

## AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DA RICINA INATIVADA PELO CALOR PARA PREVENÇÃO DA INTOXICAÇÃO PELA MAMONA (*Ricinus communis*)

[Evaluation of the ability of ricin inactivated by heat for prevention of castor bean (*Ricinus communis*) poisoning]

Carlos Átila Vitorino Gonçalves<sup>1</sup>, Silvia Catarina Salgado Oloris<sup>2</sup>, Benito Soto-Blanco<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró, RN.

<sup>2</sup>Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN), Mossoró, RN.

**RESUMO** - O presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia da ricina inativada pelo calor para prevenção de intoxicação pela mamona (*Ricinus communis*) em ratos, como forma de minimizar os prejuízos causados por esta toxicose na produção animal. Foi realizado o tratamento térmico da ricina por meio de autoclavagem (121°C por 15 minutos), incubação a 70°C por duas horas e incubação a 90°C por duas horas. A exposição ao calor por meio de autoclavagem e a 90°C por duas horas foram capazes de inativar completamente a ricina. Entretanto, a ricina inativada pelo calor não produziu proteção aos ratos contra a intoxicação pela ricina. Além disto, a adição do adjuvante hidróxido de alumínio à ricina inativada pelo calor também não foi produziu proteção.

**Palavras-Chave:** Mamona, *Ricinus communis*, ricina, vacina, planta tóxica.

**ABSTRACT** - The present work aimed to evaluate the efficiency of ricin inactivated by heat for prevention of poisoning by castor bean (*Ricinus communis*) in rats, as a way to minimize the losses promoted by the toxicosis in animal production. It was performed the thermal treatment of ricin by autoclaving (121°C for 15 minutes), incubation at 70°C for two hours and incubation at 90°C for two hours. The exposure to heat by autoclaving and at 90°C for two hours it were able to completely inactivate ricin. However, ricin inactivated by heat did not produce protection to rats against poisoning by ricin. Furthermore, the addition of the adjuvant aluminum hydroxide to ricin inactivated by heat also did not produce protection.

**Keywords:** Castor bean, *Ricinus communis*, ricin, vaccine, poisonous plant.

### INTRODUÇÃO

A mamona (*Ricinus communis*) é uma planta que vem despertando grande interesse atualmente devido ao seu uso como fonte de óleo utilizado para produção de biodiesel. No entanto, esta planta apresenta uma glicoproteína de elevada toxicidade, a ricina. Esta toxina apresenta duas cadeias, A e B. A cadeia B se liga a proteínas que contêm galactosídeo na superfície celular e a cadeia A é internalizada. Esta última cadeia, no interior das células, se liga à subunidade 28S dos ribossomos das células eucariotes, promovendo drástica inibição da síntese proteica (Garland & Bailey, 2006). A intoxicação pela ricina presente na mamona já foi identificada em grande número de espécies animais, e ocorre não apenas após a ingestão das sementes da planta como também pelo material residual da extração do óleo

desta planta (Soto-Blanco et al., 2002; Garland & Bailey, 2006).

Uma forma de prevenção para a intoxicação pela ricina é por meio da utilização de vacina. Foram desenvolvidas vacinas recombinantes contra a ricina (Smallshaw et al., 2002, 2005, 2007; Marsden et al., 2004; Vitetta et al., 2006). A principal destas vacinas é a denominada RiVax ou Y80A/V67M, para a qual dois aminoácidos da proteína ricina foram alterados, fazendo com que perdesse a toxicidade, mas mantivesse a antigenicidade (Smallshaw et al., 2002, 2005, 2007). No entanto, as vacinas atualmente existentes possuem elevado custo de produção e não estão disponíveis no Brasil, impossibilitando seu uso em animais de produção.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a

\* Autor para correspondência. E-mail: soto-blanco@ufersa.edu.br.

eficácia da ricina inativada pelo calor para prevenção da intoxicação pela mamona em ratos, a fim de estabelecermos modelo experimental de vacina para minimizar os prejuízos causados por esta toxicose na produção animal.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção da solução concentrada de ricina, sementes maduras de mamona (*Ricinus communis*) (Euphorbiaceae), da variedade Nordestina, foram trituradas e maceradas em álcool etanólico absoluto, sendo posteriormente filtrado e evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo para a obtenção do extrato etanólico. Este extrato foi suspenso em água e filtrado, obtendo-se a solução aquosa do extrato etanólico. Em seguida foram utilizados diferentes solventes para fracionar esta solução, removendo-os depois com o uso de evaporador rotativo. Por conseguinte, testaram-se os extratos para identificação de quais frações possuem a ricina, por meio de avaliação da letalidade em ratos.

Para verificação do poder tóxico da solução aquosa das sementes da mamona (*Ricinus communis*), como a secagem de extratos etanólicos levou a inativação da ricina, foi optado pela obtenção da solução aquosa das sementes de *R. communis* para utilização nas atividades experimentais. Foram pesadas 50 g de sementes de *R. communis* e trituradas em água, e a solução foi filtrada, formando uma solução final de 80 ml, tomando o cuidado de fazer a separação do óleo da solução aquosa. O filtrado obtido foi diluído em água destilada, nas concentrações de 1:5, 1:10, 1:25 e 1:50. Foram realizadas as determinações das concentrações de proteínas totais e de albumina da solução aquosa utilizando kits comerciais específicos (KATAL) e um analisador bioquímico automático (CELM SBA-200). A solução aquosa foi injetada por via intraperitoneal em ratos em diferentes doses decrescentes, para que se pudesse calcular uma curva dose-resposta.

Para avaliação do potencial protetor da ricina inativada por meio de autoclavagem, foram trituradas sementes de mamona (*Ricinus communis*) em água destilada, em seguida a solução foi filtrada com o auxílio de filtro de papel, e diluída em água destilada até a obtenção de solução na concentração de 36,6 µg/ml. A solução foi submetida à temperatura de 121°C por 15 minutos, em autoclave. A solução foi administrada a dez ratas fêmeas, por via intraperitoneal, na dose de 3,66 µg (0,1 ml), enquanto outras dez ratas foram tratadas com 0,1 ml de solução salina, pela mesma via. Após 21 e 42

dias, foram aplicados reforços das doses administradas. Após 60 dias da primeira administração, os ratos dos dois grupos foram submetidos a desafio com a ricina ativa (obtida segundo Experimento 2), administrada por via intraperitoneal, na dose de 5µg/kg.

Para avaliação do potencial protetor da ricina inativada por meio de autoclavagem associada ao adjuvante hidróxido de alumínio, a solução de ricina foi obtida e autoclavada da mesma forma que o experimento anterior. Foi preparada uma solução associada a um adjuvante, o hidróxido de alumínio – Al(OH)<sub>3</sub> (Aziram®, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Pouso Alegre-MG). A solução de hidróxido de alumínio foi misturada a solução de ricina, na concentração final de 36,6 µg/ml de ricina e 5,0 mg/ml de hidróxido de alumínio. A solução foi mantida em agitação por 4 horas, para proporcionar uma eficiente adsorção do imunógeno.

A solução de ricina + hidróxido de alumínio foi administrada a dez ratos machos, por via subcutânea, na dose de 3,66 µg (0,1 ml). Outros dez ratos foram tratados com 0,1 ml (3,66 µg) de solução de ricina inativada sem o hidróxido e mais cinco ratos foram tratados com solução de apenas hidróxido de alumínio (5,0 mg/ml), todos pela via subcutânea. Após 15 dias da administração, os ratos dos dois grupos foram submetidos a desafio com a ricina ativa (obtida segundo Experimento 2), administrada por via intraperitoneal, na dose de 5µg/kg.

Para avaliação do potencial protetor da ricina inativada por calor a 70°C, a solução de ricina na concentração de 36,6 µg/ml foi obtida da mesma forma que o Experimento 3. A solução foi submetida à temperatura de 70°C por duas horas, em estufa com fluxo forçado de ar. A solução foi administrada a dez ratos machos, por via intraperitoneal, na dose de 3,66 µg (0,1 ml), enquanto outros dez ratos foram tratados com 0,1 ml de solução salina, pela mesma via.

Para avaliação do potencial protetor da ricina inativada por calor a 90°C, a solução de ricina na concentração de 36,6 µg/ml foi obtida da mesma forma que o Experimento 3. A solução foi submetida à temperatura de 90°C por duas horas, em banho. A solução foi administrada a sete ratos machos, por via intraperitoneal, na dose de 3,66 µg (0,1 ml). Um segundo grupo de sete ratos foi tratado com 0,1 ml de solução de ricina associada a hidróxido de alumínio, preparada da mesma forma que no experimento 4. O grupo controle (5 ratos) foi tratado apenas com a solução de hidróxido de alumínio (0,1 ml). Após 15 dias da administração, os ratos dos

dois grupos foram submetidos a desafio com a ricina ativa (obtida segundo Experimento 2), administrada por via intraperitoneal, na dose de 5µg/kg.

Os dados foram avaliados estatisticamente com o auxílio do programa SAS for Windows v.8.0, utilizando o teste *t* de Student. O nível de significância estabelecido foi  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores obtidos para a solução de 80 ml de água a partir de 50 g de sementes foram de 13 mg/ml de proteínas totais e 1,83 mg/ml de albumina. Como a ricina é uma toxoalbumina, a concentração desta toxina deve ser bastante próxima ao obtido pela determinação de albumina, especialmente porque as sementes de *R. communis* não apresentam albumina. Por apresentar concentração considerada elevada de ricina, foram realizadas diluições da solução aquosa com água destilada, nas proporções de 1:5, 1:10, 1:25 e 1:50. Procurando utilizar o menor número possível de ratos, de acordo com as recomendações de bioética, foram administradas dosagens decrescentes da solução de ricina, procurando estabelecer uma curva dose-resposta. A maior dose testada foi de 146 µg/kg e a menor dose foi de 1,7 µg/kg. Todas as doses administradas promoveram letalidade, sendo que a partir da dose de 21 µg/kg alguns ratos sobreviveram. Pelos dados aqui obtidos, ela deve estar ao redor de 2 µg/kg, o que está de acordo com dados da literatura (Soto-Blanco et al., 2002; Garland & Bailey, 2006).

Foram realizados diversos experimentos-piloto para a inativação da ricina, sendo a melhor forma obtida pela autoclavagem da solução 121°C por 15 minutos. Foi realizado este procedimento com a solução na concentração de 36,6 µg/ml. A solução autoclavada foi administrada a 10 ratas com peso médio de 164 g, na dose de 3,66 µg/ml. Nenhuma rata apresentou qualquer manifestação de toxicidade promovida pela ricina. Ao serem submetidos a desafio com ricina, sete animais de cada grupo vieram a óbito, mostrando assim que a solução autoclavada não foi capaz de resultar em proteção.

Em seguida inativou-se a ricina através de exposição a temperatura em estufa de ar forçado, à temperatura de 70°C por 2 horas. Foram administrados a dez ratos machos por via intraperitoneal na dose de 3,66 µg/ml (0,1 ml), enquanto outros dez ratos foram tratados com 0,1 ml de solução salina, pela mesma via. Dos dez ratos submetidos 7 morreram algumas horas após a administração da solução tratada pelo calor, o que pode ser atribuído a ação tóxica da

ricina que não foi eficientemente inativada por este método.

Em outro teste realizado, procedeu-se a inativação da ricina através de banho-maria, na temperatura de 90°C por 2 horas. De sete ratas tratadas com esta solução, apenas uma morreu no mesmo dia da administração. Com o desafio com a ricina, cinco das seis ratas morreram. Desta forma, este tratamento foi capaz de inativar a toxina, mas sem induzir proteção aos ratos.

Foi associado à solução submetida a autoclavagem e a inativada a 90°C a um adjuvante, hidróxido de alumínio, para que assim estas pudessem ter uma maior capacidade de estimular o sistema imune. O hidróxido de alumínio se liga a proteínas de forma não covalente e induz um discreto processo inflamatório, o que facilita e amplia a exposição do antígeno (Abbas et al., 2000; Janeway Jr et al., 2005). Apesar da adição do adjuvante, o sistema imune dos animais não foi estimulado satisfatoriamente por nenhuma das duas associações.

As perdas produzidas pelas plantas tóxicas podem ser atenuadas pelo desenvolvimento de vacinas que induzam a produção de anticorpos pelos animais e que sejam capazes de neutralizar a toxicidade de princípios ativos de plantas. Já foram desenvolvidas vacinas em outros países para evitar os efeitos tóxicos de diversas plantas, tais como *Lantana camara* (Stewart et al., 1988) *Lupinus* spp infectado pelo fungo *Diaporthe toxica* (Than et al., 1994), *Lolium rigidum* ("annual ryegrass") infectado pela bactéria *Clavibacter toxicum* (Than et al., 1998), *Festuca arundinacea* Schreb ("tall fescue") infectada pelo fungo endofítico *Neotyphodium coenophialum* (Filipov et al., 1998) e *Delphinium* spp ("larkspurs") (Lee et al., 2003).

Desta forma pudemos observar que através da administração da ricina inativada por estes métodos de inativação através do calor, não se pode obter imunidade satisfatória, contrapondo-se aos estudos de Tokarnia e Döbereiner (1997), que disse que apesar da alta toxidez, é possível desenvolver imunidade contra a ricina, como comprovado nos estudos 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.

Concluindo, a exposição ao calor por meio de autoclavagem ou a 90°C por duas horas foi capaz de

inativar a ricina, mas a ricina inativada pelo calor não foi capaz de induzir proteção aos ratos por meio de anticorpos neutralizantes contra a ricina. Além disto, a adição do adjuvante hidróxido de alumínio à ricina inativada pelo calor também não foi capaz de produzir proteção.

Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1997. Imunidade cruzada pelas sementes de *Abrus precatoribus* e *Ricinus communis* em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 17:25-35.

Vitetta E.S., Smallshaw J.E., Coleman E., Jafri H., Foster C., Munford R. & Schindler J. 2006. A pilot clinical trial of a recombinant ricin vaccine in normal humans. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103:2268-2273.

## REFERÊNCIAS

Abbas A.K., Lichtman A.H. & Pober J.S. 2000. Cellular and Molecular Immunology, 4ed. W.B. Saunders, Philadelphia. p.361-362.

Filipov N.M., Thompson F.N., Hill N.S., Dawe D.L., Stuedemann J.A., Price J.C. & Smith C.K. 1998. Vaccination against ergot alkaloids and the effect of endophyte-infected fescue seedbased diets on rabbits. *J. An. Sci.* 76:2456-2463.

Garland T. & Bailey E.M. 2006. Toxins of concern to animals and people. *Rev. Sci. Tech. O.I.E.* 25:341-351.

Lee S.T., Stegelmeier B.L., Panter K.E., Pfister J.A., Gardner D.R., Schoch T.K. & James L.F. 2003. Evaluation of vaccination against methyllycaconitine toxicity in mice. *J. An. Sci.* 81:232-238.

Janeway Jr C.A., Travers P., Walport M. & Shlomchik M.J. 2005. Immunobiology: the immune system in health and disease, 6. ed. Garland Science, New York. p.647-648, 686-687.

Marsden C.J., Knight S., Smith D.C., Day P.J., Roberts L.M., Phillips G.J. & Lord J.M. 2004. Insertional mutagenesis of ricin A chain: a novel route to an anti-ricin vaccine. *Vaccine* 22:2800-2805.

Smallshaw J.E., Firan A., Fulmer J.R., Ruback S.L., Ghetie V. & Vitetta E.S. 2002. A novel recombinant vaccine which protects mice against ricin intoxication. *Vaccine* 20:3422-3427.

Smallshaw J.E., Richardson J.A., Pincus S.H., Schindler J. & Vitetta E.S. 2005. Preclinical toxicity and efficacy testing of RiVax, a recombinant protein vaccine against ricin. *Vaccine* 23:4775-4784.

Smallshaw J.E., Richardson J.A. & Vitetta E.S. 2007. RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, protects mice against ricin delivered by gavage or aerosol. *Vaccine* 25:7459-7469.

Soto-Blanco B., Sinhorini I.L., Górnica S.L. & Schumacher-Henrique B. 2002. *Ricinus communis* cake poisoning in a dog. *Vet. Human Toxicol.* 44:155-156.

Stewart C., Lamberton J.A., Fairclough R.J. & Pass M.A. 1988. Vaccination as possible means of preventing lantana poisoning. *Aust. Vet. J.* 65:349-352.

Than K.A., Anderton N., Cockrum P.A., Payne A.L., Stewart P.L. & Edgar J.A. 1994. Lupinosis vaccine: Positive relationship between anti-phomopsin IgG concentration and protection in Victorian field trials. In: Colgate S.M. & Dorling P.R. (eds.). Plant-Associated Toxins: Agricultural, Phytochemical and Ecological Aspects. CAB Int., Wallingford. p.433.

Than K.A., Cao Y., Michalewicz A. & Edgar J.A. 1998. Development of a vaccine against annual ryegrass toxicity. In: Garland T. & Barr A.C. (eds.). Toxic Plants and Other Natural Toxicants. CAB Int., Wallingford. p.165-168.