mamona armazenadas na estufa (SDS-PAGE 12% copolimerizado com gelatina bovina 0,1%)	29
Figura 12: Análise da atividade proteolítica das amostras de torta de mamona armazenadas no sol (SDS-PAGE 12% copolimerizado com gelatina bovina 0,1%)	30

Figura 13: Determinação do pH ótimo da atividade proteolítica por SDS-PAGE 12% copolimerizado com gelatina de amostra controle do extrato protéico de torta de mamona	31
--	----

Figura 14: Efeito de inibidores de proteases na atividade proteolítica (SDS-PAGE 12% copolimerizado com gelatina) de amostra controle da torta de mamona	32
---	----

LISTA DE TABELA

Tabela I: Principais oleaginosas cultivadas no Brasil para a produção de biodiesel	7
---	---

LISTA DE ABREVIações

CPR	Cisteíno proteases
Cys-EP	Protease cisteínica do endosperma de mamona
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
kDa	KiloDalton
MJ	Metil jasmonato
MPR	Metaloproteases
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoreto
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
Psi	Libras por polegada ao quadrado
Rpm	Rotações por minuto
RIPs	Proteínas inativadoras de ribossomos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TFA	Ácido Trifluoracético

RESUMO

Ricinus communis L. é uma planta da família *Euphorbiaceae*, conhecida no Brasil como mamona, que tem grande importância econômica devido ao óleo extraído de sua semente, que pode ser utilizado em cerca de 700 processos industriais, sendo um desses a síntese de biodiesel. Após a extração do óleo, obtém-se como coproduto a torta de mamona que possui elevado teor protéico, porém não pode ser utilizada para consumo animal por possuir a proteína de reserva ricina, que é extremamente tóxica para as células eucarióticas. As proteases estão envolvidas em vários processos fisiológicos, entre eles, a degradação de proteínas de reserva. Inúmeros estudos têm sido conduzidos por diversos grupos de pesquisa, a fim de desenvolver tecnologias eficientes e economicamente viáveis para destoxificar a torta de mamona. O presente estudo tem por objetivo avaliar a degradação de ricina em torta de mamona ao longo do período de armazenamento, bem como acompanhar a atividade proteolítica neste período. As amostras de torta de mamona foram estocadas em estufa a 37 °C ou em condições ambientais normais ("sol"), sendo coletadas nove amostras ao longo do tempo de estocagem, que alcançou seis meses. As análises eletroforéticas mostraram o desaparecimento parcial (estufa) e completo ("sol") das bandas de ricina nas amostras. O gel de ricina e a cromatografia de exclusão molecular confirmaram o desaparecimento da ricina e revelou a formação de peptídeos. A zimografia em gel contendo gelatina das amostras de torta de mamona revelaram a atividade constitutiva de duas proteases que possuem atividade aumentada nos meses 3 e 4 (estufa) e 2 e 3 ("sol"). As proteases abrangem uma faixa de pH entre ligeiramente ácido e ligeiramente básico, sendo o pH 8,0 considerado o ótimo. Elas foram completamente inibidas pela adição de EDTA, se revelando portanto metaloproteases. Os resultados obtidos ajudam a compreender a composição proteolítica de extratos de torta de mamona e fornecem algumas propriedades bioquímicas de duas metaloproteases presentes na torta e que aumentam de atividade com o tempo de armazenamento. A atividade dessas enzimas com concomitante degradação protéica sugere uma possível função na senescência do endosperma das sementes de *Ricinus communis*, conduzindo a mobilização das proteínas de reserva. Os resultados apresentados neste trabalho sugerem uma forma eficaz e economicamente viável para destoxificar a torta de mamona.

Palavras-chave: ricina, torta de mamona, destoxificação, metaloproteases.

ABSTRACT

Ricinus communis L. is a plant of the Euphorbiaceae family, known in Brazil as mamona, which has great economic importance because of the oil extracted from its seeds that can be used in about 700 industrial processes, being one of these the synthesis of biodiesel. After extraction of the oil is obtained as a coproduct the castor cake that has high protein content, however, can not be used for animal consumption because it has a storage protein ricin, which is highly toxic to eukaryotic cells. Proteases are involved in several physiological processes, including the degradation of storage proteins. Numerous studies have been conducted by several research groups to develop efficient and economically feasible to detoxify the castor cake. This study has the objective to evaluate the degradation of ricin in castor cake during the period of storage, and to monitor the proteolytic activity in this period. Samples of castor cake were stored at 37 °C and under normal ambient conditions and nine samples collected during the storage time, which reached six months. The electrophoretic analysis showed the partial (greenhouse) and complete ("sun") disappearance of the bands of ricin in the samples. Tricine gel and molecular exclusion chromatography confirmed the disappearance of ricin and revealed the formation of peptides. The zymography on gel containing gelatin of the castor cake samples revealed the constitutive activity of two proteases that have increased activity in the months 3 and 4 (greenhouse) and 2 and 3 ("sun"). Proteases activity cover a pH range from slightly acidic to slightly basic, pH 8.0 being considered optimal. They were completely inhibited by the addition of EDTA, unfolding metalloproteases. The results helps to understand the composition of proteolytic extracts from castor cake and provide some biochemical properties of two metalloproteases present in the castor cake and that increase the activity with storage time. The activity of these enzymes with concomitant protein degradation suggests a possible role in endosperm senescence of the seeds of *Ricinus communis*, leading to mobilization of reserve proteins. The results presented in this paper suggest an effective and economically viable to detoxify the castor cake.

Keywords: ricin, castor cake, detoxify, metalloproteases.

1 – Introdução

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é conhecida desde a Antiguidade por suas propriedades medicinais e como azeite para iluminação (SANTOS *et al.*, 2007; AZEVEDO & LIMA, 2001). Sementes e outros adornos encontrados nos túmulos comprovam que a mamona já era utilizada pelos egípcios há pelo menos 4000 anos (FELIX *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2007; FORNAZIERE JÚNIOR, 1986).

No Brasil essa euforbiácea é conhecida desde a era colonial, suas sementes foram trazidas possivelmente pelos escravos no século XVI, quando dela se extraía o óleo para lubrificar as engrenagens e os mancais dos inúmeros engenhos de cana. A mamoneira está largamente difundida por todo o Brasil, não havendo praticamente terreno baldio, mata ou lavoura abandonada onde a planta não se desenvolva (FORNAZIERE JUNIOR, 1986).

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa possivelmente, originária da Etiópia, no Leste da África; esta planta apresenta grande potencial para ser cultivada em amplas áreas do território brasileiro, em razão de apresentar expressiva resistência à seca, exigência em calor e luminosidade e se adaptar perfeitamente ao clima semi-árido (CARTAXO *et al.*, 2004); além disso, a extraordinária multiplicidade de aplicações industriais do seu óleo e do valor agregado da sua torta como fertilizante orgânico e suplemento protéico para alimentação animal, quando destoxificada, situa a mamona entre as oleaginosas tropicais mais importantes da atualidade (FORNAZIERE JUNIOR, 1986).



Figura 1: A mamoneira (Disponível em: www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/index.html, acesso em: 19/06/2009).

A carrapateira, palma-crísti ou enxerida como também é conhecida a mamoneira, é um arbusto bastante complexo no que tange à morfologia, biologia floral e fisiologia, apresentando metabolismo fotossintético (C3), porte muito variado, de 0,8 a mais de 7,0 m de altura, ramificação caulinar simpoidal, raiz fistulosa e vários tipos de expressão da sexualidade (AZEVEDO & LIMA, 2001; AZEVEDO *et al.*, 1997).

A parte aérea dessas plantas é ramificada, de coloração verde ou avermelhada. Suas folhas são lobadas e de forma variada. A mamoneira é uma planta monóica (flores masculinas e femininas na mesma planta) e a inflorescência contém flores femininas na parte superior e masculinas na parte inferior (AZEVEDO *et al.*, 1997).

Diversas partes da mamoneira são aproveitadas. As folhas servem de alimento para o bicho-da-seda. A haste, além de celulose própria para a fabricação de papel, fornece matéria-prima para a produção de tecidos grosseiros. Além disso, as hastes e as folhas podem ser utilizadas na melhoria das características físicas e biológicas do solo, e a folha ainda serve para aumentar a secreção láctea das vacas (AZEVEDO & LIMA, 2001). Porém os principais produtos derivados da mamona provêm das suas sementes - o óleo e a torta residual (FERNANDES, 2008).

1.1 - A semente

A semente da mamoneira é muito variável, envolvendo cor, forma, tamanho, peso, proporção do tegumento, presença ou ausência de carúncula e, maior ou menor aderência do tegumento ao endosperma (FERNANDES, 2008). De acordo com Távora (1982) o peso de 100 sementes pode variar de 10 a 100g, com média de 30g nas cultivares anãs e de 45 a 75g nas cultivares de porte médio. O comprimento das sementes de mamona varia de 0,8 a 3 cm, de 0,6 a 1,5 cm de largura e de 0,4 a 1 cm de espessura.

Távora em 1982 descreve a constituição da semente de mamona da seguinte forma: tegumento externo e interno; carúncula; endosperma e embrião. Ribeiro Filho, 1966, afirma que o tegumento externo da semente é representado pela casca, dura e quebradiça tendo ainda uma película interna, fina, que envolve o albúmen, que é branco, compacto e rico em óleo.

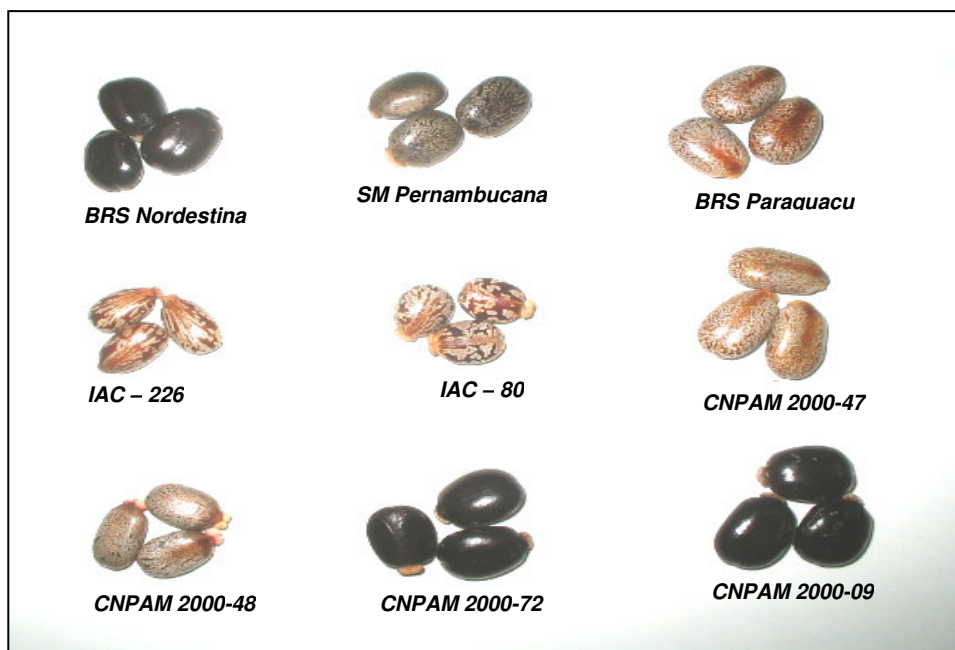


Figura 2: Sementes de diferentes cultivares de mamona (FERNANDES, 2008)

Da industrialização das sementes obtém-se, como produto principal, o óleo e como coproduto, a torta de mamona que possui a capacidade de restaurar terras esgotadas. A extração do óleo da semente é realizada por meio de máquinas apropriadas em que o método utilizado para se extrair o óleo pode ser por prensagem, a frio ou a quente, ou extração por solvente (AZEVEDO E BELTRÃO, 2007).

O conteúdo de óleo de mamona nas sementes se situa, em geral, entre 40 e 60%, em variedades comerciais. As variedades IAC 80 e IAC 226, facilmente encontradas no Estado de São Paulo, apresentam teores de óleo de 47 e 48%, respectivamente (CARVALHO, 1988). Na região Nordeste existem as cultivares Sipeal 28, Baianita e Pernambucana, todas com cerca de 47% de óleo. As cultivares lançadas pela Embrapa Algodão, para as condições semi-áridas do Nordeste são a BRS Nordestina e a BRS Paraguaçu, ambas com conteúdo de óleo entre 48 e 49%. Estas são consideradas, por Vieira *et al.* (1998) como os melhores cultivares em distribuição.

1.1.1 – O óleo de mamona

O óleo extraído das sementes de mamona é composto por moléculas com propriedades bastante flexíveis e estrutura, de certa forma incomum entre os ácidos graxos existentes nos óleos vegetais.

O principal ácido graxo encontrado no óleo de rícino é o ácido ricinoléico ou 12-hidroxi-9-octadecenóico, que constitui 90% do óleo. Os outros 10% são formados por ácidos graxos não hidroxilados, principalmente ácidos oléicos e linoléicos (SAVY FILHO *et al.*, 1999). O óleo é solúvel em solventes, como etanol, metanol, éter, clorofórmio e no ácido acético glacial (FREIRE, 2001).

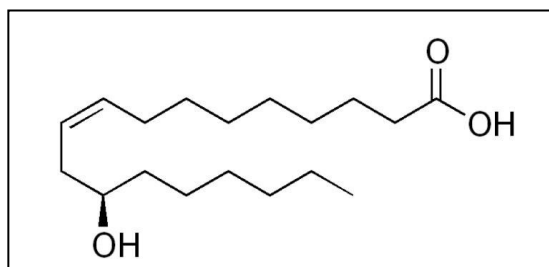


Figura 3: Fórmula estrutural do ácido ricinoléico.

O óleo bruto é de coloração palha-claro que, ao ser refinado, fica quase incolor. Possui odor característico, considerado insalubre por muitas pessoas. Seu sabor é desagradável e causa náuseas. Tradicionalmente o óleo é medicinal, sendo utilizado como laxante por causar irritação na mucosa intestinal, estimulando a evacuação dos intestinos humano e animal (FREIRE, 2001).

As características descritas acima conferem, ao óleo da mamona, grande versatilidade química dentro do ramo industrial, permitindo sua utilização em mais de 700 processos industriais (VIEIRA *et al.*, 1998; FORNAZIERI JUNIOR, 1986).

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

A partir do óleo de mamona se pode obter também o diesel vegetal, que substitui o óleo diesel derivado do petróleo no uso como combustível (ALBUQUERQUE, 2006).

Alguns pesquisadores admitem que o óleo de mamona é o melhor óleo vegetal para a produção de biodiesel, por ser o único solúvel em álcool e não necessitar de calor, reduzindo o gasto de energia para sua transformação em combustível (BELTRÃO & LIMA, 2007; OGUNNIY, 2006; MENEHETTIA *et al.*, 2006; PARENTE, 2004). A utilização do óleo de mamona como biodiesel já havia sido proposta por Fornazieri Junior em 1986.

1.1.1.1 - Biodiesel

A denominação de biodiesel para o novo combustível, composto basicamente de um éster monoalquílico e com rendimento térmico equivalente ao diesel de petróleo, foi usada pela primeira vez em 1988 por pesquisadores chineses (KNOTHE, 2001). O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) define biodiesel como um combustível obtido de uma mistura de diesel fóssil e ésteres alcalinos de óleos vegetais ou gordura animal. Tecnicamente, biodiesel é um éster álcali de ácidos graxos, feito por transesterificação catiônica de óleos ou gorduras, de plantas ou animais, com pequenas cadeias de álcoois tais como, o metanol ou etanol (NASS, 2007).

O biodiesel substitui, total ou parcialmente, o óleo diesel de petróleo em motores e pode ser usado puro ou misturado ao diesel em diversas proporções. A mistura de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo é chamada de B2 e assim sucessivamente, até o biodiesel puro, denominado B100 (Disponível em <http://www.biodiesel.gov.br/>. Acesso em 10/01/09).

O biodiesel é considerado “carbono neutro” porque todo o dióxido de carbono liberado durante o consumo tem sido seqüestrado para a atmosfera para o crescimento da safra das oleaginosas. Estudos têm demonstrado que o consumo de biodiesel tem emitido menos poluente quando comparado ao diesel (BARNWAL & SHARMA, 2005). Embora o interesse em óleos vegetais como matéria-prima para combustíveis não seja recente, seu uso em motores esbarrava na elevada viscosidade e na necessidade de manutenção intensiva provocada pelo alto índice de resíduos de sua combustão. A solução para tais limitações foi idealizada por

Chavanne, cientista belga que, em 1937, misturou álcool aos óleos vegetais e patenteou o processo de transesterificação (KNOTHE, 2001).

Muitos países estão buscando alternativas ao diesel derivado do petróleo por causa do aumento do preço de petróleo, sua escassez e a preocupação mundial com o meio ambiente (NASS *et al.*, 2007). A União Européia é atualmente a líder global na produção de biodiesel e o uso, com a Alemanha e França contabiliza 88% da produção mundial, acompanhados pelos Estados Unidos, que gera 8% da produção mundial. Nos Estados Unidos, a produção de biodiesel tem aumentado de 1,9 milhões de litros em 1999 para 284 milhões de litros em meados de 2007. No Brasil, o progresso com relação ao biodiesel ocorreu em 2002, quando o ministro da ciência e da tecnologia iniciou o Programa brasileiro para desenvolvimento tecnológico do Biodiesel (ProBiodiesel). O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) foi implantado dois anos após, em dezembro de 2004 e, em 2005, a primeira planta de processamento de biodiesel foi estabelecida no estado de Minas Gerais, usando a mamona como fonte de óleo vegetal. O PNPB apresenta-se como um programa interministerial do Governo Federal que tem por objetivo a implementação de forma sustentável, tanto técnica, como economicamente, a produção e uso do biodiesel, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, via geração de emprego e renda (NASS *et al.*, 2007).

O país viveu recentemente a necessidade de mudança para alcançar a meta estabelecida em janeiro de 2005 pelo Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel - PNPB (Lei #11.097/2005), e introduzir na matriz energética brasileira o uso obrigatório de pelo menos 2% (B2) de biodiesel até 2008 e de 5% (B5) até 2013. Neste contexto, a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) avaliou várias solicitações para o financiamento do biodiesel, promovendo a abertura de novas fábricas de biodiesel, tornando a capacidade de produção do país suficiente para alcançar a meta de 2008.

A propulsão da produção de Biodiesel resultante do programa fez com que a adição de 4% de biodiesel ao diesel se tornasse realidade em julho de 2009 e a projeção é que a meta de 5% seja atingida já em 2010 (Biodieselbr 2, disponível em: <http://www.biodieselbr.com/noticias/bio/governo-confirma-b4-julho-b5-2010-27-02-09.htm>. Acesso em 04/03/09).

Várias matérias-primas e várias tecnologias têm sido usadas para produção do biodiesel, contudo, para que sejam lucrativos, os biocombustíveis necessitam

fornecer um ganho de energia em rede, ser ambientalmente correto, ter um custo competitivo, e ser produzido em quantidades suficientes, sem redução do suprimento alimentício. A agricultura brasileira é facilitada pelo clima quente, precipitação regular, muita energia solar, aproximadamente 13% da água potável do planeta e, muitos hectares de terras férteis cultiváveis. Como mostrado na tabela I, várias espécies de oleaginosas têm sido cogitadas como fontes para a produção do biodiesel e outras ainda estão sob investigação como potenciais matérias-primas para a produção de biodiesel, dentre elas o dendê, pinhão manso, cupuaçu, milho, etc. As matérias-primas para a produção de biodiesel no Brasil variam grandemente entre as regiões: a soja, o girassol, o algodão, a mamona, e a canola são crescidas no sul, sudeste, e regiões centrais; o dendê, o babaçu, a soja e a mamona são encontrados nas regiões nordeste e norte (NASS *et al.*, 2007).

Tabela I: Principais oleaginosas cultivadas no Brasil para a produção de biodiesel.

Cultivo	Fonte botânica do óleo	Teor de óleo (%)
Dendê (<i>Elaeis guineensis</i>)	Semente	22.0
Abacate (<i>Persea americana</i>)	Fruto	7.0–35.0
Babaçu (<i>Attalea speciosa</i>)	Semente	66.0
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	Grão	45.0–48.0
Coco (<i>Cocos nucifera</i>)	Fruto	55.0–60.0
Canola (<i>Brassica</i> spp.)	Grão	40.0–48.0
Algodão (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Grão	15.0
Amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>)	Grão	40.0–43.0
Soja (<i>Glycine max</i>)	Grão	18.0
Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)	Grão	38.0–48.0

Fonte: FERNANDES, 2008

1.1.2 - A torta

De acordo com Severino (2005), a torta é o principal coproduto da cadeia produtiva da mamona, produzida a partir da extração do óleo das sementes na proporção aproximada de 1,2 tonelada para cada tonelada de óleo extraída, ou seja, corresponde a 55% de peso das sementes, valor que pode variar de acordo com o teor de óleo da semente e do processo industrial de extração do óleo.

De acordo com Chierice & Claro Neto (2001) a torta de mamona é uma massa orgânica que fica retida nos filtros após a extração do óleo por prensagem; apresentando dentre vários constituintes, 43% de proteínas, 35% de fibras, 10% de umidade, 8% de cinzas, 2% de óleo, 1% de fósforo, 0,5% de cálcio e 0,5% de magnésio.

Na Índia, principal produtor mundial de mamona, cerca de 85% da torta é utilizados como fertilizante orgânico (KONNUR & SUBBARAO, 2004) por ser excelente fonte de nitrogênio e apresentar propriedades inseticidas e nematicidas (DIRECTORATE OF OILSEEDS RESEARCH, 2004); além disso, a torta pode ser usada como matéria-prima para a produção de aminoácidos, plásticos, em especial biodegradáveis, colas e outros produtos (MACHADO *et al.*, 1954).

No Brasil, o Nordeste poderá ter mais de 4 milhões de hectares em condições de sequeiro para produzir mamona, sendo o óleo a matéria-prima principal para a produção do biodiesel e o resíduo, a torta, poderá ser base para recuperação dos solos desta região que se encontram degradados e empobrecidos. De acordo com Beltrão (2002), poderão ser cultivados cerca de até 6 milhões de hectares por ano com mamona no Nordeste, com uma produção total de torta de aproximadamente 3 milhões de toneladas; esta produção de torta poderá beneficiar cerca de 1,5 milhão de hectares, quando usada como fertilizante orgânico.

A torta também poderia ser utilizada para ração animal devido ao seu elevado teor protéico, cerca de 41-43% da massa de torta (BOM, 1979). Entretanto, esta aplicação ainda é desaconselhável devido à elevada toxicidade.

A limitação no uso da torta de mamona se deve a três fontes: a uma proteína extremamente tóxica, denominada ricina; a um alcalóide ligeiramente tóxico, denominado ricinina e a uma fração alergênica (CB-1A), composta por albuminas 2S (FORNAZIERI JÚNIOR, 1986; FREITAS *et al.*, 2004).

1.1.3 – A ricina

A ricina é uma proteína encontrada exclusivamente no endosperma das sementes de mamona, não sendo detectada em outras partes da planta, como raízes, folhas ou caules. Representa de 1,5 a 2% do peso total da semente (ANANDAN *et al.*, 2004; COOK *et al.*, 2006). Ela é a principal responsável pela toxicidade da torta de mamona e está entre as proteínas mais tóxicas conhecida pelo homem (MOSKIN, 1986).

A ricina é uma proteína heterodimérica com massa molecular de aproximadamente 65 kDa. Consiste de uma cadeia A (RTA), com cerca de 32 kDa, que exibe atividade catalítica unida por uma única ponte dissulfeto a uma cadeia B (RTB), de 34 kDa, que possui propriedades lectina, sendo capaz de ligar-se à superfície de glicoproteínas contendo resíduos de galactose e N-acetil-galactosamina (BRANDT *et al.*, 2005).

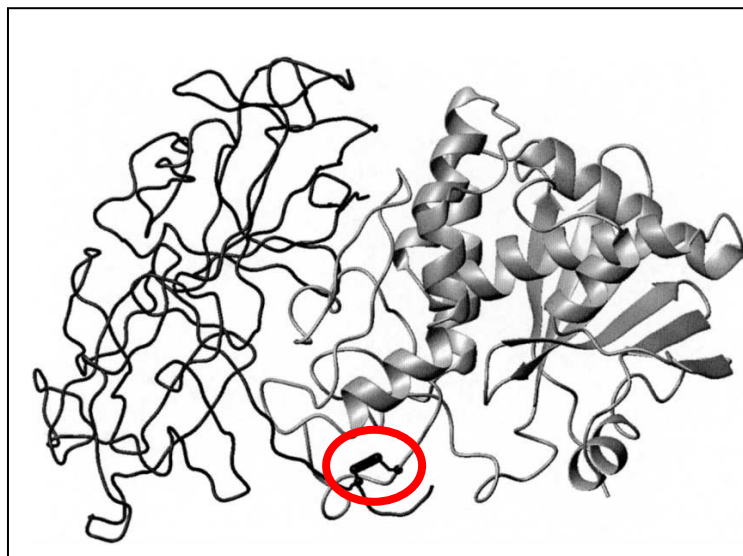


Figura 4: Estrutura da molécula de ricina. A cadeia B está situada a esquerda, e a cadeia A está a direita. O círculo vermelho indica a ponte dissulfeto que liga as cadeias A e B (RUTENBER & ROBERTUS, 1991).

A ricina é uma potente toxina que mata as células eucarióticas por inibir a síntese protéica. Assim, ela é uma proteína da classe de toxinas conhecidas como proteínas inativadoras de ribossomos, RIPs (COOK *et al.*, 2006).

As RIPs podem ser do tipo 1 (monoméricas) e do tipo 2 (diméricas). As RIPs tipo 1 apresentam apenas a cadeia A, que é uma glicosidase que remove um resíduo de adenina do RNA ribossomal 28S. O RNA então depurinado fica susceptível à hidrólise em pH alcalino e em pH ácido na presença de anilina. A região do RNAr modificada é essencial para a ligação do fator de alongamento, e os ribossomos modificados não podem dar suporte à síntese protéica. (OLSNES, 2004, OLSNES *et al.*, 1975)

A cadeia B é necessária para a ligação com a célula alvo e para o direcionamento intracelular da cadeia A (OLSNES, 2004). Quando estão presentes

as cadeias A e B, a toxina é classificada como RIP tipo 2, que é o caso da ricina (COOK *et al.*, 2006).

A cadeia A da ricina é muito eficiente dentro da célula, uma molécula inativa milhares de ribossomos por minuto. Assim, uma molécula pode inativar ribossomos mais rapidamente que a células podem sintetizar novos ribossomos e, portanto, apenas uma molécula mata a célula (OLSNES & KOZLOV, 2001). O valor da DL₅₀ oral para ratos e camundongos está entre 20 e 30 mg/kg de massa corporal, enquanto em humanos a dose oral de 1mg/kg de peso corporal leva a morte entre 6 e 14 dias (ALEXANDER *et al.*, 2008).

Apesar da alta toxicidade, é possível desenvolver imunidade contra a ricina, como comprovado nos estudos de Tokarnia e Döbereiner (1997) no qual bovinos que receberam pequena dose de ricina (por ingestão) criaram certa imunidade e posteriormente suportaram uma dose mais alta, apresentando sintomas de intoxicação, mas permanecendo vivos; enquanto animais que receberam diretamente a dose mais alta, não resistiram.

Na área médica a ricina tem se destacado entre um grupo de proteínas tóxicas que vêm sendo usadas como imunotoxinas, isto é, agentes terapêuticos empregados no tratamento de câncer e doenças auto-imunes. (BRANDT *et al.*, 2005; WOO *et al.*, 1998; LORD *et al.*, 1994). Esta toxina também chamou a atenção ao ser usada criminosamente para o assassinato do jornalista búlgaro Georgi Markov, em 1978, na cidade de Londres (OLSNES, 2004; LORD *et al.*, 1994).

A transformação da torta de mamona em um produto atóxico que possa ser usado para alimentação animal já vem há muito tempo despertando a atenção de diversos pesquisadores no mundo, tendo sido obtido alguns resultados satisfatórios (GARDNER *et al.*, 1960; PERRONE *et al.*, 1966). O preço da torta vendida como adubo no atacado é de R\$ 0,30 / kg. O uso da torta destoxificada como insumo para ração animal agregaria valor a esse co-produto do biodiesel.

A ricina é o principal empecilho para uso alimentar da torta da mamona para animais, (NA *et al.*, 2004). Neste contexto, a destoxificação da torta de mamona diz respeito a eliminação de ricina do seu meio e muitos grupos de pesquisa tem trabalhado afim de alcançar esse objetivo. Anandan *et al.* (2004) obtiveram êxito utilizando processos físicos, baseados no calor – fervura, autoclave, forno de ar quente - e químicos baseados em álcalis – NaOH, Ca(OH)₂, amônia.

Os métodos de destoxificação de torta de mamona para sua aplicação como ração animal em comunidades rurais devem garantir eficiência, sem gerar efluentes ou resíduos sólidos e sem a utilização de agentes químicos perigosos ou que causem riscos aos animais. Ademais a tecnologia deve ser economicamente viável.

A ricina é uma proteína de reserva da classe das lectinas que está presente no endosperma das sementes de mamona. O endosperma de *R. communis* em germinação, sofre morte celular programada para garantir total mobilização do material de reserva para os cotilédones (JOLLIFFE *et al.*, 2004; SCHMID *et al.*, 2001). No início da germinação de sementes proteases devem se tornar ativas para desencadear a mobilização das proteínas de reserva (MÜNTZ *et al.*, 2001; SCHLERETH *et al.*, 2000).

1.2 – Proteases em plantas

A proteólise em plantas desempenha funções fundamentais durante o desenvolvimento e em processos fisiológicos (SCHALLER & RYAN, 1996). As proteases podem estar envolvidas em vários processos fisiológicos incluindo: remoção de proteínas inativadas, desnaturadas ou anormais, propagação de sinais, reutilização de aminoácidos, e modificação do conteúdo de proteínas durante condições que requerem mudanças no estado metabólico da planta (HIENG *et al.*, 2004). A maioria das proteases atua no interior da cadeia peptídica, sendo chamadas endopeptidases, e podem clivar resíduos a partir do N-terminal ou do C-terminal (HUFFAKER, 1990). Em plantas são descritos quatro grupos de endopeptidases, de acordo com o mecanismo catalítico, a saber: serinoproteases (EC 3.4.21), cisteinoproteases (EC 3.4.22), proteases aspárticas (EC 3.4.23) e metaloproteases (EC 3.4.24) (PALMA *et al.*, 2002).

As proteases serínicas estão envolvidas em vários processos fisiológicos, tais como senescência, xilogênese, morte celular programada e diferenciação tecidual, sendo uma das melhores enzimas estudadas desta classe a ClpP ATP-dependente do cloroplasto (BEERS *et al.*, 2000; ADAM, 1996).

As proteases cisteínicas são o grupo mais bem estudado de proteases em plantas e estão envolvidas, entre outros, com a senescência e a mobilização de proteínas durante a germinação (SUTOH *et al.*, 1999; SCHLERETH *et al.*, 2000).

As proteases aspárticas tem preferência por ligações peptídicas ao lado de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e são ativas em pH ácido (BEERS *et al.*,

2000). Poucas informações sobre as funções biológicas deste grupo são conhecidas (VOIGT *et al.*, 1997).

As metaloproteases (MPRs) são o grupo de proteases menos conhecido em plantas e uma das mais bem estudada enzima é a FtSH, cloroplasto ATP-dependente (LINDAHL *et al.*, 2000), possivelmente envolvida na remoção de polipeptídeos desmontados ou incompletamente sintetizados (ADAM, 1996). Niere *et al.* (1998) identificaram uma enzima desta classe em folhas senescentes de alfafa e verificaram que ela era capaz de degradar a Rubisco *in vitro*. Estudos sugerem que metaloproteases podem ser importantes reguladores do crescimento e desenvolvimento e que podem até participar na morte celular programada das plantas (BEERS *et al.*, 2000).

Em trigo mourisco (*Fagopyrum esculentum*) ocorre a presença de uma metaloprotease que tem como substrato específico as proteínas de reserva das sementes desta planta, sendo ao que tudo indica, responsável por iniciar a degradação das proteínas de reserva (BELOZERSKY *et al.*, 1990).

1.2.1 – Proteases nas sementes de mamona

Uma das características das células eucarióticas é a compartimentalização dos diferentes processos metabólicos em organelas de simples ou dupla membrana. Glioxissomos são compartimentos de membrana simples que vem sendo isolados de tecidos que metabolizam ácidos graxos, como o endosperma de sementes de mamona (BREIDENBACH & BEEVERS, 1967). No endosperma destas sementes existe ainda uma organela adicional de membrana simples pouco menor que os glioxissomos, os ricinossomos (SCHMID *et al.*, 1998)

Os ricinossomos desenvolvem-se em células senescentes do endosperma concomitantemente com a fragmentação do DNA nuclear, uma marca do processo de morte celular programada. Eles são organelas derivadas do retículo endoplasmático e contém em pequenas proporções proteínas classicamente residentes do retículo como a BiP e dissulfeto isomerases (SCHMID *et al.*, 2001).

Os ricinossomos abrigam grande quantidade de uma pró-cisteína protease (proCys-EP), de 45 kDa, que possui no resíduo C-terminal uma seqüência KDEL (lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina) que funciona como um sinal de recuperação do Golgi para proteínas solúveis do lúmen do retículo endoplasmático (SCHMID *et al.*, 1998). A protease cisteínica ativa, Cys-EP, é uma enzima marcante

dos ricinossomos. Ela apresenta massa molecular de 35 kDa e pertence ao grupo de proteases cisteínicas do tipo papaína, que são encontrados especialmente em tecidos senescentes (GREENWOOD *et al.*, 2005).

Estas organelas atuam nos estágios finais da desintegração celular, com a liberação de Cys-EP. Esta possui atividade de 50 a 100 vezes mais alta que a pro-enzima (SCHMID *et al.*, 1998). A enzima aceita uma variedade de resíduos de aminoácidos no sitio catalítico, atacando várias proteínas durante a morte celular programada (THAN *et al.*, 2004).

As proteases cisteínicas tipo papaína com um resíduo KDEL formam uma classe distinta dentro das proteases cisteínicas de plantas e são predominantemente expressadas em tecidos senescentes (SCHMID *et al.*, 1998). A protease cisteínica com C-terminal KDEL melhor estudada é a SH-EP isolada dos cotilédones do feijão-da-índia (*Vigna mungo* L.). Ela é sintetizada como um precursor inativo de 45 kDa e é processada até a protease ativa de 33 kDa. Esse processamento ocorre provavelmente por autocatálise e pelo envolvimento de proteases e peptidases (OKAMOTO *et al.*, 1999).

A acidificação dos ricinossomos *in vitro* induz a formação da protease ativa, Cys-EP, pela remoção do *motif* KDEL e de alguns aminoácidos N-terminal. Possivelmente esta maturação também ocorre por autocatálise e pela ação de carboxipeptidases ou outras proteases. A acidificação dos ricinossomos *in vivo* pode ocorrer por uma mudança na permeabilidade do tonoplasto nos estágios finais da morte celular programada (SCHMID *et al.*, 2001).

Proteases cisteínicas são responsáveis por degradar proteínas de reserva nos endospermas (FINCHER, 1989). Tal fato é confirmado pelo aumento da atividade proteolítica concomitantemente com o processo germinativo (BIELAWSKI *et al.*, 1994; NGUYEN *et al.*, 1995; ZHANG & JONES, 1995; SUTOH *et al.*, 1999). Prabucka & Bielawski (2004) identificaram sete proteases cisteínicas no endosperma de grãos de trigo em germinação. Uma destas, denominada EP8, possivelmente é a principal envolvida na mobilização de proteínas de reserva do endosperma de grãos de trigo em germinação. EP8 tem massa molecular de 39,5 kDa e pH ótimo entre 4,2 e 5,2.

Em legumes, muitas proteases cisteínicas são sintetizadas durante a germinação, mas o aumento da atividade proteolítica ocorre após o início da degradação de globulinas. Em *Vigna sativa*, a protease ativa só é detectada quando

a degradação das globulinas já terminou, e o mesmo ocorre no endosperma de *R. communis* (SCHMID *et al.* , 1998).

1.2.2 – *Proteases nas folhas de mamona*

Como um dos mecanismos de defesa, as plantas produzem uma variedade de proteínas em resposta a estresses bióticos e abióticos. Os jasmonatos são moléculas sinalizadoras que desempenham uma função crucial na resposta a injúria e que regula a síntese de muitas proteínas de defesa, incluindo as proteases. Estas enzimas estão também envolvidas na regulação da senescência foliar e são induzidas pelo tratamento com metil jasmonato. Maciel (2007) investigou os efeitos do ferimento mecânico e do tratamento com metil jasmonato (MJ) sobre o padrão de proteínas foliares da mamona (*Ricinus communis* L.) e sobre a atividade proteolítica. Neste trabalho, foi demonstrado, por zimografia em gel de gelatina, que o metil jasmonato e o ferimento induzem alterações no padrão proteolítico de folhas de mamona. Duas proteases cisteínicas (38 e 29 kDa) foram induzidas pelos tratamentos empregados. Entretanto, MJ induziu níveis mais altos de proteases que o ferimento mecânico durante o período de estresse (24, 48 e 72 h). O aumento na atividade proteolítica espelha um declínio no conteúdo de proteínas solúveis e degradação da Rubisco, o que pode ser um indicador da iniciação da senescência em plantas de mamona. A protease de 29 kDa tem atividade ótima em pH ácido enquanto a protease de 38 kDa tem uma atividade ótima em pH neutro; ambas as proteases foram quase completamente inibidas por E-64 e cistatina, indicando que pertencem à classe das cisteíno proteases. A indução significativa dessas proteínas por MJ sugere uma possível função de proteases cisteínicas na senescência foliar e o seu envolvimento na regulação da resposta à injúria e ao estresse por metil jasmonato em plantas de mamona.

Assim, entendendo que o processo de esmagamento da semente para extração do óleo seja uma agressão abiótica, nossa hipótese de trabalho é que as proteases presentes nas sementes disparem um processo de degradação das proteínas de reserva, entre elas a ricina. Como é essa proteína o principal empecilho para a utilização de torta de mamona como ração animal, o que agregaria valor comercial a esse coproduto, muitos estudos têm sido conduzidos por inúmeros grupos de pesquisa a fim de desenvolver tecnologias eficientes e economicamente viáveis para destoxificar a torta de mamona. No entanto, nunca foi avaliado se após

a remoção do óleo o teor de ricina decresce ao longo do tempo de armazenamento da torta.

2 – Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é acompanhar a degradação de ricina na torta de mamona (*Ricinus communis* L.) permitindo utilização desta torta como ração animal.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a degradação de ricina ao longo do período de armazenamento de torta;
- Determinar o tempo mínimo de armazenamento da torta até a completa degradação da ricina;
- Determinar a atividade proteolítica nos diferentes tempos de armazenamento;

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Materiais

*3.1.1 – Sementes de mamona (*Ricinus communis* L.)*

As sementes de mamona (cultivar IAC-80) foram obtidas no Instituto Agrônômico de Campinas - São Paulo.

3.1.2 – Material para eletroforese

Glicina, acrilamida, bis-acrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS), persulfato de amônio, Tris-base e TEMED (N, N, N', N' – Tetrametiletilenoamina) foram obtidos da Sigma, PlusOne e Merck S/A Indústrias Químicas.

3.1.3 – Material para cromatografia de exclusão molecular

Resina Sephadex G-50 – Amersham Pharmacia

Ácido Trifluoroacético - Sigma

Coluna de vidro 50 x 1,5 cm

3.1.4 – Material para revelação de proteínas com azul de coomassie

Azul de coomassie R 250 – Sigma Co.

Metanol - Vetec

Ácido acético glacial - Merck S/A Indústrias Químicas

3.1.5 – Equipamentos

Aagitador magnético com aquecimento Q261 12 – Quimis

Balança BP210-S – Sartorius

Espectrofotômetro UV-mini 1240 – Shimadzu

ImageScanner PLIII – GE Healthcare

Medidor de pH W3B – Bel Engineering

Microcentrífuga S407R – Eppendorf

Sistema de cromatografia de baixa pressão – ECONO System - BioRad

Sistema de eletroforese vertical Mini Protean II – BioRad

3.2 – Metodologia

3.2.1 – Obtenção da torta

As sementes de *R. communis* foram esmagadas com pistilo dentro do almofariz. O produto da prensagem foi seco em papel toalha para melhor remoção do óleo e obtenção da torta com cerca de 10% de óleo residual, por análise gravimétrica.

3.2.2 – Armazenamento da torta

Armazenou-se a torta obtida em placas de petri com tampa por diferentes períodos de tempo (24, 48, 72 horas; 7, 15 dias; 1, 2, 3, 4, 5 e 6 meses) em estufa a 37 °C (denominado no trabalho como estufa) ou exposta às condições ambientes normais, sujeito ao calor do sol, aos dias chuvosos e todas as condições climáticas encontradas na região (chamada no trabalho de condições ambientais).

3.2.3 - Extração de proteínas da torta

3.2.3.1 – Extração de ricina

3.2.3.1a - Ácida (ANANDAN et al., 2004)

As proteínas da torta foram extraídas utilizando água acidificada com HCl para pH 3,8, na proporção 200 g/L sob agitação durante seis horas. Após esse tempo a amostra foi filtrada com papel Whatman e o resíduo sólido diluído em água (335 mg/mL) e mantido sob agitação novamente por três horas. O ácido clorídrico foi removido por destilação a vácuo e o extrato centrifugado a 4500 x *g* por vinte minutos, coletando-se a seguir o sobrenadante.

3.2.3.1b – Sem fervura

As proteínas de semente de *R. communis* foram extraídas utilizando-se água destilada, na proporção 1g de torta/10 mL de água. Logo após centrifugou-se o extrato por 5 minutos a 4100 x *g* e o sedimento foi descartado.

3.2.3.1c - Com fervura

As proteínas de semente de *R. communis*, entre elas a ricina, foram extraídas utilizando-se água destilada, na proporção 1g de torta/10 mL de água, seguido de banho fervendo por 5 minutos. Centrifugou-se o extrato por 5 minutos a 4100 x *g* e o sedimento foi descartado.

3.2.3.2 – Extração de proteases

A torta foi moída com tampão contendo fosfato de potássio 50 mM, cloreto de potássio 10 mM, EDTA 1 mM e DTT 1 mM, pH 7,4. A proporção utilizada foi 30 mL de tampão fosfato-DTT para cada 10g de torta. Filtrou-se o homogenato em quatro camadas de gaze sendo centrifugado a 270 x g por 10 minutos a 4 °C o filtrado, assim foram removidas as células não destruídas e os resíduos celulares. O sobrenadante foi centrifugado por 10500 x g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante coletado para os ensaios (GIETL *et al.*, 1997).

3.2.4 - Dosagem de proteínas

As determinações de proteínas foram feitas pelo método descrito por Bradford (1976), sendo utilizado ovalbumina (OVA) para a curva-padrão.

3.2.5 – Purificação de proteínas da torta

3.2.5.1 – Cromatografia de exclusão molecular

Os extratos de proteína da torta (para ricina) foram submetidos à cromatografia de exclusão molecular. As dimensões da coluna foram 50 x 1,5 cm. A resina utilizada foi Sephadex G-50, e o eluente ácido trifluoracético (TFA) 0,1%. A resina Sephadex G-50 foi embebida em TFA 0,1% e feito, então, o empacotamento da coluna. Depois de empacotada, a coluna foi equilibrada com o eluente (três vezes o volume da coluna) no fluxo de uso.

Cerca de 1 mL da amostra (10 mg) foi aplicado no topo da coluna. O fluxo utilizado foi de 1,0mL/min., sendo coletados 1 mL/tubo. Por esta metodologia separa-se uma fração rica em ricina, outra em albuminas 2S e uma com peptídeos de menor massa molecular.

3.2.6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes

3.2.6.1 - SDS-PAGE 12%

Os extratos de torta ricos em ricina nos diferentes períodos de armazenamento foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % na presença de SDS, segundo o método descrito por Laemmli (1970). Albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), tripsinogênio (24 kDa) e α -lactoalbumina bovina (14 kDa) serão usados como marcadores de massa molecular.

3.2.6.2 - Tricina

As amostras foram também analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e tricina, segundo o método descrito por Schgger e von Jagow (1987). O gel foi composto por um gel separador (15 cm x 9 cm x 0,1 cm; L x A x E), um gel espaçador (15 cm x 1 cm x 0,1 cm) e um gel concentrador (15 cm x 2,5 cm x 0,1 cm). Após a diluição das amostras no tampão de amostra (glicerol 12 %, SDS 4 %, β -mercaptoetanol 2 %, Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, e azul de Coomassie G 0,001 %), cerca de 75 μ g de proteínas foram aplicados em cada raia do gel e a corrida eletroforética foi realizada a 150 V por aproximadamente 8 horas a 4 $^{\circ}$ C. A corrida foi interrompida antes que o corante do tampão de amostra saísse do gel.

3.2.7 – Revelação de proteínas no gel

3.2.7.1 - Revelação com azul de coomassie

O gel foi corado com solução de azul de coomassie 0,1 % em metanol 40 % e ácido acético 10 %. Posteriormente, descorado com uma solução de metanol 40 % contendo ácido acético 10 %.

3.2.8- Zimografia em gel contendo gelatina

Durante esta análise foram utilizados géis de poliacrilamida 12 % sob condições não redutoras (LAEMMLI, 1970) copolimerizados com gelatina bovina 0,1 %.

Antes da eletroforese (40 mA) cada 135 μ g de amostra (extratos oriundos de torta nos diferentes tempos de armazenamento) era incubada com o tampão de amostra não redutor 4 x concentrado (glicerol 10 %, SDS 2 %, Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, e azul de bromofenol 0,005 %) e aplicada no gel. O gel foi composto por um gel separador (10 cm x 5 cm x 0,1 cm; L x A x E) e um gel concentrador (10 cm x 1 cm x 0,1 cm). O tampão de corrida utilizado composto de Tris 25 mM e glicina 192 mM, pH 8,3. Após a corrida, o gel foi lavado duas vezes por 30 min com 25 mL de solução de Triton X-100 2.5% para remoção do SDS e incubado em 25 mL do tampão de atividade proteolítica (Tris-HCl 0,1M pH 8,0) durante 16 h sob a temperatura de 37 $^{\circ}$ C.

Ao término desse período o gel foi corado com azul de Coomassie R250 0,1 % em solução de metanol/ácido acético/água destilada (4:1:5) por 2 h e descorado usando solução de metanol/ácido acético/água destilada (4:1:5) por mais 1 h. As

áreas de proteólise aparecem no gel como zonas claras em contraste com o plano de fundo azulado.

3.2.9 - Efeito do pH sobre a atividade proteolítica

Para este ensaio foram utilizadas as amostras de torta que foram armazenadas por 15 dias, uma vez que nelas eram observados níveis mais elevados de atividade proteolítica. Após a zimografia e as lavagens com Triton X-100 cada raia do gel foi incubada em 25 mL dos seguintes tampões: acetato de sódio 0,1 M, pH 3,0, 4,0 e 5,0; tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 5,0, 6,0 e 7,0; tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0. Após 16 horas no tampão de atividade a 37 °C, as raia dos géis foram coradas com 30 mL de corante por 2 h e descoradas com 30 mL de descorante por 1 hora.

3.2.10 – Efeito de diferentes inibidores de proteases sobre a atividade proteolítica

As classes de proteases presentes na torta de mamona foram determinadas empregando inibidores específicos no tampão de atividade proteolítica. Para este ensaio foram utilizadas as amostras de torta que foram armazenadas por 15 dias, uma vez que nelas eram observados níveis mais elevados de atividade proteolítica.

O extrato foi fracionado por eletroforese e o gel foi lavado como descrito no item 4.2.8. O gel foi então seccionado e as tiras referentes a cada raia de gel foram incubados em 15 mL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 contendo os seguintes inibidores: iodoacetamida, pepstatina 1 µM, PMSF 1 mM, EDTA 10 mM. As substâncias usadas neste ensaio de inibição são conhecidas por inibir especificamente proteases cisteínicas (iodoacetamida), proteases serínicas (PMSF), proteases aspárticas (pepstatina) e metaloproteases (EDTA).

Após a adição de inibidores as amostras foram incubadas por 16 h a 37 °C em estufa. Controles de atividade foram feitos em paralelo utilizando o mesmo tampão de atividade sem a adição de inibidores ou ativadores.

Ao término de 16 horas de incubação a 37 °C, as raia dos géis foram coradas com 30 mL de corante por 2 h e descoradas com 30 mL de descorante por 1 hora.

4 – Resultados

4.1 – Comparação de diferentes protocolos de extração de proteínas na torta

A literatura apresenta diferentes metodologias para a extração de proteínas da semente de mamona voltadas para a visualização das bandas de ricina, sendo o protocolo descrito por Anandan *et al.* (2004) o mais citado por outros autores.

Neste trabalho comparamos três metodologias de extração de proteínas da torta para avaliarmos se diferentes métodos resultariam em diferentes visualizações de bandas. A Figura 5 demonstra que os três métodos avaliados não resultam em diferentes visualizações das bandas de ricina, indicada por seta vermelha. As diferenças que acontecem ocorrem na banda de 45 kDa que não aparece na extração ácida (ANANDAN *et al.*, 2004), assim como a extração ácida parece favorecer as proteínas com massa em torno de 20 KDa.

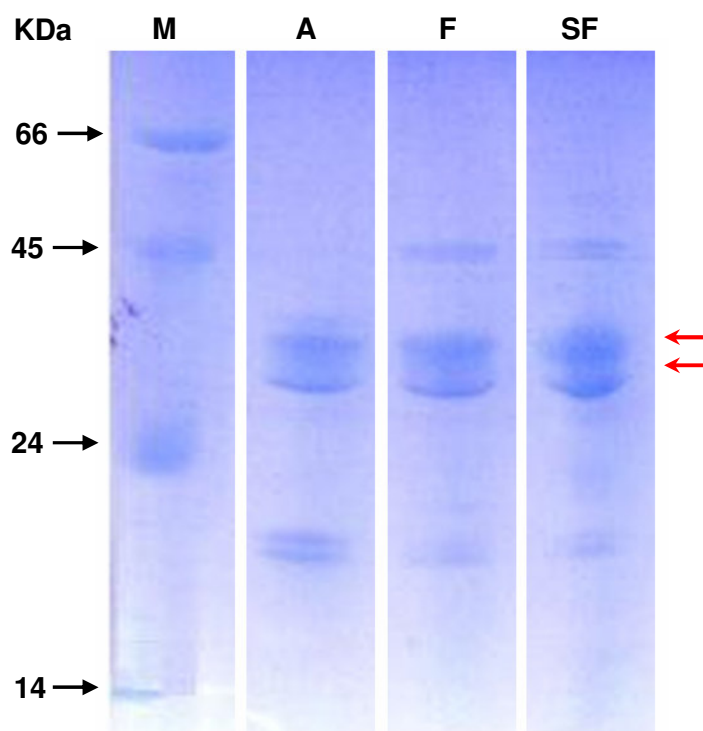


Figura 5: Análise dos diferentes modos de extração de proteínas da torta de mamona por SDS-PAGE 12%. Raias: **M** - marcador de peso molecular, **A** – extração ácida (ANANDAN *et al.*, 2004), **F** – extração fervendo 5 minutos, **SF** – extração sem fervura. Em cada poço foram aplicados 35ug de proteínas, sendo o gel corado com azul de coomassie.

Como não observou-se diferença significativa entre os três protocolos para a visualização das bandas de ricina, em nossos experimentos decidiu-se utilizar o protocolo com fervura por 5 minutos.

4.2 – Mudanças no teor de ricina nas amostras de torta de mamona

As mudanças no teor de ricina nas amostras armazenadas em diferentes períodos de tempo foram verificadas por três metodologias diferentes: SDS-PAGE 12%, SDS-Tricina-PAGE e cromatografia de exclusão molecular.

4.2.1 – SDS-PAGE 12%

A eletroforese em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes foi a primeira metodologia empregada. Nesta etapa observa-se que nos períodos de armazenamentos mais longos as bandas oriundas da molécula de ricina (setas vermelhas) desaparecem (Figura 7) ou diminuem (Figura 6).

A Figura 6 representa o perfil protéico das amostras armazenadas na estufa a 37 °C. Pode-se perceber que da amostra inicial para a de sete dias de armazenamento já ocorre uma leve diminuição nas bandas de ricina. Esse teor permanece semelhante até o segundo mês de armazenamento, neste período observa-se novamente uma gradativa diminuição na intensidade das bandas de ricina, até o sexto mês quando as bandas ficam mais tênues.

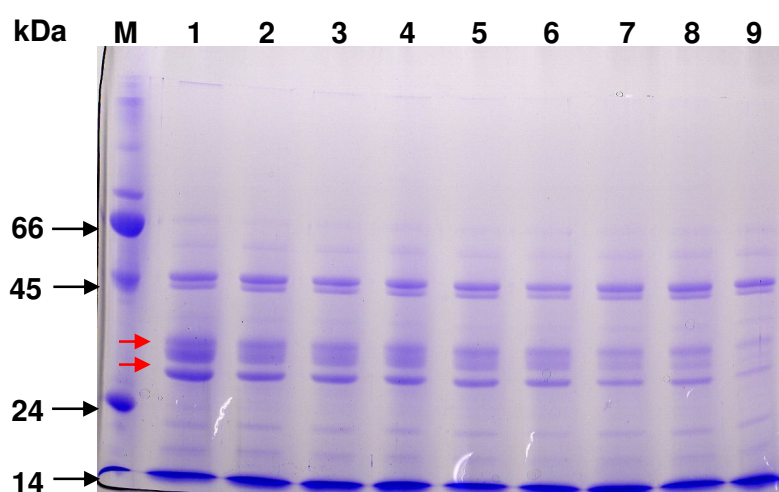


Figura 6: Análise do perfil protéico das amostras de torta de mamona armazenadas na estufa por SDS-PAGE 12%. **M** – marcador de peso molecular, **1** – torta inicial, **2** – torta armazenada por 7 dias, **3** – torta armazenada por 15 dias, **4** – torta armazenada por 1 mês, **5** – torta armazenado por 2 meses, **6** – torta armazenada por 3 meses, **7** – torta armazenada por 4 meses, **8** – torta armazenada por 5 meses, **9** – torta armazenada por 6 meses. Em cada poço foram aplicados 35ug de proteínas, sendo o gel corado com azul de coomassie. As setas vermelhas indicam as bandas oriundas da molécula de ricina.

A Figura 7 representa o perfil protéico das amostras armazenadas nas condições ambientais, ou seja, em condições ambientais naturais sujeitas as todas as variações climáticas da região. Nota-se que esse processo de armazenamento se mostrou bem mais eficaz que o sob temperatura controlada. A diminuição das bandas de ricinas é gradativa e mais rápida que a da estufa; com dois meses de armazenamento podemos observar resultando semelhante a seis meses de armazenamento na estufa.

O armazenamento nas condições ambientais não degrada somente a banda de ricina, mas as demais proteínas maiores, isso faz com que do segundo para o terceiro mês bandas em torno de 32 kDa apareçam provavelmente oriundas da degradação das bandas de 45 kDa. Assim com cinco meses de armazenamento não se verifica a presença das bandas de ricina.

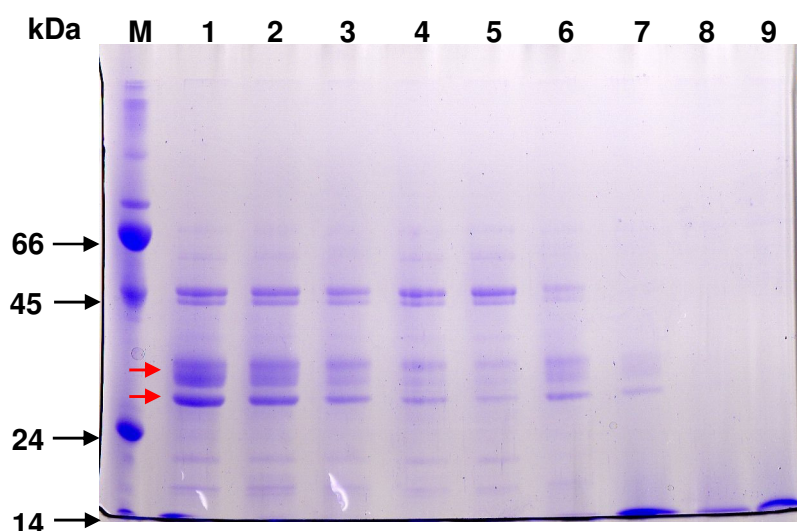


Figura 7: Análise do perfil protéico das amostra de torta de mamona armazenadas nas condições ambientais por SDS-PAGE 12%. **M** – marcador de peso molecular, **1** – torta inicial, **2**- torta armazenada por 7 dias, **3** – torta armazenada por 15 dias, **4** – torta armazenada por 1 mês, **5** – torta armazenado por 2 meses, **6** – torta armazenada por 3 meses, **7** – torta armazenada por 4 meses, **8**- torta armazenada por 5 meses, **9** – torta armazenada por 6 meses. Em cada poço foram aplicados 35ug de proteínas, sendo o gel corado com azul de coomassie. As setas vermelhas indicam as bandas oriundas da molécula de ricina.

4.2.2 – Eletroforese em gel de tricina (SDS-Tricina-PAGE)

A segunda metodologia para verificar as mudanças no teor de ricina nas amostras de torta de mamona foi a eletroforese em gel de tricina. Essa metodologia teve por intenção verificar a formação de peptídeos oriundos da proteólise.

A Figura 8 representa o resultado obtido nesta etapa. Nela podemos confirmar a degradação das bandas de ricina (setas vermelhas), com a maior eficiência para as amostras expostas as condições ambientais, uma vez que nestas amostras, com 4 meses não são visualizadas as bandas de ricina e com 2 meses de armazenamento temos um resultado comparável ao de 6 meses na estufa.

A formação de peptídeos não é tão bem visualizada, mas pode ser verificada de forma branda quando comparamos as amostras expostas as condições ambientais sete dias para quinze dias e esta para um mês. Na estocagem na estufa podemos acreditar que ocorre a formação de peptídeos no sexto mês de armazenamento quando comparado ao quinto mês.

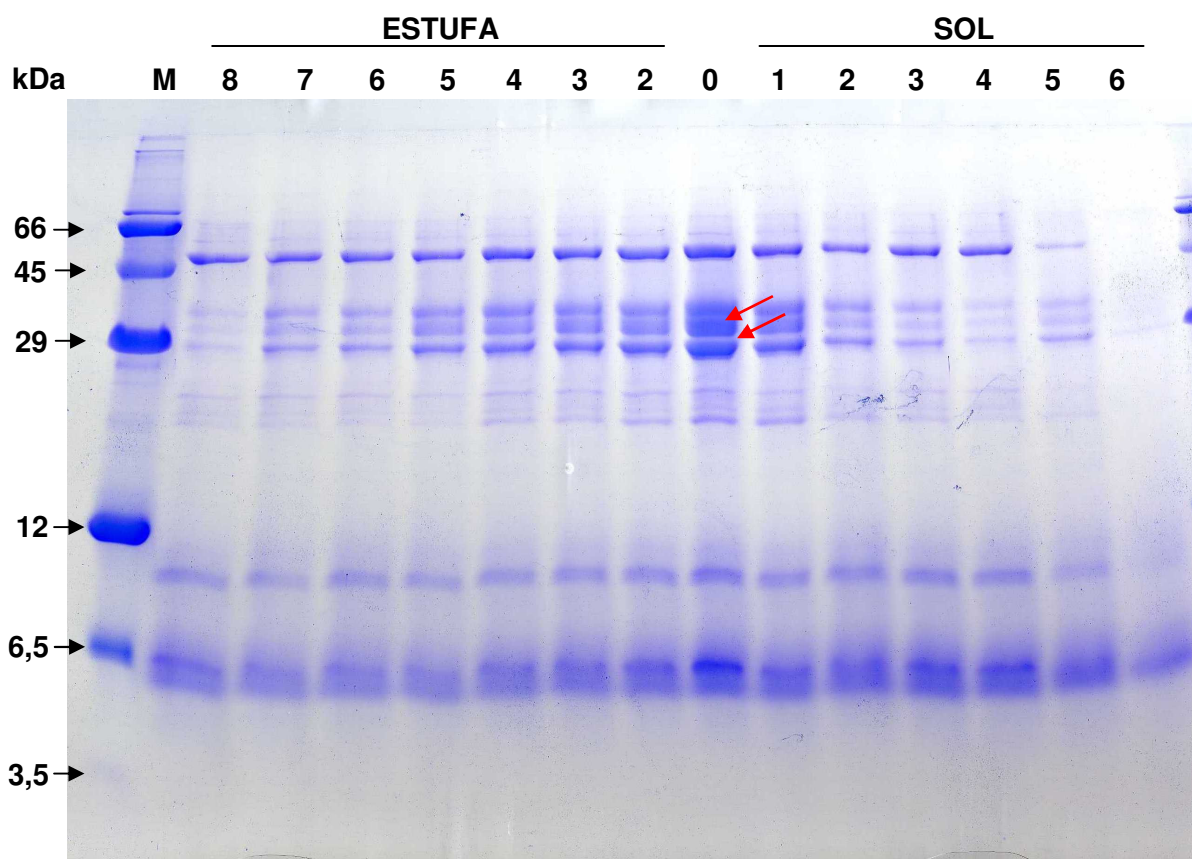


Figura 8: Eletroforese em gel de tricina da torta de mamona armazenada em estufa e nas condições ambientais. **M** – marcador de peso molecular, **0** – torta inicial, **1**- torta armazenada por 7 dias, **2** – torta armazenada por 15 dias, **3** – torta armazenada por 1 mês, **4** – torta armazenado por 2 meses, **5** – torta armazenada por 3 meses, **6** – torta armazenada por 4 meses, **7**- torta armazenada por 5 meses, **8** – torta armazenada por 6 meses. Em cada poço foram aplicados 75ug de proteínas. O gel foi corado com azul de coomassie. As setas vermelhas indicam as bandas da molécula de ricina.

4.2.3 – Cromatografia de exclusão molecular

As amostras de torta de mamona quando submetidas à cromatografia de exclusão molecular utilizando a resina Sephadex G-50 e TFA 0,1% como eluente

apresentam um gráfico característico que revela três frações protéicas assim ordenadas, proteínas maiores - F1 - onde encontramos a ricina (66 kDa), proteínas pequenas – F2 - onde encontramos as albuminas 2S (10 a 14 kDa) e uma terceira fração – F3 - onde são encontrados peptídeos (FERNANDES *et al.*, 2008).

As amostras de torta obtidas com a estocagem em diferentes períodos de tempo foram analisadas e nas Figuras 9 e 10, pode-se perceber que a medida que o tempo de estocagem aumenta o primeiro pico, representando a fração que contém ricina, diminui de tamanho. Em contrapartida, o terceiro pico, que representa a fração formada por peptídeos, aumenta.

A Figura 9 demonstra que F1, representando a fração que contém ricina cai em função do tempo de armazenamento, reduzindo-se a metade após 4 meses de estocagem, sendo o tempo 6 meses o menor pico observado. Esta queda é acompanhada por aumento de F3 que sofre um incremento de 0,1 para 0,15 de absorvância com 6 meses de estocagem. F2 não sofre alteração significativa durante o período observado.

O mesmo perfil geral é observado na Figura 10, que corresponde as amostras armazenadas sob as condições ambientais normais. Entretanto, nestas condições de armazenamento, F1 desaparece após 2 meses de estocagem e F3 sofre um incremento, que não ocorre na mesma proporção da queda de F1. F2 novamente parece não sofrer alteração significativa.

A estocagem nas condições ambientais (Figura 10) mostrou-se mais eficiente que a estocagem na estufa (Figura 9) pois a amostra de torta 6 meses da estufa apresenta o primeiro pico pouco mais baixo que a amostra 1 mês nas condições ambientais.

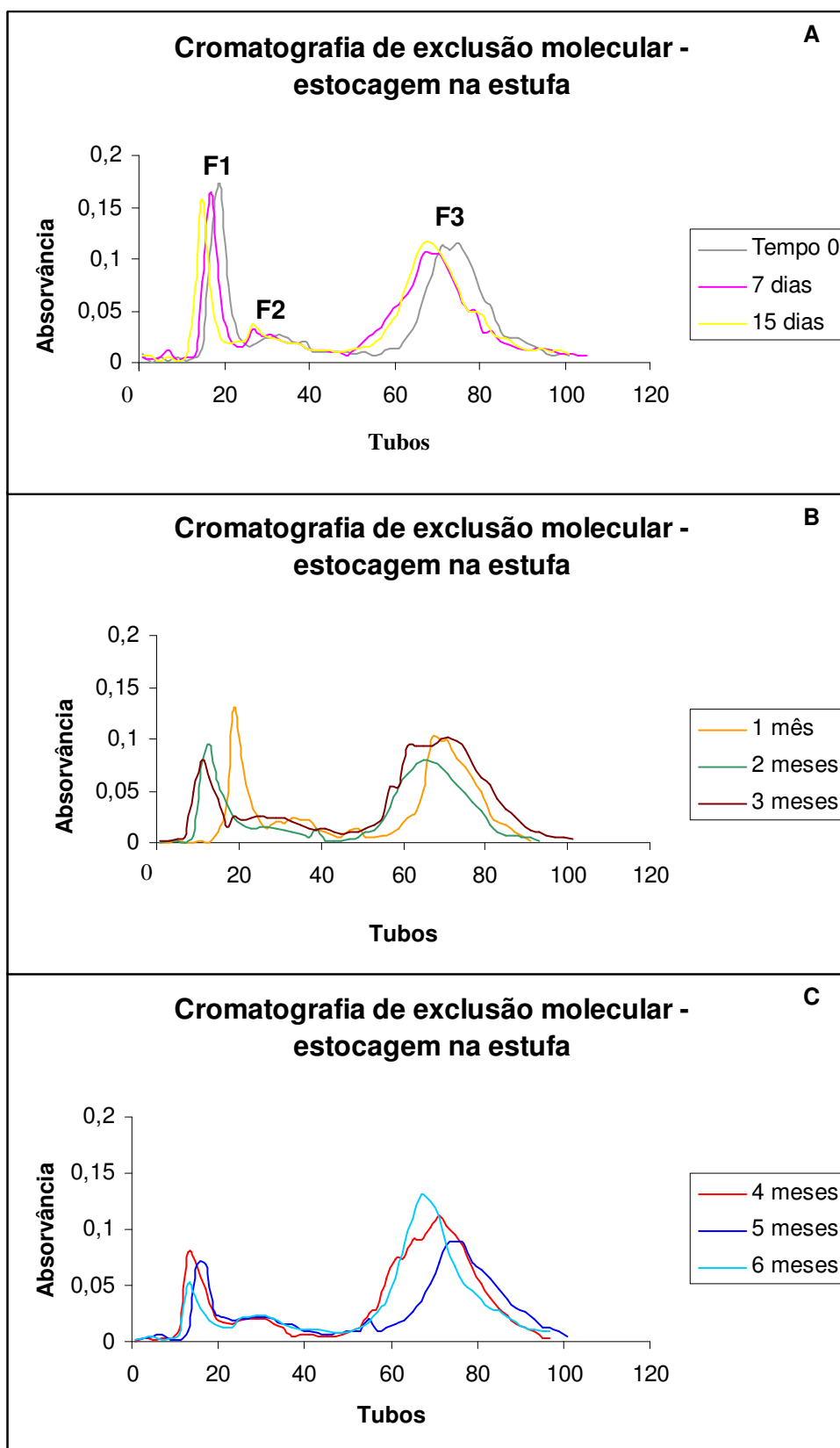


Figura 9: Cromatografia de exclusão molecular das amostras de torta de mamona armazenadas na estufa, **A** – tempos 0, 7 dias e 15 dias; **B** – tempos 1 mês, 2 meses e 3 meses; **C** – tempos 4 meses, 5 meses e 6 meses. Resina Sephadex G-50, eluente TFA 0,1% com fluxo de 1 mL/min, leitura 280 nm.

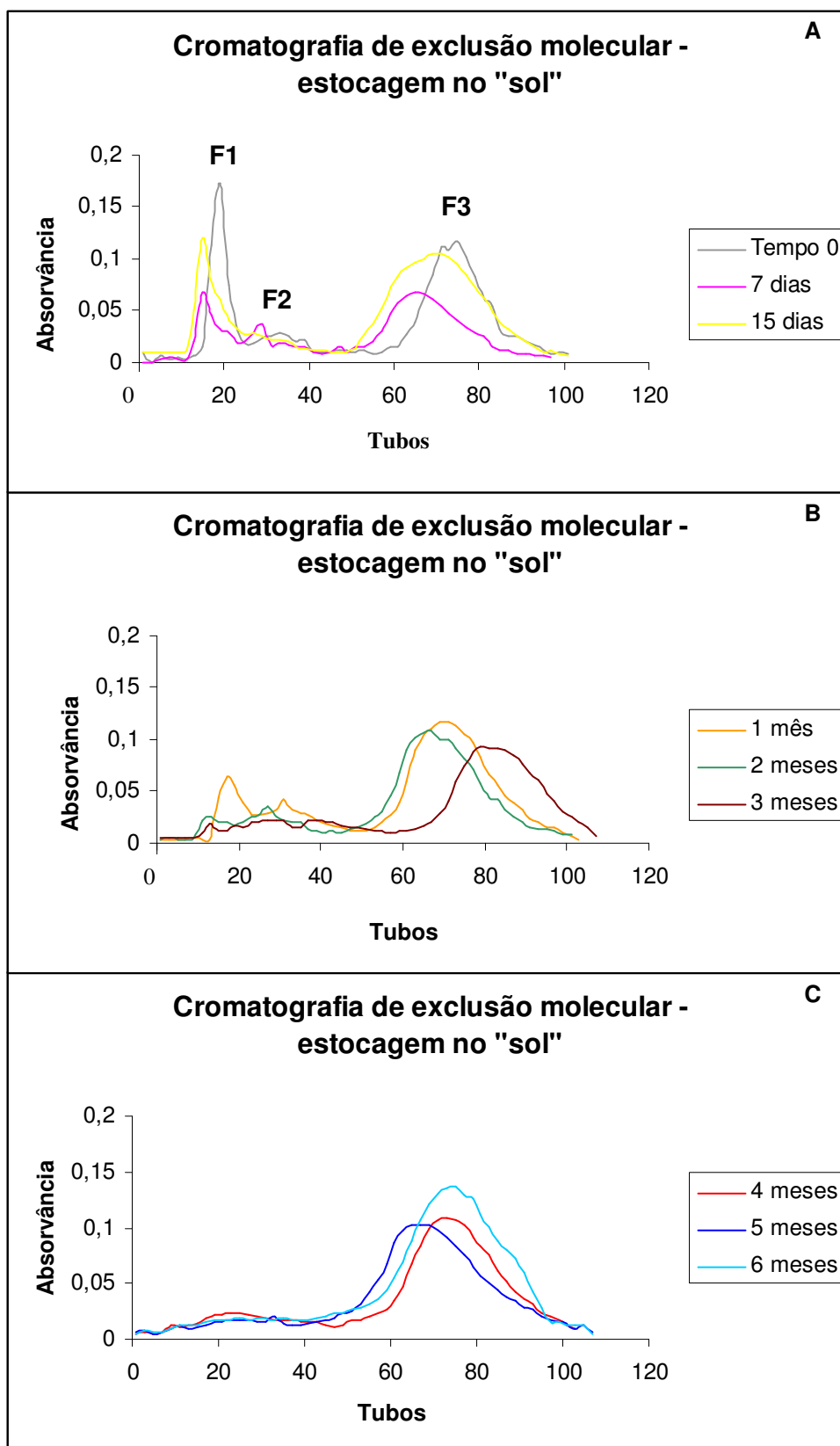


Figura 10: Cromatografia de exclusão molecular das amostras de torta de mamona armazenadas nas condições ambientais. **A** – tempos 0, 7 dias e 15 dias; **B** – tempos 1 mês, 2 meses e 3 meses; **C** – tempos 4 meses, 5 meses e 6 meses. Resina Sephadex G-50, eluente TFA 0,1% com fluxo de 1 mL/min, leitura 280 nm.

4.3 – Proteases na torta de mamona

A queda na fração F1 observada no experimento anterior, bem como os resultados observados nos géis de poliacrilamida podem ser explicados por uma atividade proteolítica nas amostras de tortas de mamona.

A atividade proteolítica das amostras de torta de mamona foi avaliada usando zimografia em gel contendo gelatina, sendo cada raia do gel carregada com a mesma quantidade de proteína (125 µg).

Nas Figuras 11 e 12 estão apresentados os resultados das zimografias para as tortas armazenadas na estufa e nas condições ambientais, respectivamente. Observa-se a presença de duas isoformas de proteases ativas na torta de mamona – indicadas por setas vermelhas. Ademais existem dois tempos onde a atividade proteolítica é maior, nas amostras da estufa esses tempos são com três e quatro meses (Figura 11) e nas amostras em condições ambientais com dois e três meses (Figura 12). O pico de atividade proteolítica mais precoce nas tortas armazenadas nas condições ambientais pode explicar a degradação protéica mais rápida nessas amostras, conforme observado nos experimentos anteriores.

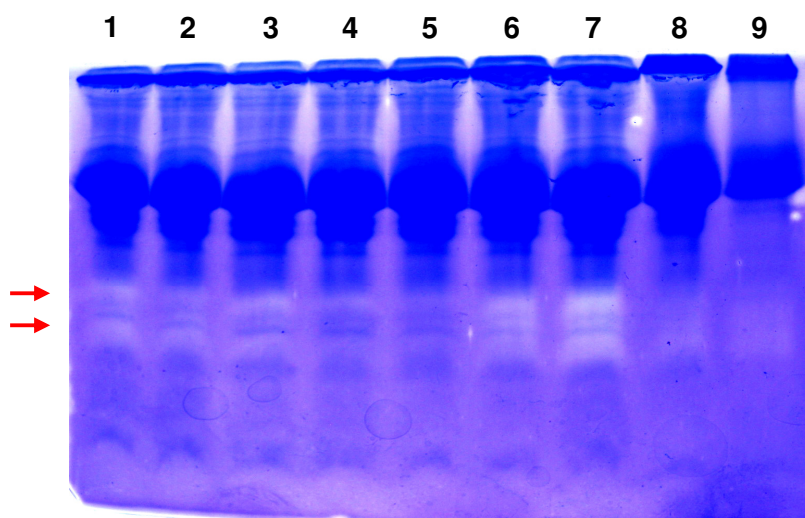


Figura 11: Análise da atividade proteolítica das amostras de torta de mamona armazenadas na estufa (SDS-PAGE 12% copolimerizado com gelatina bovina 0,1%). 1- torta inicial, 2 – torta armazenada por 7 dias, 3 – torta armazenado por 15 dias, 4 – torta armazenada por 1 mês, 5 – torta armazenada por 2 meses, 6 – torta armazenada por 3 meses, 7 – torta armazenada por 4 meses, 8 – torta armazenada por 5 meses, 9 – torta armazenada por 6 meses. Em cada poço foram aplicados 135ug de proteínas. A reação se estendeu por 16 horas a 37 °C incubada em tampão Tris-HCl, pH 8,0, sendo o gel posteriormente corado com azul de coomassie.

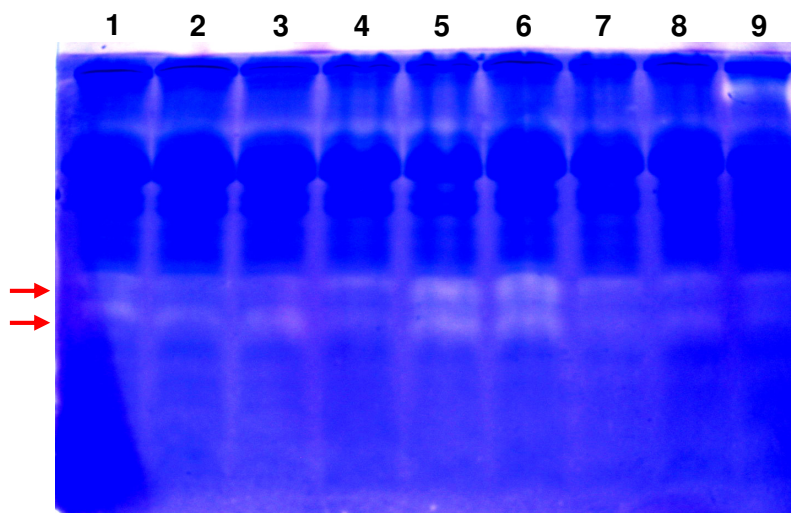


Figura 12: Análise da atividade proteolítica das amostras de torta de mamona armazenadas nas condições ambientais (SDS-PAGE 12% copolimerizado com gelatina bovina 0,1%). **1**- torta inicial, **2** – torta armazenada por 7 dias, **3** – torta armazenado por 15 dias, **4** – torta armazenada por 1 mês, **5** – torta armazenada por 2 meses, **6** – torta armazenada por 3 meses, **7** – torta armazenada por 4 meses, **8** – torta armazenada por 5 meses, **9** – torta armazenada por 6 meses. Em cada poço foram aplicados 135ug de proteínas. A reação se estendeu por 16 horas a 37 °C incubada em tampão Tris-HCl, pH 8,0, sendo o gel posteriormente corado com azul de coomassie.

4.4 – Efeito do pH sobre a atividade proteolítica

Com o objetivo de determinar a faixa de pH de melhor atividade das proteases observadas na torta de mamona, o extrato referente a 4 meses de armazenamento na estufa foi utilizado como controle em ensaio de atividade por SDS-PAGE 12% copolimerizado com gelatina. Após a eletroforese, cada raia de gel foi seccionada e incubada no tampão apropriado variando numa faixa de pH de 3,0 a 10,0, por um período de 16 h a 37 °C. O resultado após coloração e descoloração do gel é mostrado na Figura 13.

Pode-se perceber que ambas as proteases possuem boa atividade proteolítica na faixa de pH neutro, com a atividade ótima em pH 8,0.

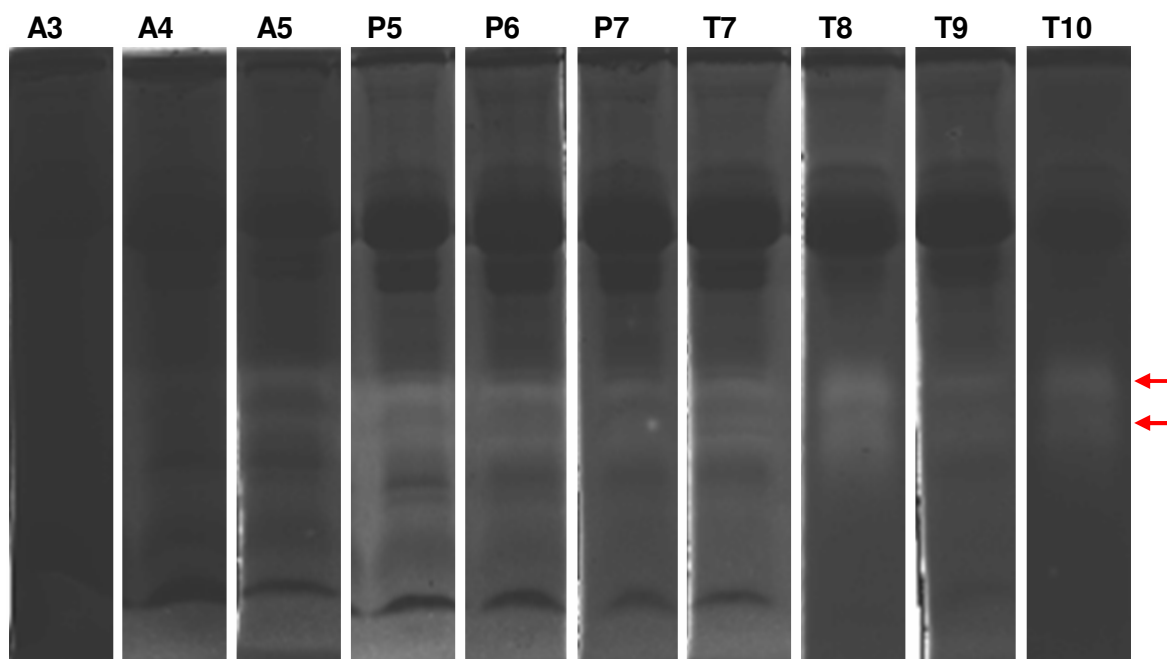


Figura 13: Determinação do pH ótimo da atividade proteolítica por SDS-PAGE 12% copolimerizado com gelatina de amostra controle do extrato protéico de torta de mamona. **A3** – tampão acetato de sódio 0,1M pH 3,0; **A4** – tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,0; **A5** – tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0; **P5** – tampão fosfato de sódio 0,1M pH 5,0; **P6** – tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,0; **P7** – tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0; **T7** – tampão tris-HCl 0,1M pH 7,0; **T8** – tampão tris-HCl 0,1M pH 8,0; **T9** – tampão tris-HCl 0,1M pH 9,0; **T10** – tampão tris-HCl 0,1M pH 10,0. Em cada poço foram aplicados 135ug de proteínas e o tempo de reação foi de 16 horas a 37 °C.

4.5 – Efeito de diferentes inibidores de proteases sobre a atividade proteolítica

A fim de determinar as classes de proteases encontradas nas tortas de mamona estocadas, ensaios de inibição em gel de gelatina foram realizados utilizando o tempo 4 meses de armazenamento na estufa como atividade controle. Após a eletroforese os géis foram incubados em tampão tris-HCl 0,1M, pH 8,0 com os inibidores correspondentes na concentração apropriada. A inibição foi visualizada pela ausência ou decréscimo na intensidade das bandas proteolíticas em comparação com os géis controle revelados na ausência de inibidores (Figura 14).

As substâncias usadas neste ensaio de inibição são conhecidas por inibir especificamente proteases cisteínicas (iodoacetamida), proteases serínicas (PMSF), proteases aspárticas (pepstatina A) e metaloproteases (EDTA). A Figura 14 mostra o efeito dos inibidores sobre as proteases de torta de mamona. A atividade proteolítica é completamente inibida pela adição de EDTA ao tampão, sugerindo que as proteases da torta de mamona observadas neste estudo pertencem à classe das

metaloproteases. Em contrapartida os demais inibidores não demonstraram efeito significativo sobre a atividade das proteases.

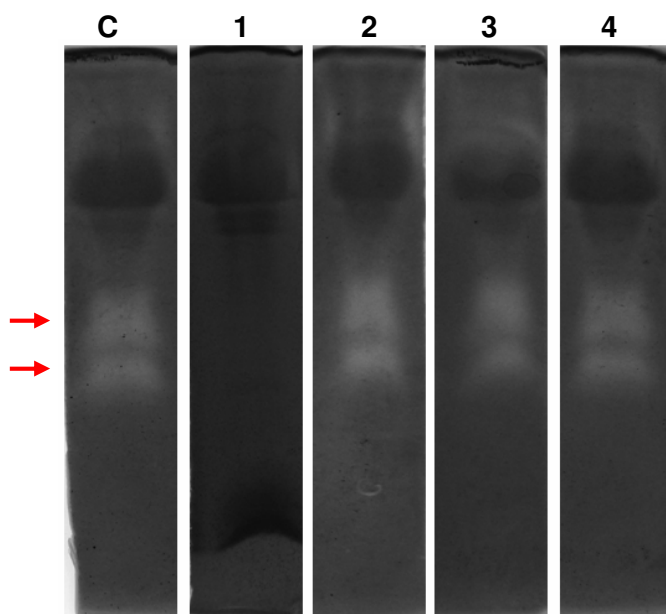


Figura 14: Efeito de inibidores de proteases na atividade proteolítica (SDS-PAGE 12% copolimerizado com gelatina) de amostra controle da torta de mamona. **C** – controle, **1** - EDTA, **2**- PMSF, **3** – Iodoacetamida, **4** - Pepstatina. Em cada poço foram aplicados 135ug de proteínas e o tempo de reação foi de 16 horas a 37 °C em tampão tris-HCl 0,1M pH 8,0.

5 – Discussão

A crise mundial do petróleo e a preocupação com a proteção do ambiente levaram o mundo à pesquisa de combustíveis renováveis (BARNWAL & SHARMA, 2005). O biodiesel surgiu com força no Brasil no início deste século e hoje faz parte da matriz energética com sua adição ao diesel de petróleo (ABIOdiesel disponível em < <http://www.biodiesel.org.br/> > acesso em: 15/07/09). Com base do consumo de 2003, serão necessários 786 milhões de litros de biodiesel para cada 2% de adição ao diesel, sendo o óleo de mamona considerado o melhor óleo vegetal para esse fim, estima-se que 40% do montante de biodiesel advenha do óleo de mamona (BELTRÃO & LIMA, 2007; NASS *et al*, 2007; PARENTE, 2004).

A torta de mamona é o mais tradicional e importante coproduto da mamona após a extração do óleo (CÂNDIDO *et al.*, 2008). Trata-se de um produto tóxico, mas, devido ao elevado teor protéico e de fibras, processos de inativação da toxicidade estão sendo desenvolvidos para torná-la apropriada ao uso em rações animais (AZEVEDO & BELTRÃO, 2007). Esses processos são bastante complexos e de alto custo, fazendo com que as usinas vendam a torta apenas como fertilizante para jardim (CÂNDIDO *et al.*, 2008). Segundo BANDEIRA *et al.* (2004) ainda continua sendo um grande desafio um processo de destoxificação com viabilidade econômica.

A ricina é uma proteína de reserva encontrada exclusivamente no endosperma das sementes de mamona e é a principal responsável pela toxicidade da torta de mamona, uma vez que tem a capacidade de inibir a síntese protéica, inativando os ribossomos. Neste estudo foi verificado que sua presença na torta de mamona pode ser eliminada apenas com a estocagem da torta (Figura 7). Corroborando com a proteólise de ricina ocorre aumento na atividade enzimática das amostras de torta de mamona (Figuras 11 e 12).

A presença da molécula de ricina é verificada por eletroforese em gel de poliácridamida sob condições desnaturantes pela presença das bandas de 32 e 34 kDa (ROBERTUS, 1988; FRIGERIO & ROBERTS, 1998). Nossos experimentos revelam o desaparecimento destas bandas em tortas de mamona que ficaram armazenadas por um período de tempo de até 6 meses. As estocagens se deram nas condições ambientais normais, sujeito ao calor do sol, aos dias chuvosos e todas as condições climáticas encontradas na região, e em uma condição controlada a 37 °C. Verificou-se que nas condições ambientais as bandas de ricina

desaparecem completamente no quinto mês de estocagem (Figura 7), obtendo resultados semelhantes ao processo de autoclavagem por 60 minutos a 15 psi (ANANDAN *et al.*, 2004) e fermentação em estado sólido pelo fungo *Penicillium simplicissimum* (GODOY, 2008). A estocagem a 37 °C revela o mesmo desaparecimento das bandas, entretanto, mais tardiamente (Figura 6).

O desaparecimento das bandas pode estar ligado diretamente a utilização da maquinaria usada para a degradação de proteínas durante o desenvolvimento normal da semente, desta forma peptídeos estariam sendo gerados. Para verificar se essa hipótese era verdadeira, avaliamos as amostras de torta utilizando eletroforese em gel de tricina e por cromatografia de exclusão molecular.

O gel de tricina (Figura 8) sugere, de forma bem discreta, que a formação de peptídeos à medida que as proteínas são degradadas poderia estar ocorrendo, conforme se pode verificar quando comparamos as amostras expostas ao nas condições ambientais sete dias para quinze dias e esta para um mês e as armazenadas na estufa no sexto mês quando comparado ao quinto mês.

A cromatografia de exclusão molecular das amostras de torta revelou um resultado mais claro sobre a formação de peptídeos; a fração que corresponde a proteínas maiores (F1) na qual se encontra a ricina diminui com o passar do tempo de estocagem enquanto a fração de peptídeos (F3) aumenta nas amostras com maior período de estocagem (Figuras 9 e 10). Novamente é notório a maior eficiência da estocagem nas condições ambientais quando nas amostras a partir do quarto mês de estocagem não observamos mais o pico da fração 1, enquanto observamos uma fração 3 com pico maior.

A verificação do desaparecimento das bandas de ricina em eletroforese SDS-PAGE é o método que vem sendo utilizado como parâmetro para avaliar a sua presença ou ausência na torta de mamona, uma vez que, Anandan e outros (2004) apresentaram uma torta isenta de ricina após autoclavagem da torta de acordo com este método. No entanto, esse método não determina a atividade biológica de toxinas, como a ricina. Assim é importante salientar que para total validação da utilização de torta de mamona como ração animal, isenta da toxina ricina e, desta forma segura, se faz necessário a realização de testes *in vitro* ou *in vivo* com as possíveis tortas de mamona destoxificadas utilizando cultura de células ou animais em escala experimental, respectivamente (BRZEZINSKI & CRAFT, 2007).

A degradação de proteínas em plantas está associada a diferentes estágios do desenvolvimento, tais como, germinação, diferenciação e morfogênese, senescência, e morte celular programada (PALMA *et al.*, 2002). A morte celular programada em sementes de *R. communis* ocorre apenas após a germinação (SCHMID *et al.*, 2001) e a senescência do endosperma após a completa mobilização das proteínas de reserva e dos lipídios (GIETL *et al.*, 1997). A participação de proteases é essencial para que quaisquer destes eventos ocorram (PALMA *et al.*, 2002).

As cisteíno-proteases são o grupo mais bem estudado de proteases em plantas e estão envolvidas, entre outros, com a senescência e a mobilização de proteínas durante a germinação (SUTOH *et al.*, 1999; SCHLERETH *et al.*, 2000). Maciel (2007) verificou a indução de proteases cisteínicas por tratamento com metil jasmonato e injúria com concomitante degradação da Rubisco, sugerindo a essas proteases uma possível função na senescência foliar e um envolvimento na regulação da resposta à injúria em plantas de *Ricinus communis*.

Entendendo que o processo de esmagamento da semente para extração do óleo seja uma agressão abiótica, acreditamos que as proteases presentes nas sementes tornem-se aptas a disparar, após o processo de esmagamento, a degradação das proteínas de reserva, entre elas a ricina. Nossa hipótese fica fortalecida com a descrição da presença da protease cisteínica Cys-EP nos ricinossomos, sob uma isoforma de 45 kDa relativamente inativa até os últimos estágios da senescência do endosperma, quando é clivada na forma ativa de 35 kDa (SCHMID *et al.*, 1998).

As amostras de torta de mamona que foram submetidas à zimografia em gel contendo gelatina revelaram a atividade de duas proteases que estão ativas na torta, mas possuem atividade aumentada no terceiro/quarto mês de estocagem na estufa (Figura 11) e no segundo/terceiro mês de estocagem nas condições ambientais (Figura 12). Ambas as isoformas possuem atividade proteolítica em uma faixa de pH que varia de 5,0 até 10, mas sua atividade ótima é em pH 8,0 (Figura 13). Quando incubada com diferentes inibidores de proteases, as isoformas foram completamente inibidas por EDTA, sem sofrer influência significativa pelos outros inibidores (Figura 14), o que sugere que as isoformas pertençam a classe das metaloproteases.

As metaloproteases são o grupo de proteases menos conhecido em plantas. Entre as metaloproteases, a mais bem estudada é a enzima FtSH, cloroplasto ATP-

dependente (LINDAHL *et al.*, 2000), possivelmente envolvida na remoção de polipeptídeos desmontados ou incompletamente sintetizados (ADAM, 1996). Niere *et al.* (1998) identificaram uma enzima desta classe em folhas senescentes de alfafa e verificaram que ela era capaz de degradar a Rubisco *in vitro*. Metaloproteases capazes de degradar *in vitro* proteínas de reserva das sementes onde foram identificadas são descritas em trigo mourisco e soja (BELOZERSKY *et al.*, 1990 ; BOND & BOWLES, 1983).

Assim como as metaloproteases verificadas neste trabalho, a MPR do trigo mourisco possui atividade ótima entre pH ligeiramente ácido a ligeiramente básico e tem sua atividade aumentada durante e após a germinação (BELOZERSKY *et al.*, 1990). A embebição das sementes de trigo mourisco na presença de EDTA previne a mobilização de globulinas, indicando que a MPR deve ser a responsável pela mobilização das proteínas de reserva (DUNAEVSKY & BELOZERSKY, 1993). No entanto, essa responsabilidade é dividida com uma protease cisteínica – CPR - ativada nos estágios finais da germinação. Ensaios *in vitro* mostram que a CPR, que possui pH ótimo ácido, só é capaz de degradar a globulina 13S do trigo mourisco após prévia atuação realizada pela MPR, não sendo possível detectar os fragmentos gerados após certo tempo por ensaios imunológicos ou eletroforéticos (DUNAEVSKY & BELOZERSKY, 1989).

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem uma forma eficaz e economicamente viável para destoxificar a torta de mamona. Além disso, ajudam a compreender a composição proteolítica de extratos de torta de mamona e fornecem algumas propriedades bioquímicas de duas metaloproteases presentes na torta e que aumentam de atividade com o tempo de armazenamento. A atividade dessas enzimas com concomitante degradação protéica sugere uma possível função na senescência do endosperma das sementes de *Ricinus communis*, conduzindo a mobilização das proteínas de reserva e provavelmente clivando a forma inativa de Cys-EP para a forma ativa conforme sugerido por Schmid *et al.* (2001), o que desencadeia a morte celular programada.

6 – Conclusões

- As bandas referentes à molécula de ricina desapareceram das amostras de torta de mamona que foram estocadas por mais de quatro meses nas condições ambientais;
- Metaloproteases estão ativas na torta de mamona e possuem suas atividades aumentadas com o armazenamento da torta;
- O fato de manter a torta de mamona armazenada por um período de seis meses pode se tornar a tecnologia viável e largamente utilizada na destoxificação deste coproduto.

7 – Referências Bibliográficas

- ABIODiesel. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/> > Acesso em: 15/07/09
- ADAM, Z. (1996) Protein stability and degradation in chloroplasts. *Plant Molecular Biology* 32: 773–783.
- ALBUQUERQUE, R.C. (2006) Modificações na composição da torta de mamona em função do armazenamento e do teor de umidade. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande: PB.
- ALEXANDER, J.; BENFORD, D.; COCKBURN, A.; CRAVEDI, J.P.; DOGLIOTTI, E.; DI DOMENICO, A.; FERNANDEZ-CRUZ, M.L.; FÜRST, P.; FINK-GREMMEIS, J.; GALLI, C.L.; GRANDJEAN, P.; GZYL, J.; HEINEMEYER, G.; JOHANSSON, N.; MUTTI, A.; SCHLATTER, J.; LEEUWEN, R. van; PETEGHEM, C. van; VERGER, P. (2008) Ricin (from *Ricinus communis*) as undesirable substances in animal feed. *The European Food Safety Authority Journal* 726: 1-38.
- ANANDAN, S.; ANIL KUMAR, G. K.; GHOSH, J.; RAMACHANDRA, K. S. (2004) Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. *Animal Feed Science and Technology* 120: 159–168.
- AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M. (2007) O agronegócio da mamona no Brasil. 2ª ed. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2007. 504p.
- AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (2001) O agronegócio da mamona no Brasil. 1ª edição. Editora Embrapa, 2001.
- AZEVEDO, D.M.P. de; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M.; SOARES, J.J.; VIEIRA, R. de M.; MOREIRA, J. de A.N. (1997) Recomendações técnicas para o cultivo da mamoneira (*Ricinus communis* L.) no Nordeste do Brasil. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 52p. (EMBRAPA-CNPA. Circular Técnica, 25)
- BANDEIRA, D.S.; CARTAXO, W.V.; SEVERINO, L.S.; BELTRÃO, N.E.M. (2004) Resíduo industrial da mamona como fonte alternativa na alimentação animal. CD-ROM do I Congresso Brasileiro de Mamona. Rio de Janeiro, RJ.
- BARNWAL, B.K.; SHARMA, M.P. (2005) Prospects of biodiesel production from vegetable oils in Índia. *Renewable & sustainable energy reviews* 9: 363-378.
- BEERS, E.P.; WOFFENDEN, B.J.; ZHAO, C. (2000) Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology* 44: 399-415.
- BELOZERSKY, M.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; VOSKOBOYNIKOVA, N.E. (1990) Isolation and properties of a metalloproteinase from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) seeds. *Biochemical Journal* 272: 677–682.
- BELTRÃO, N.E. de M. (2002) Torta de mamona (*Ricinus communis* L.): fertilizante e alimento. Campina Grande: Embrapa Algodão (Comunicado Técnico, 171)
- BELTRÃO, N. E. M. & LIMA, R. L. S. (2007) Aplicação do óleo de mamona como fonte de energia: biodiesel. In: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M. O

agronegócio da mamona no Brasil. 2^o ed. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 504p.

- BIELAWSKI W., DOJCZEW D., KACZKOWSKI J., KOLBUSZEWSKA-PODRES W. (1994) Enzymes of protein breakdown in germinating Triticale grains resistant and susceptible to pre-harvest sprouting. *Acta Physiologiae Plantarum* 16: 19-26.

- BIODIESELBR. Disponível em < <http://www.biodieselbr.com/plantas/mamona/estudos-mamona-biodiesel.htm> >, acesso em 04/03/2009.

- BIODIESELBR 2. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/noticias/bio/governo-confirma-b4-julho-b5-2010-27-02-09.htm>. Acesso em 04/03/09.

- BOM, J.H. (1979) Solubilização das proteínas da mamona por enzimas proteolíticas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, 136p.

- BOND, H.M.; BOWLES, D. (1983) Characterization of soybean endopeptidase activity using exogenous and endogenous substrates. *Plant Physiology* 72: 345–350.

- BRADFORD M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

- BRANDT, N. N.; CHIKISHEV, A. Yu.; SOTNIKOV, A. I.; SAVOCHKINA, Yu. A.; AGAPOV, I. I.; TONEVITSKY, A. G. (2005) Ricin, ricin agglutinin, and the ricin binding subunit structural comparison by Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* 735: 293–298.

- BREIDENBACH, R.W.; BEEVERS, H. (1967) Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 25: 462–469.

- BRZEZINSKI, J. L.; CRAFT, D. L. (2007) Evaluation of an in vitro bioassay for the detection of purified ricin and castor bean in beverages and liquid food matrices. *Journal of Food Protection* 70: 2377-2382.

- CÂNDIDO, M.J.D.; BOMFIM, M.A.D.; SEVERINO, L.S.; OLIVEIRA, S.Z.R. de. (2008) Utilização de coprodutos da mamona na alimentação animal. Anais do III Congresso Brasileiro de Mamona: Energia e ricinoquímica – Salvador, BA.

- CARTAXO, W.V.; BELTRÃO, N.E. de M.; SILVA, O.R.R.F. da; SEVERINO, L.S.; SUASSUNA, N.D.; SOARES, J.J. (2004) Cultivo da mamona no semi-árido brasileiro. Campina Grande: EMBRAPA/CNPA, 20p. (EMBRAPA Algodão. Circular Técnica, 77).

- CARVALHO, L.O. de. (1988) Cultura da mamoneira. Campinas: CATI 73, 3p.

- CHIERICE, G.O.; CLARO NETO. S. (2001) Aplicação Industrial do Óleo. In: AZEVEDO, D.M.P. de; LIMA, E. F. O agronegócio da mamona no Brasil. Brasília: EMBRAPA Serviço de Comunicação Tecnológica, 350p.

- COOK, D. L.; DAVID, J.; GRIFFITHS, G. D. (2006) Retrospective identification of ricin in animal tissues following administration by pulmonary and oral routes. *Toxicology* 223: 61-70.
- DIRECTORATE OF OILSEEDS RESEARCH. (2004) Diversified uses of Castor. In: International Seminar On Castor Seed, Castor Oil and its Value Added Products. Proceedings Ahmedabad: The Solvent Extractors Association of India, p.50-57.
- DUNAEVSKY, Y.E.; BELOZERSKY, M.A. (1989) The role of cysteine proteinase and carboxypeptidase in the breakdown of storage proteins in buckwheat seeds. *Planta* 179: 316–322.
- DUNAEVSKY, Y.E.; BELOZERSKY, M.A. (1993) Effects of the embryonic axis and phytohormones on the proteolysis of storage protein in buckwheat seed. *Physiologia Plantarum* 88: 60–64.
- FELIX, S. P.; MAYERHOFFER, R. O.; DAMATTA, R. A.; VERÍCIMO, M. A.; NASCIMENTO, V. V.; MACHADO, O.L.T. (2008) Mapping IgE-binding epitopes of Ric c 1 and Ric c 3, allergens from *Ricinus communis*, by mast cell degranulation assay. *Peptides* 29: 497–504.
- FERNANDES, K. V. (2008) Análise dos níveis de albuminas 2S e de ricina em sementes de diferentes cultivares e linhagens de mamona (*Ricinus communis* L.) Monografia - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ.
- FERNANDES, K.V.; MACIEL, F.M.; MACHADO, O.L.T. (2008) Análise dos níveis de albuminas 2S e de ricina em sementes de diferentes cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.). Resumo expandido do III Congresso Brasileiro de Mamona: Energia e ricinoquímica, Salvador, BA.
- FINCHER G.B. (1989) Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereals grains. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 305-346.
- FORNAZIERI JÚNIOR, A. (1986) Mamona: uma rica fonte de óleo e de divisas. São Paulo: Ícone, 71p.
- FREIRE, R.M.M. (2001) Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D.M.P. de; LIMA, E.F. O agronegócio da mamona no Brasil. Brasília: Embrapa Serviço de Comunicação Tecnológica, 350p.
- FREITAS, A. L. P.; SILVA, D.C. da ; CHAVES, L.S.; SEVERINO, L.S. (2004) Análise bioquímica e avaliação dos efeitos de tratamentos térmicos sob a torta de processada de mamona. CD-ROM do I Congresso Brasileiro de Mamona. Rio de Janeiro, RJ.
- FRIGERIO, L., ROBERTS, L.M. (1998) The enemy within: ricin and plant cells. *Journal of Experimental Botany* 49: 1473–1480.
- GARDNER JR., H.K.; D'AQUIN, E.L.; KOULTUN, S.P.; McCOURTNEY, E.J.; VIX, H.L.E.; GASTROCK, E.A. (1960) Detoxification and deallergenization of Castor Bean. *The Journal of the American Oil Chemists Society* 37: 142-148.

- GIETL, C.; WIMMER, B.; ADAMEC, J.; KALOUSEK, F. (1997) A Cysteine Endopeptidase Isolated from Castor Bean Endosperm Microbodies Processes the Glyoxysomal Malate Dehydrogenase Precursor Protein. *Plant Physiology* 113: 863-871.
- GODOY, M. G. (2008) Produção de lipase microbiana e detoxificação simultânea de rejeitos agroindustriais. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
- GREENWOOD, J.S.; HELM, M.; GIETL, C. (2005) Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 2238–2243.
- HIENG, B., UGRINOVIC, K., SUSTAR-VOZLIC, J., KIDRIC, M. (2004) Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. *Journal of Plant Physiology* 161: 519–530.
- HUFFAKER, R. C. (1990) Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytology* 116: 199-231.
- JOLLIFFE, N. A.; BROWN, J. C.; NEUMANN, U.; VICRE´, M.; BACHI, A.; HAWES, C.; CERIOTTI, A.; ROBERTS, L. M.; FRIGERIO, L. (2004) Transport of ricin and 2S albumin precursors to the storage vacuoles of *Ricinus communis* endosperm involves the Golgi and VSR-like receptors. *The Plant Journal* 39: 821–833.
- KONNUR, R.; SUBBARAO, E.C. (2004) Biogás form de oiled castor cake. In: International Seminar on Castor Seed, Castor Oil and its Value Added Products. Proceedings Ahmedabad: The Solvent Extractors Association of India, p31-35.
- KNOTHE, G. (2001) Historical perspectives on vegetable oil-based diesel fuels. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 12: 1103-1107.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- LINDAHL, M.; SPETEA, C.; HUNDAL, T.; OPPENHEIM, A.B.; ADAM, Z.; ANDERSSON, B. (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* 12: 419–431.
- LORD, J.M.; ROBERTS, L.M.; ROBERTUS, J.D. (1994) Ricin: structure, mode of action and some current applications. *The FASEB Journal* 8: 201-208.
- MACHADO, R.M. de; BARREIRA, H.A.; FARIA E.V.; MACHADO, D.D. O farelo de mamona desintoxicado na alimentação de novilhas leiteiras. Rio de Janeiro: Instituto de Zootecnia, 1954. 12p. (Publicação 41).
- MACIEL, F. M. (2007) Identificação de proteases cisteínicas envolvidas em processos de sinalização e defesa em *Ricinus communis* L. Dissertação de Mestrado em Biociências e Biotecnologia. Campos do Goytacazes, RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- MENEGHETTIA, S. M. P.; MENEGHETTIA, M. R.; WOLF C, R.; SILVA, E. C.; GILVAN E.S. LIMA, G. E. S.; COIMBRA, M. A.; SOLETTI, J. I.; CARVALHO, S. H. V.

(2006) Ethanolysis of Castor and Cottonseed Oil: A Systematic Study Using Classical Catalysts. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83: 819-822.

- MOSHKIN, V. A. (1986) Castor. New Delhi: Amerind, 315p.

- MUNTZ, K.; BELOZERSKY, M.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. (2001) Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany* 52: 1741 – 1752.

- NA, D. H.; CHO, C. K.; YOUN, Y. S.; CHOI, Y.; LEE, K. R.; YOO, S. D.; LEE, K. C. (2004) Capillary electrophoresis to characterize ricin and its subunits with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Toxicon* 43: 329–335.

- NASS, L. L.; PEREIRA, P. A. A.; ELLIS, D. (2007) Biofuels in Brazil: An Overview. *Crop Science*. 47: 2228-2237.

- NGUYEN C.V., BIELAWSKI W., KACZKOWSKI J. (1995) Distribution of endopeptidases in germinating triticale grains susceptible and resistant to pre-harvest sprouting. *Acta Physiologiae Plantarum* 17: 9-16.

- NIERI, B.; CANINO, S.; VERSACE, R.; ALPI, A. (1998) Purification and characterization of an endoprotease from alfalfa senescent leaves. *Phytochemistry* 49: 643–649.

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

- OKAMOTO, T.; MINAMIKAWA, T.; EDWARD, G.; VAKHARIA, V.; HERMAN, E. (1999) Posttranslational Removal of the Carboxyl-terminal KDEL of the Cysteine Protease SH-EP Occurs Prior to Maturation of the Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 274: 11390 –11398.

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

- OLSNES, S.; KOZLOV, J. (2001) Ricin. *Toxicon* 39: 1723-1728.

- OLSNES, S.; FERNANDEZ-PUENTES, C.; CARRASCO, L.; VAZQUEZ, D. (1975) Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymic activity of the toxin A-chain. *Europe Journal of Biochemistry* 60: 281-288.

- PALMA, J.M.; SANDALIO, L.M.; CORPAS, F.J.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; MCCARTHY, I.; DEL RIO, L.A. (2002) Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 521-530.

- PARENTE, E.J.S. (2004) Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. CD-ROM do I Congresso brasileiro de mamona. Rio de Janeiro, RJ.

- PERRONE, J.C.; IACHAN, A.; DOMONT, G.B.; DISITZER, L.V.; CASTRO, V.R.O.; ROITMAN, R.; GOMES, S.M. (1966) Contribuição ao estudo da torta de mamona. Rio de Janeiro: Departamento de Imprensa Nacional, 51p.
- PRABUCKA, B.; BIELAWSKI, W. (2004) Purification and partial characteristic of a major gliadin degrading cysteine endopeptidase from germinating triticale seeds. *Acta Physiologiae Plantarum* 26: 383-391.
- RIBEIRO FILHO, J. (1966) Cultura da mamoneira. Viçosa: UFV, 75p.
- ROBERTUS, J. (1988) Toxic structure. In: Frankel, A. Immunotoxins. Boston: Kluwer Academic Publishers, p. 11–24.
- RUTENBER, E.; ROBERTUS, J.D. (1991) Structure of ricin B-chain at 2.5 Å resolution. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 10: 260–269.
- SANTOS, R. F.; KOURI, J.; BARROS, M. A. L.; MARQUES, F. M.; FIRMINO, P. T.; REQUIÃO, L. E. G. (2007) Aspectos econômicos do agronegócio da mamona. In: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M. O agronegócio da mamona no Brasil. 2º ed. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 504p.
- SAVY FILHO, A.; BANZATO, N.V.; BARBOZA, M. Z.; MIGUEL, A.M.R.O.; DAVI, L.O. de C.; RIBEIRO, F.M. (1999) Mamona. In: Coordenadoria de assistência técnica integral. Oleaginosas no estado de São Paulo: análise e diagnóstico. Campinas, 1999. 39p. (CATI. Documento Técnico, 107).
- SCHÄGGER, H., VON JAGOW, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166: 368-379.
- SCHALLER, A., RYAN, C. A. (1996) Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a systemic wound response protein. *Plant Molecular Biology* 31: 1073-1077.
- SCHLERETH, A.; BECKER, C.; HORSTMANN, C.; TIEDEMANN, J.; MÜNTZ, K. (2000) Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 51: 1423–1433.
- SCHMID, M., SIMPSON, D.; KALOUSEK, F.; GIETL, C. (1998) A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta* 206: 466–475.
- SCHMID, M.; SIMPSON, D. J.; SARIOGLU, H.; LOTTSPEICH, F.; GIETL, C. (2001) The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 5353–5358.
- SEVERINO, L.S. (2005) O que sabemos sobre a torta de mamona. In: Ministérios da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Campina Grande, documento 134.

- SUTOH K., Kato H., MINAMIKAWA T. (1999) Identification and possible roles of three types of endopeptidase from germinated wheat seeds. *Journal of Biochemistry* 126: 700-707.
- TÁVORA, F.J.A. (1982) *A cultura da mamona*. Fortaleza: EPACE, 119p.
- THAN, M. E.; HELM, M., SIMPSON, D. J.; LOTTSPEICH, F.; HUBER, R.; GIETL, C. (2004) The 2.0 Å Crystal Structure and Substrate Specificity of the KDEL-tailed Cysteine Endopeptidase Functioning in Programmed Cell Death of *Ricinus communis* Endosperm. *Journal of Molecular Biology* 336: 1103–1116.
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. (1997) Imunidade cruzada pelas sementes de *Abrus precatorius* e *Ricinus communis* em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 17: 25-35.
- VIEIRA, R.M.; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S. (1998) Diagnóstico e perspectivas da mamona no Brasil. Anais da Reunião Temática de Matérias-Primas Oleaginosas no Brasil: Diagnóstico, Perspectivas e Prioridades de Pesquisa. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, p.139-150.
- VOIGT, G.; BIEHL, B.; HEINRICHS, H.; VOIGT, J. (1997) Aspartic proteinase levels in seeds of different angiosperms. *Phytochemistry* 44: 389-392.
- WOO, B.H.; LEE, J.T.; LEE, K.C. (1998) Purification of Sepharose-unbinding ricin from Castor Beans (*Ricinus communis*) by hydroxyapatite chromatography. *Protein Expression and Purification* 13: 150-154.
- ZHANG N., JONES B.L. (1995) Development of proteolytic activities during barley malting and their localization in the green malt kernel. *Journal of Cereal Science* 22: 147-155.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)