

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**GEORGE AUGUSTO VELOSO DE OLIVEIRA**

**PURIFICAÇÃO DE RICINA, CARACTERIZAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE  
ATIVIDADE, E NOVOS CANDIDATOS A INIBIDORES**

Alfenas/MG  
2020

**GEORGE AUGUSTO VELOSO DE OLIVEIRA**

**PURIFICAÇÃO DE RICINA, CARACTERIZAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE  
ATIVIDADE, E NOVOS CANDIDATOS A INIBIDORES**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico Química.

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva.

Alfenas/MG  
2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) Sistema de  
Bibliotecas da Universidade Federal de Alfnas

Oliveira, George Augusto Veloso de.

O48p Purificação de ricina, caracterização amperométrica de atividade, e novos  
candidatos a inibidores / George Augusto Veloso de Oliveira -- Alfnas/MG,  
2020.

132 f. : il. --

Orientador: José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfnas, 2020.  
Bibliografia.

1.Ricina. 2. Cinética. 3. Inibidor. 4. Interação. 5. Voltametria. I. Silva,  
José Maurício Schneedorf Ferreira da. II. Título.

CDD-541

Ficha Catalográfica elaborada por Fátima dos Reis Goiatá  
Bibliotecária-Documentalista CRB/6-425

**GEORGE AUGUSTO VELOSO DE OLIVEIRA**

**TÍTULO: PURIFICAÇÃO DE RICINA, CARACTERIZAÇÃO AMPEROMÉTRICA  
DE ATIVIDADE, E NOVOS CANDIDATOS A INIBIDORES**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química.

Aprovado em: 10 de dezembro de 2020

Prof. Dr. José Maurício Schneedorf  
Ferreira da Silva Instituição:  
Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Fábio Luiz Pissetti  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Marina Quadrio Raposo Branco Rodrigues  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Elivelton Alves Ferreira  
Instituição: Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. André Luiz dos Santos  
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia



---

Documento assinado eletronicamente por **José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva, Presidente**, em 11/12/2020, às 18:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Fábio Luiz Pissetti, Professor do Magistério Superior**, em 14/12/2020, às 10:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Marina Quadrio Raposo Branco Rodrigues, Professor do Magistério Superior**, em 14/12/2020, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luiz dos Santos, Usuário Externo**, em 14/12/2020, às 23:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Elivelton Alves Ferreira, Usuário Externo**, em 15/12/2020, às 07:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_externo=0), informando o código verificador **0434131** e o código CRC **9FB5C256**.

---

Dedico este trabalho à Deus, e à minha querida avó Maria da Conceição Veloso de Lima, (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus pela saúde, pelas oportunidades oferecidas, por me dar força para superar as dificuldades e por colocar pessoas em meu caminho que diretamente ou indiretamente contribuíram para o meu sucesso.

Agradeço ao Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva pela orientação e dedicação dispensada nesta jornada, por toda disponibilidade de tempo e por todos os ensinamentos compartilhados. Hoje sei que ele é mais que orientador e sim um Pai acadêmico, sua orientação e amizade foram essenciais para minha formação enquanto discente na pós-graduação e pesquisador.

Estendo meus agradecimentos à Universidade Federal de Alfenas, que por meio do Programa de Apoio e Qualificação dos Servidores Técnico-administrativo em Educação (PROQUALITAE), permitiram o desenvolvimento das minhas atividades de pós-graduação.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica: Rose, Kris, Gabriel e demais pessoas que convivi neste espaço e foram compreensivos em minhas limitações durante esses anos. Agradeço aos professores do Departamento de Bioquímica, que sempre estiveram me apoiando nos quase seis anos entre mestrado e doutorado.

Agradeço aos pesquisadores da rede de pesquisa denominada BaBel, em especial ao Prof. Dr. Luiz Cezar Rodrigues, coordenador do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – UFPB, por ter cedido os candidatos à inibidores sintetizados em seu laboratório e testados neste trabalho.

Agradeço aos meus tios Edmilson, Nilton e Moisés e às minhas tias Beth, Dora e Arlete por todo o amparo, auxílio e ensinamentos em vários momentos da minha vida.

Agradeço à minha querida mãe Beatriz, pela confiança e amor incondicional.

À minha irmã Vanele Patrícia, meu amigo e cunhado Ronaldo, minha sobrinha Drielly e meu sobrinho afilhado Ronaldy Gustavo, por sempre acreditarem em mim.

À minha esposa Marinalva, agradeço mais uma vez pela compreensão, pelo amor, pelo apoio, pela parceria, paciência e pela amizade, enfim, por tudo que você representa para a minha vida.

À minha filha Larissa por ser o maior presente que Deus e a vida poderia me dar.

Agradeço, por fim, ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal de Alfenas. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigado!

## RESUMO

A mamoneira (*Ricinus communis L.*) é uma oleaginosa de alto valor econômico com mercado global de óleo de mamona crescente a uma taxa anual de cerca de 4,3%, com expectativa de um mercado global avaliado em US\$ 1470 milhões para 2025. A presença da ricina, uma fitotoxina heterodimérica encontrada no endosperma das sementes de mamona, exige cautela no uso, devido a extrema toxicidade desta fração proteica. Em paralelo aos riscos da manipulação da mamona na indústria de biocombustível e polímeros, a ricina é classificada por autoridades internacionais como potencial agente para uso no bioterrorismo, uma vez que não há antídoto farmacológico de sua ação letal aprovado por agências governamentais. Neste trabalho, relatou-se um novo ensaio para a detecção de ricina e sua atividade enzimática centrada na depurinação do DNA de esperma de arenque (hsDNA, *herring sperm DNA*), por eletro-oxidação do analito em superfície eletródica não modificada. Em paralelo, buscou-se também avaliar parâmetros de interação e potencial inibitório de novos candidatos para inibição da toxina, respectivamente por espectrofluorimetria e pelo procedimento eletroquímico definido. Os ensaios baseados em voltametria de onda quadrada sugerem que a liberação de adenina catalisada por ricina exibiu um comportamento bifásico, com um estado pré-estacionário precedendo o comportamento de Michaelis-Menten, e com constantes cinéticas de  $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$  para  $K_m$  e valor  $K_{cat}$  de  $19 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ . Os estudos demonstraram que o novo método para a detecção de ricina é relativamente simples, emprega eletrodos de pasta de carbono não modificada, e pode ser adaptado a várias fontes de amostras suspeitas e dispositivo de detecção. Os ligantes selecionados como alvos possíveis para ricina apresentaram valores significativos para as constantes de formação dos complexos Kb ( $22,6 \pm 3,3$  a  $111,3 \pm 7,4 \times 10^4 \text{L.mol}^{-1}$ ). Os parâmetros termodinâmicos obtidos com variação de pH e de temperatura sugerem que a formação dos complexos foi entropicamente dirigida, com mecanismo de interação relacionado predominantemente ao efeito hidrofóbico. As moléculas apresentaram valores de inibição melhores comparados aos inibidores obtidos comercialmente e podem representar uma alternativa promissora na inibição da atividade catalítica da ricina.

**Palavras-chave:** Ricina. Cinética. Inibidor. Interação. Voltametria.

## ABSTRACT

Castor bean (*Ricinus communis L.*) is an oilseed of high economic value with a growing global market for castor oil at an annual rate of about 4.3%, with the expectation of a global market estimated at US \$1470 million for 2025. The presence of ricin, a heterodimeric phytotoxin found in the endosperm of castor seeds, requires caution in its use, due to the extreme toxicity of this protein fraction. In parallel to the risks of handling castor in the biofuel and polymers industry, ricin is classified by international authorities as a potential agent for use in bioterrorism, since there is no pharmacological antidote for its lethal action approved by government agencies. In this work, a new assay for detecting ricin and its enzymatic activity centered on the purification of herring sperm DNA (hsDNA, herring sperm DNA) was reported by electro-oxidation of the analyte on an unmodified electrode surface. In parallel, we also sought to evaluate parameters of interaction and inhibitory potential of new candidates for toxin inhibition, respectively by spectrofluorimetry and by the defined electrochemical procedure. The results showed that the isolation of ricin from modification reported in the literature showed a satisfactory purity for the protein and high cytotoxicity. Tests based on square wave voltammetry suggest that the release of adenine catalyzed by ricin exhibited a biphasic behavior, with a pre-stationary state preceding the Michaelis-Menten behavior, and with kinetic constants of  $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$  for  $K_m$  and value  $19 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$   $K_{cat}$ . Studies have shown that the new method for detecting ricin is relatively simple, employs unmodified carbon paste electrodes, and can be adapted to various sources of suspect samples and detection devices. The ligands selected as possible targets for ricin showed significant values for the formation constants of the  $K_b$  complexes ( $22.6 \pm 3.3$  to  $111.3 \pm 7.4 \times 10^4 \text{L.mol}^{-1}$ ). The thermodynamic parameters obtained with variation in pH and temperature suggest that the formation of the complexes was entropically directed, with an interaction mechanism predominantly related to the hydrophobic effect. The molecules showed better inhibition values compared to commercially obtained inhibitors and may represent a promising alternative in inhibiting the catalytic activity of ricin.

Key words: Ricin. Kinetics. Inhibitor. Interaction. Voltammetry

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação em cartoon da ricina incluindo as subunidades RTA e RTB conectadas pela ligação de dissulfeto (ID PDB: 3RTI).....	22
Figura 2 -	Mecanismo de ação catalítica proposto para a RTA.....	22
Figura 3 -	Estrutura de RTA complexada com análogo de substrato 5-monofosfato de formicina - FMP (ID PDB: 1FMP). ....	23
Figura 4 -	Bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), citosina (C) ou timina (T).....	30
Figura 5 -	Estrutura do ácido pterico. ....	32
Figura 6 -	Estrutura polifenol epigallocatequina-galato (eGCG).....	32
Figura 7 -	Exemplo de potencial de varredura e voltamograma cíclico. ....	39
Figura 8 -	Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada. ....	41
Figura 9 -	Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada para um processo redox de um sistema reversível. ....	42
Figura 10 -	Estruturas moléculas 1, 2, 3, 4, 6, 7 8 e retro-2 (5R). ....	46
Figura 11 -	Fluxograma resumido do procedimento de extração e purificação da ricina.....	49
Figura 12 -	Purificação e caracterização da ricina, SDS-PAGE (12%) de ricina purificada sob condições reduzidas. ....	60
Figura 13 -	Perfil espectrofotométrico das frações de ricina obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex G-200.....	60
Figura 14 -	Método de Bradford com curva-padrão em albumina sérica bovina (BSA).....	61
Figura 15 -	Curva dose-resposta e valor de IC50 do tratamento das células HEP2 incubadas por 48 horas, e com diferentes concentrações de ricina purificada. ....	64
Figura 16 -	VC de 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de adenina a taxas de varredura de 10-500 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ em EPC pH 4,6. ....	66
Figura 17 -	Variação do potencial de pico ( $E_p$ ) em função da velocidade de varredura de potencial para a adenina 25,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . ....	67

Figura 18 - Variação do logaritmo da corrente de pico de oxidação ( $\log I_p$ ) versus o logaritmo da velocidade de varredura de potencial ( $\log v$ ) para a adenina $25,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ .....	68
Figura 19 - Influência da variação da frequência da onda quadrada para adenina $25,0 \mu\text{mmol.L}^{-1}$ .....	70
Figura 20 - Influência da variação de amplitude da onda quadrada para a $25,0 \mu\text{mmol.L}^{-1}$ .....	71
Figura 21 - Efeito da variação do incremento de varredura sobre as correntes e potenciais de pico para a adenina $25,0 \mu\text{mmol.L}^{-1}$ .....	72
Figura 22 - VOQ de oxidação de adenina $25,0 \mu\text{mmol.L}^{-1}$ a diferentes valores de pH.....	73
Figura 23 - Mecanismo de eletro-oxidação da adenina na faixa de pH de 4,2 a 6,6 .....	74
Figura 24 - Resposta da VOQ para $0,08 \mu\text{mol.L}^{-1}$ hsDNA hidrolisado, $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Ad e $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Gu .....	75
Figura 25 - VOQ para concentrações variáveis de Ad na faixa de 0-160 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em hsDNA ( $0,17 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ).....	76
Figura 26 - Cinética da liberação de adenina a partir de $0,50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de hsDNA catalisada por ricina a $0,87 \text{ pmol}$ .....	78
Figura 27 - Curva progressiva de liberação de adenina a partir de hsDNA ( $0,08 - 0,50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) catalisada por ricina a $0,87$ .....	79
Figura 28 - Comportamento semelhante ao "burst" verificado em outros trabalhos .....	80
Figura 29 - Constantes de taxa observadas ( $k_{obs}$ ) em função da concentração de hsDNA.....	81
Figura 30 - Curva analítica obtida pela análise de adenina no intervalo de $0,1 - 18 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .....	83
Figura 31 - Cromatograma de eluição por HPLC .....	84
Figura 32 - Liberação de adenina a partir de $0,15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de hsDNA catalisada por ricina a $0,87 \text{ pmol}$ .....	85
Figura 33 - Valores de $IC_{50}$ para inibidores de ricina.....	89
Figura 34 - Avaliação da atividade enzimática da ricina [ $0,87 \text{ pmol}$ ] em $0,18 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de hsDNA na ausência e presença dos candidatos a inibidores.....	90

Figura 35 - Ajuste linear de Lineweaver-Burk para a cinética de ricina em hsDNA na ausência (controle sem ligantes) e presença dos ligantes 1, 4, 5R e 7.....	91
Figura 36 - VOQ de atividade de ricina medida em potenciostato portátil.....	95
Figura 37 - Emissão de fluorescência da ricina em pH 4,6 (T=298K e $\lambda_{ex}$ =280 nm).....	96
Figura 38 - Emissão de fluorescência da ricina na ausência e presença do ácido pteróico e da Retro-2 (5R).....	97
Figura 39 - Emissão de fluorescência da ricina na ausência e presença das Moléculas 1 e 2.....	98
Figura 40 - Emissão de fluorescência da ricina na ausência e presença das Moléculas 3 e 4.....	98
Figura 41 - Emissão de fluorescência da ricina na ausência e presença das Moléculas 6 e 7.....	99
Figura 42 - Emissão de fluorescência da ricina na ausência e presença da Molécula 8.....	99
Figura 43 - Gráfico de Stern-Volmer da interação da ricina com possíveis candidatos à inibidores. T = 298K em pH 4,6.....	100
Figura 44 - Relação da constante de interação do complexo com o descritor de solubilidade dos ligantes.....	103
Figura 45 - Espectros de fluorescência síncrona de Ricina por adição de ligantes 1, 4, 5(R) e 7.....	106
Figura 46 - Dependência da constante de formação do complexo (Kb) com a temperatura. Moléculas: 1, 4, 7, 5(R).....	108
Figura 47 - Relação da constante de interação do complexo com o descritor de número de acceptor de ligação de hidrogênio.....	109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de proteína ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) referente aos picos cromatográficos .....	62
Tabela 2 - Etapas de purificação da ricina .....	63
Tabela 3 - Ensaio de toxicidade em <i>Artemia salinas</i> .....	65
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos para a hidrólise do hsDNA catalisado pela ricina...82	
Tabela 5 - Parâmetros cinéticos comparativos obtidos por hidrólise de hsDNA catalisada por ricina, tal como obtidos por HPLC e VOQ. ....	85
Tabela 6 - Comparativo entre métodos de detecção de ricina biologicamente ativa.86	
Tabela 7 - Atividade ricina em diferentes matrizes alimentares. ....	87
Tabela 8 - Atividade de inibição dos controles positivos, moléculas de ácido pteróico e retro-2. ....	88
Tabela 9 - Parâmetros do estado estacionário para curvas progressivas de ricina em hsDNA na ausência e presença dos ligantes. ....	92
Tabela 10 - Valores da constante de supressão de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) para as moléculas 1, 2, 3, 4, 5 (R), 6 e 7 em pH 4,6 e pH 7,0.....	101
Tabela 11 - Valores da Energia de Gibbs ( $\Delta G$ ) das Moléculas 1, 2, 3, 4, 5(R), 6 e 7 a 298 K em pH 4,6 e pH 7,0. ....	102
Tabela 12 - Representação de fluoróforos acessíveis ao ligante ( $f_a$ ) e coeficiente de determinação em pH 4,6. ....	104
Tabela 13 - Constante de ligação e parâmetros termodinâmicos da interação de ricina e moléculas 1, 4, 7 e 5 (R).....	107
Tabela 14 - Parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H$ , $\Delta S$ e $T\Delta S$ ) da interação da ricina com as Moléculas 1, 4, 5 (R) e 7.....	108

## LISTA DE SIGLAS

a	amplitude da onda quadrada
Ad	adenina
Arg	arginina
Cys	cisteína
DNA	ácido desoxirribonucleico
Ep	potencial de pico
EPC	eletrodo de pasta de carbono
F	fluorescência na presença de ligante
f	frequência da onda quadrada
F <sub>0</sub>	fluorescência na ausência Ligante
Glu	glutamato
Gu	glutamina
HPLC	do ingles High Performance Liquid Chromatography
hsDNA	DNA de esperma de Arenque
K <sub>b</sub>	constante de interação ligante-proteína
kDa	quilodaltons
K <sub>sv</sub>	constante de supressão de Stern-Volmer
LQ	Limite de Quantificação
RTA	cadeia A da ricina
RTB	cadeia B da ricina
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
UV	ultravioleta
VC	voltametria Cíclica
VIS	visível
VOQ	voltametria de Onda Quadrada
ΔEs	incremento de varredura
ΔG	energia de Gibbs
ΔH	variação de entalpia
ΔS	variação de entropia
λ <sub>max</sub>	onda máxima de emissão

$\lambda_{ex}$  comprimento de onda de excitação  
 $\tau_0$  tempo de vida do fluoróforo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>21</b>
2.1	RICINA	21
2.2	DETECÇÃO DE RICINA	24
2.2.1	Métodos que detectam ricina de modo independente da atividade	24
2.2.2	Métodos que podem identificar a ricina biologicamente ativa	26
2.2.3	Determinação de Adenina por Técnicas Eletroquímicas	29
2.3	INIBIDORES DE RICINA	31
2.4	CINÉTICA ENZIMÁTICA	33
2.4.1	Diagnóstico de inibição enzimática	34
2.5	INTERAÇÃO DE LIGANTES COM PROTEÍNAS	35
2.5.1	Interação ricina-inibidor por espectrofluorimetria	36
2.6	TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS	37
2.6.1	Voltametria Cíclica	38
2.6.2	Voltametria de Onda Quadrada	40
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>45</b>
5.1	MATERIAIS	45
5.1.1	Seleção dos ligantes	45
5.1.2	Protocolo de Segurança	47
5.2	ANÁLISE DE DADOS	47
5.3	OBTENÇÃO DE RICINA	47
5.3.1	Cromatografia	48
5.3.2	Teste de pureza (Eletroforese)	48
5.3.3	Determinação de proteína (Bradford)	49
5.3.4	Análise da atividade enzimática específica	50
5.3.5	Cálculo do fator de purificação e rendimento (recuperação)	50
5.3.6	Teste de citotoxicidade celular	50
5.3.7	Teste de viabilidade em microcrustáceo	51

5.4	ENSAIOS DE ATIVIDADE DA RICINA LIVRE E COMPLEXADA A INIBIDORES.....	52
5.4.1	Análises Voltamétricas .....	52
5.4.2	Cinética enzimática.....	55
5.4.3	Atividade de Ricina em Matrizes Alimentares.....	55
5.4.4	Determinação de adenina liberada por potenciostato portátil.....	56
5.4.5	Determinação de adenina liberada por HPLC .....	56
5.4.6	Determinação da porcentagem de inibição enzimática .....	57
5.4.7	Determinação dos valores de IC <sub>50</sub> dos compostos .....	57
5.5	INTERAÇÃO DE RICINA COM INIBIDORES.....	58
5.5.1	Ensaio de fluorescência síncrona .....	59
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
6.1	ISOLAMENTO DE RICINA .....	59
6.1.1	Etapas de purificação da amostra .....	62
6.1.2	Citotoxicidade celular.....	63
6.1.3	Citotoxicidade em <i>Artemia salinas</i> .....	64
6.2	CATÁLISE ENZIMÁTICA DE RICINA.....	65
6.2.1	Voltametria Cíclica da Adenina.....	65
6.2.2	Voltametria de onda quadrada (VOQ). .....	69
6.2.3	Influência da frequência (f) .....	69
6.2.4	Influência da amplitude (a) .....	70
6.2.5	Efeito do incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ).....	72
6.2.6	Efeito do pH na eletro-oxidação da adenina.....	73
6.2.7	Eletro-oxidação de hsDNA por VOQ .....	75
6.2.8	Curva analítica.....	76
6.2.9	Depuração de hsDNA com ricina por VOQ.....	77
6.2.10	Método comparativo - depuração de hsDNA com ricina por HPLC .....	82
6.2.11	Atividade de Ricina em Matrizes Alimentares.....	87
6.2.12	IC <sub>50</sub> dos candidatos a inibidores de ricina.....	88
6.2.13	Ensaio para diagnóstico de inibição da catálise da ricina .....	89
6.2.14	Ensaio eletroquímico com dispositivo portátil .....	93
<b>6.3</b>	<b>INTERAÇÃO DE RICINA COM INIBIDORES.....</b>	<b>96</b>
6.3.1	Espectrofluorogramas de ricina e dos ligantes .....	97

6.3.2	Determinação de $K_b$ (constante de Stern-Volmer) e variação de energia de Gibbs ( $\Delta G$ ).....	100
6.3.3	Determinação da população de fluoróforos acessíveis .....	103
6.3.4	Eficiência de supressão na transferência de energia .....	105
6.3.5	Fluorescência síncrona.....	105
6.3.6	Efeito da temperatura e parâmetros termodinâmicos da interação .....	107
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>112</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>113</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis L.*) é uma oleaginosa de alto valor econômico pelo fato de apresentar um mercado crescente e bem definido para o óleo extraído de suas sementes devido à sua aplicação versátil, baixo custo, disponibilidade e biodegradabilidade (MUBOFU, 2016; POLITO *et al.*, 2019). O mercado global de óleo de mamona deve crescer a uma taxa composta anual de cerca de 4,3%, com expectativa de um mercado global avaliado em US\$ 1470 milhões para 2025 (KAUR; BHASKAR, 2020).

O resíduo da extração do óleo das sementes da mamoneira (também conhecido como torta de mamona) possui alto teor de proteínas, tornando-a atraente para alimentação animal; porém, a presença da ricina, uma fitotoxina proteica heterodimérica encontrada no endosperma das sementes de mamona, exige cautela no uso, devido a extrema toxicidade desta fração proteica (GOMES *et al.*, 2017).

Além disso, a ricina tem ganhado atenção recente de governos e da comunidade científica internacional devido a possibilidade do seu emprego no envenenamento, com dose letal LD<sub>50</sub> de apenas 5 µg/kg em camundongos (inalação), manifestações até 4 h após inalação, e irreversibilidade do quadro letal entre 6 a 12 horas (MOSHIRI; HAMID; ETEMAD, 2016; VANCE; MANTIS, 2017). A ricina é considerada uma das mais potentes toxinas de origem vegetal, com ação inativadora de ribossomos, sendo classificada ao lado da toxina botulínica, como agente biológico de classe de risco III pela Comissão de Biossegurança em Saúde/MS e Categoria B como agente de bioterrorismo pelo CDC de Atlanta (Center for Disease Control and Prevention, GA, E.U.A) (POMPEU, 2014; SINHA; SINGH, 2016). Nesse contexto, a toxina desperta interesse de organizações terroristas, frente ao baixo custo para cultivo da planta, fácil extração da proteína e boa estabilidade da ricina (DOAN, 2004). Assim, é essencial a detecção precoce da toxina ativa para o desenvolvimento de contramedidas apropriadas (BOZZA *et al.*, 2015), justificando os esforços dos pesquisadores para obter testes de detecção de ricina mais rápidos e mais sensíveis (POLITO *et al.*, 2019).

Contra-medidas para a contenção de ricina incluem investimentos significativos no desenvolvimento de vacinas, inibidores do tráfego celular da proteína, bem como a síntese racional de inibidores competitivos de suas cadeias (SAITO *et al.*, 2008).

Algumas estratégias para a prevenção de intoxicação com a ricina envolvem o desenvolvimento de tratamentos de imunização profilática (vacinas) (SMALLSHAW; RICHARDSON; VITETTA, 2007), ensaios com moléculas inibidoras da atividade catalítica da ricina (STECHMANN *et al.*, 2010), e/ou bloqueio da captação da ricina durante o tráfego intracelular (DYER *et al.*, 2016). Contudo, ainda não existe um tratamento comprovado e seguro para a intoxicação por ricina. Nesse sentido, o estudo de potenciais inibidores/ligantes para a ricina seguido de testes experimentais, pode contribuir para o desenvolvimento de um antídoto contra os efeitos tóxicos da ricina e/ou auxiliar na busca de solução para os problemas advindos da produção, transporte e armazenamento dos subprodutos da mamona.

Assim o presente trabalho foi composto por três etapas relacionadas ao desenvolvimento de um ensaio eletroquímico para detecção de ricina e avaliação do potencial inibitório de novos candidatos a ligantes.

Na primeira etapa, devido à indisponibilidade para compra de ricina por restrições de produção, transporte e uso, trabalhamos com metodologias para obtenção de ricina purificada a partir de sementes de mamona.

Na segunda etapa buscamos um novo ensaio para análise da cinética enzimática da ricina centrada na determinação de adenina liberada a partir de ácido desoxirribonucleico de esperma de arenque (hsDNA), por eletro-oxidação do analito em superfície eletródica. Em rápida comparação com técnicas existentes para medidas da atividade biológica da ricina, técnicas eletroquímicas apresentam vantagens frente a metodologias correntes, por não requerer emissão radioativa para análise (LING; LIU; WANG, 1994), não necessitar de modificação do analito para detecção colorimétrica (HEISLER *et al.*, 2002), não requer derivatização de amostras como em processos cromatográficos ou combinação de técnicas para pré-purificação de amostra antes da detecção (HINES; BRUEGGEMANN; HALE, 2004). Não obstante são capazes de medidas diretas de reações químicas, diferentemente de técnicas de luminescência (HALE, 2001; STURM; SCHRAMM, 2009), e podem ser utilizadas em meio opaco, como na presença de suspensões de ribossomos, o que não ocorre na absorção molecular e técnicas derivadas.

Na terceira etapa avaliamos os parâmetros de interação e de inibição da atividade catalítica de ricina combinada a novos candidatos a inibidores produzidos em uma colaboração interinstitucional de diversas IES junto à rede Babel de Bioinformática (UFMG, UNIFEI, UFSJ, UFPB, FURG, Embrapa/PB, UNIFAL-MG).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

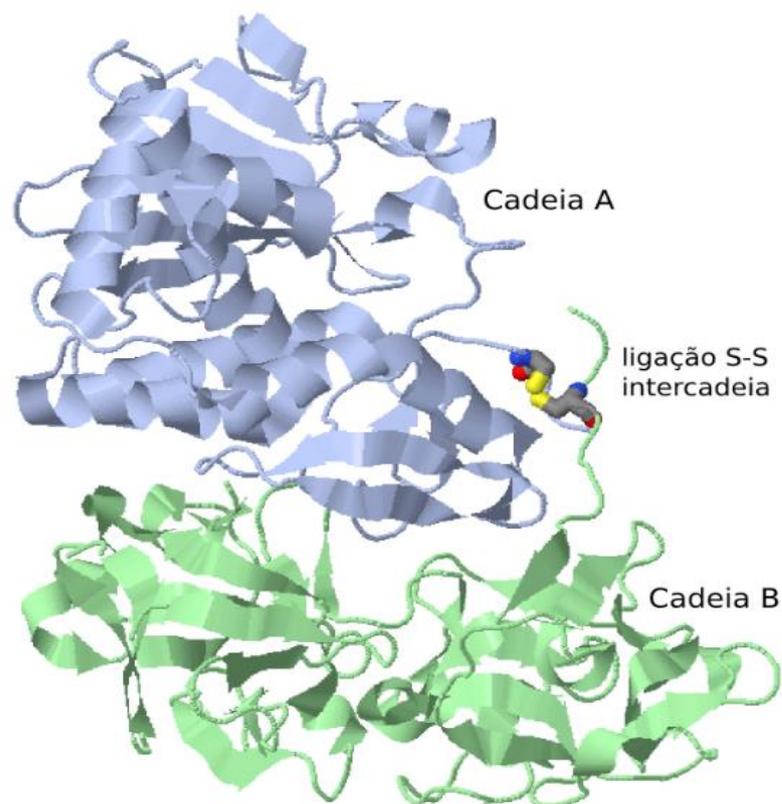
A revisão de literatura a seguir relata a ação da fitotoxina ricina extraída de sementes de mamoneira, bem como sua estrutura proteica, ação enzimática, mecanismo de interação molecular e inibição, aspectos da síntese da proteína, testes toxicológicos e testes de interação da ricina e seus candidatos a inibidores são discutidos.

### 2.1 RICINA

A toxina ricina encontrada no endosperma da semente de mamona é caracterizada como um heterodímero de aproximadamente 65 kDa (Figura 1) composto por uma subunidade catalítica (RTA, 267 aminoácidos, 32 kDa) unida a outra subunidade complexadora de membrana (RTB, 262 aminoácidos, de 33 kDa) por uma ligação dissulfeto entre o resíduo Cys259 da RTA e Cys4 da RTB (ARGENT *et al.*, 1994).

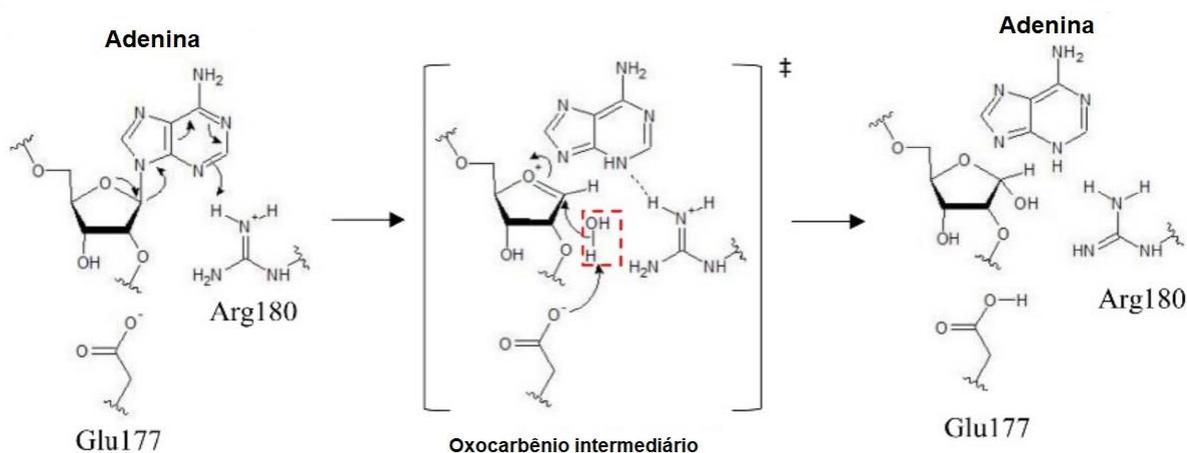
Por meio da RTA, esta holotoxina atua como inativadora de ribossomos tipo II (RIP, *Ribosome Inactivating Protein*), causando a morte celular por depurinação e consequente inibição da síntese proteica (RUDOLPH *et al.*, 2017). Estruturalmente, a RTA é uma proteína globular que apresenta três domínios (POLITO *et al.*, 2019; RUDOLPH *et al.*, 2017). O domínio I (resíduos 1 -117) é composto por seis cadeias de folhas- $\beta$  que termina numa  $\alpha$ -hélice B exposta ao solvente proeminente. O domínio II (resíduos 118-210), possui cinco  $\alpha$ -hélices com a  $\alpha$ -hélice E estando no núcleo da molécula. O domínio III (resíduos 211-267) forma uma saliência que se associa com a RTB por uma ligação dissulfeto e extensas interações hidrofóbicas (RUDOLPH *et al.*, 2016). Cinco resíduos, Tyr80, Tyr123, Glu177, Arg180 e Trp211, definem o sítio ativo da RTA, localizado na porção central da proteína (RUDOLPH *et al.*, 2017). Durante sua atividade N-glicosidase de depurinação, uma adenina específica, A4324 fica ensanduichada entre dois anéis aromáticos de Tyr80 e Tyr123, com ligações de hidrogênio favorecidas por Arg180 e estabilização do complexo por Glu177, próximos ao loop de sarcina (Figura 2) (YAN *et al.*, 1997).

Figura 1 - Representação em cartoon da ricina incluindo as subunidades RTA e RTB conectadas pela ligação de dissulfeto (ID PDB: 3RTI).



Fonte: Do autor, conforme visualizador Jmol (versão 13.0.13).

Figura 2 - Mecanismo de ação catalítica proposto para a RTA.



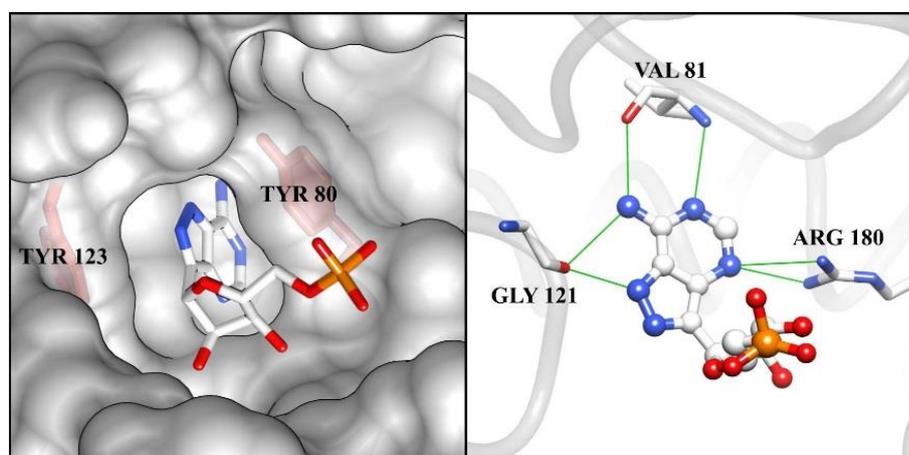
Fonte: POLITO *et al.*, 2019

Na Figura 3, o anel aromático análogo à base de adenina do substrato natural é intercalado entre Tyr80 e Tyr123 (à esquerda), interagindo complementarmente por

seis ligações de hidrogênio, destacadas por linhas entre os resíduos à direita, dentro do sítio ativo (JASHEWAY *et al.*, 2011). A cadeia RTA catalisa a clivagem hidrolítica da ligação N-glicosídica entre o resíduo de adenina 4324 e sua ribose, na porção 28S de ribossomos eucarióticos (TUMER; LI, 2011). Essa adenina pertence ao motivo conservado SRL (*sarcin-ricin loop*) do RNA ribossomal, sendo responsável pela ligação com EF-2 (Elongation Factor-2). Dessa forma, a depurinação de um único resíduo de adenina 4324 pela atividade glicosidase da RTA impede a elongação da cadeia nascente, interrompendo a síntese proteica, inviabilizando a célula (LEGLER *et al.*, 2017).

A atividade catalítica da RTA apresenta uma constante de Michaelis-Mentem  $K_m$  para ribossomos em torno de  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e uma constante catalítica  $K_{cat}$  de  $1500 \text{ min}^{-1}$ , exibindo, portanto, uma eficiência catalítica  $k_{cat}/K_m$  que se aproxima do valor teórico previsto para reações próximas ao limite difusional (JASHEWAY *et al.*, 2011).

Figura 3 - Estrutura de RTA complexada com análogo de substrato 5-monofosfato de formicina - FMP (ID PDB: 1FMP).



Fonte: JASHEWAY *et al.*, 2011

A subunidade RTB, por sua vez, tem dois domínios principais, cada um dos quais com um sítio de ligação à galactose. A RTB não tem estrutura secundária regular, mas exibe vários loops  $\Omega$ . Cada domínio RTB é constituído por três cópias de uma unidade de dobragem primitiva de 40 resíduos, que se embalam em torno de um eixo pseudotriplo (RUTENBER; ROBERTUS, 1991). Em cada domínio, a galactose liga-se numa fenda rasa formada por uma dobra de peptídeo com três resíduos no fundo e um anel aromático na parte superior (RUTENBER; ROBERTUS, 1991). A RTB atua como uma lectina, permitindo a internalização celular da ricina por interação

dessa com resíduos de galactose ou manose de glicoproteínas de membrana celular. A partir dessa internalização, um transporte retrógrado ocorre do complexo de Golgi ao retículo endoplasmático da célula, onde se manifesta a ação tóxica da ricina (BOZZA *et al.*, 2015).

Como a ligação do glicano da cadeia B é necessária para a internalização celular e a atividade enzimática da cadeia A é necessária para a inativação do ribossomo, a ricina é altamente tóxica quando: (1) as cadeias A e B estiverem presentes, (2) a cadeia B retém sua capacidade de ligação ao glicano e (3) a cadeia A é cataliticamente ativa (KALB; BARR, 2014).

## 2.2 DETECÇÃO DE RICINA

Várias abordagens têm sido relatadas na literatura para detecção da ricina, e de acordo com a classificação proposta por Bozza *et al.* (BOZZA *et al.*, 2015), os métodos podem ser diferenciados nos que detectam ricina biologicamente ativa e aqueles que a detectam de modo independente da atividade. Isto decorre porque, no caso de uma liberação intencional da toxina, é de fundamental importância que um método de detecção de ricina seja capaz de distinguir entre ricina inativa e ativa, bem como da potência dessa última, para adequadas ações de emergência, análise forense e terapia (DURACOVA *et al.*, 2018).

### 2.2.1 Métodos que detectam ricina de modo independente da atividade

As tecnologias de detecção imunológica baseadas em anticorpos têm sido amplamente desenvolvidas para a detecção e quantificação de ricina. Alguns métodos de imunoensaios estão presentes na literatura e a sensibilidade está diretamente ligada ao anticorpo selecionado (HE, 2014). Dentre os principais, encontram-se os radioimunoensaios, sendo um dos primeiros métodos capazes de detecção de concentrações baixas de ricina (50-100 pg.mL<sup>-1</sup>) (GODAL; OLSNES; PIHL, 1981; RAMAKRISHNAN; EAGLE; HOUSTON, 1982), contudo pouco utilizado devido ao uso de radioisótopos perigosos à saúde e meio ambiente.

Entre os diferentes ensaios baseados em anticorpos disponíveis, o ensaio imuno-adsorvente ligado a enzima (ELISA) tem sido usado com frequência. Anticorpos monoclonais de alta afinidade que se ligam especificamente à ricina foram gerados por diferentes grupos e estes anticorpos foram incorporados e utilizados extensivamente em diferentes formatos de ensaios (HE, 2014).

Métodos ELISA utilizam a detecção colorimétrica e quimioluminescente (POLI *et al.*, 1994; SHYU, H.-F. *et al.*, 2002), seguida de evoluções para uso de novas bases de imobilização como o uso de fibra óptica imobilizada com o anticorpo anti-ricina (NARANG *et al.*, 1997), partículas de ouro coloidal (SHYU, R.-H. *et al.*, 2002), microesferas magnéticas (YU, 2000), imunossensor magnetoelástico (RUAN *et al.*, 2004). Estas variações na superfície sólida melhoraram o tempo de ensaio, sensibilidade e aumento na área de superfície ativa (BOZZA *et al.*, 2015).

Além do teste de ELISA básico, imobilizando o antígeno por adsorção direta para a placa de ensaio, testes foram desenvolvidos utilizando a modalidade ELISA sanduiche, em que a imobilização do antígeno ocorre por meio de um anticorpo de captura que foi ligado à placa (HE, 2014; MEN *et al.*, 2010; MOSHIRI; HAMID; ETEMAD, 2016). Para aumentar a sensibilidade e reduzir o ruído de fundo, substratos cromogênicos tradicionais foram substituídos por eletroquimioluminescência e biosensores eletroquímicos (GUGLIELMO-VIRET; THULLIER, 2007; ZHUANG *et al.*, 2010).

Biosensores baseados em microarranjos, que incluem painéis de anticorpos para detecção simultânea de várias toxinas, entre elas a ricina, toxina do cólera, enterotoxinas estafilocócicas A e B, toxina botulínica A, proporcionaram avanços na versatilidade e utilidade do ensaio (DANIEL *et al.*, 2017; SIMONOVA *et al.*, 2012; WEINGART *et al.*, 2012).

Recentemente, os anticorpos de captura de toxinas usados como receptores foram substituídos por aptâmeros de DNA/RNA (ESTEBAN-FERNÁNDEZ DE ÁVILA *et al.*, 2016; LAMONT *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2017; PERIYAKARUPPAN *et al.*, 2011; STECHMANN *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2016), anticorpos de domínio único (ANDERSON *et al.*, 2013; SHIA; BAILEY, 2013) e materiais conjugados com açúcar voltados para a detecção da RTB (HUEBNER *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2011a).

A combinação de etapas de enriquecimento da amostra (usando anticorpos específicos para ricina, aptâmeros ou materiais conjugados com açúcar) com tecnologias de detecção aprimoradas, como ressonância plasmônica de superfície

(BLOME; PETRO; SCHENGRUND, 2010; CAMPOS *et al.*, 2016; FAN, J.-R. *et al.*, 2017; NAGATSUKA *et al.*, 2013), reação em cadeia da polimerase (PCR) (HE *et al.*, 2010) ou espectrometria de massa (MS) (KANAMORI-KATAOKA *et al.*, 2011), pode proporcionar um nível adicional de especificidade e sensibilidade aos métodos de detecção de ricina (BOZZA *et al.*, 2015).

Alguns métodos eletroquímicos que envolvem a detecção de ricina também foram descritos anteriormente (FURTADO *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2013; RIBEIRO; COSTA; LOURENC, 2017). No entanto, eles são capazes apenas de identificar e quantificar os traços de toxinas, não fornecendo qualquer informação a respeito de sua atividade catalítica e, por consequência, sem discriminar entre formas inativas e ativas de ricina, bem como avaliar a potência dessa.

A patente BR1020120212188 A2 (FURTADO *et al.*, 2014) descreve a elaboração de eletrodo impresso de carbono, sua modificação química detalhada, e sua aplicação na detecção física de ricina. O sensor utilizado é um eletrodo impresso de tinta de carbono. O método envolve quatro etapas para modificação de eletrodo, com 5 reagentes químicos envolvidos, e que compreendem o preparo da solução principal, a imobilização de xiloglucana na superfície com base e agente reticulante, a secagem, e o contato da superfície com uma solução bloqueadora. A detecção se dá pela adsorção física da holoricina ao biopolímero xiloglucano do eletrodo modificado. O método envolve a detecção por bioafinidade, e não pela atividade biológica por catálise enzimática proposto neste pedido. O resultado que explicita a resposta quantitativa do eletrodo exige que este seja modificado com reagente adicional de ouro coloidal e etapa adicional de síntese de nanopartículas de ouro.

### 2.2.2 Métodos que podem identificar a ricina biologicamente ativa

Enquanto os métodos imunoquímicos para detecção de ricina descritos anteriormente são capazes de identificação e quantificação da ricina em concentrações inferiores ao risco de intoxicação humana, estes apresentam uma desvantagem pela incapacidade de distinguir entre ricina biologicamente ativa e inativa (BOZZA *et al.*, 2015; DURACOVA *et al.*, 2018; HE, 2014).

A toxicidade da ricina pode ser medida por bioensaios com animais (BEYER *et al.*, 2009) ou por ensaios baseados na citotoxicidade induzida por ricina para as células em cultura (DYER *et al.*, 2016; PAULY *et al.*, 2012). Estes métodos identificam se a amostra contém a ricina biologicamente ativa capaz de exercer um efeito tóxico, não obstante exigem um tempo longo de incubação.

Como descrito acima, a ricina é classificada como ribossomo N-glicosidase devido à sua citotoxicidade em relação à depurinação da adenina específica 4324 localizada no 28S rRNA SRL, e pode ser monitorada com ensaios de tradução *in vitro*. Nesses ensaios, a atividade da ricina é determinada pela medição da inativação dos ribossomos e, portanto, diminui o rendimento de síntese de proteínas ativas em comparação ao controle (HALE, 2001; LANGER *et al.*, 1996; MEI *et al.*, 2006).

A patente KR2014702623220130521 (HELEN *et al.*, 2014) descreve um dispositivo, método e sistema para a detecção da atividade de proteínas que inativam o ribossomo em uma amostra, incluindo a ricina. O método baseia-se na emissão de fluorescência de um fragmento de DNA marcado em ambos os lados, por ricina e toxinas afins. Em essência, a detecção é apresentada pelo aumento de fluorescência decorrente da clivagem do DNA, que separa o fluoróforo, etiquetado em uma extremidade, de seu repressor, etiquetado na outra extremidade. Dessa forma, o método envolve a necessidade de oligonucleotídeos marcados com fluoróforo e com repressor, e sistema de fluorescência para detecção (ex: plataforma PCR-reação de cadeia de polimerase, com iniciadores, insumos, enzimas de amplificação e termociclador, como consta no documento, além da detecção por fluorimetria).

A invenção da patente de número EP3401408 A1 (ADI *et al.*, 2018), por sua vez, relata métodos e kits para a detecção da intoxicação com toxina RIP II, em particular a intoxicação humana com ricina, por depurinação de rRNA 28S, o que também envolve insumos e técnicas de custo elevado e procedimentos variados, como a necessidade de sistema *in vitro* para ensaio ribossomal, instrumentação específica e insumos para transcrição reversa (produção de c-DNA) e PCR, como termocicladores, iniciadores de amplificação gênica (“primers”), e DNA polimerase termoestável.

Embora a atividade N-glicosidase da ricina seja avaliada comumente frente a inativação ribossomal, a fitotoxina também pode ser descrita como um polinucleotídeo:adenosina N-glicosidase, devido à depuração da adenosina alternativa contida em substratos de RNA e DNA (BOZZA *et al.*, 2015). Assim,

atividade da ricina pode ser determinada pelo monitoramento da adenina liberada por sua ação catalítica a partir de RNA ribossômico, de substratos naturais (DNA ou RNA) ou sintéticos.

Monitoramentos de adenina liberada a partir de ribossomos tratados com ricina foram acompanhados por marcação fluorescente com cloroacetaldeído e detecção fluorescente da adenina modificada após separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (ZAMBONI *et al.*, 1989a). Conceito semelhante também foi relatado posteriormente por um ensaio para detecção colorimétrica da adenina modificada (HEISLER *et al.*, 2002), e por ensaio de luminescência acoplado para a medição de adenina liberada a partir de ribossomos ou pequenos RNAs sintéticos por catálise da RTA (STURM; SCHRAMM, 2009). A espectrometria de massa (MS) foi utilizada no desenvolvimento de metodologia para adenina liberada a partir de um substrato de RNA sintético pela RTA para quantificação direta da adenina (HINES; BRUEGGEMANN; HALE, 2004). Seguindo da mesma técnica, Bevilacqua *et al.* (BEVILACQUA *et al.*, 2010) relataram um ensaio de depurinação com DNA de esperma de arenque em alternativa ao ensaio com ribossomos.

O relato conforme apresentado na patente US2006/0057596 A1 (KEENER; WARD, 2007), propõe um método para detectar a atividade da N-glicosilase em uma amostra que envolve a incubação de um substrato de oligodesoxirribonucleotídeo contendo um resíduo de desoxiadenosina ou desoxiuridina com a amostra a ser testada, de modo que a N-glicosilase, se presente, irá hidrolizar o resíduo de desoxiadenosina ou desoxiuridina para resultar em um N-produto de glicosilase com um local abásico. Apesar de envolver a detecção de ricina por sua atividade N-glicosidase sobre oligonucleotídeos como o método proposto nesta apreciação, envolve diversas etapas e procedimentos custosos mencionados acima, como a infraestrutura para técnica de PCR. Nesse caso, o alvo como oligonucleotídeo resultante da atividade de ricina é detectado por amplificação gênica, de forma indireta e distinta do aqui proposto. A invenção também requer etapas de anelamento do DNA com iniciador específico e marcação do fragmento resultante da ação de ricina.

Nesse sentido, a patente WO2008105796 A2 (RODAY; SCHRAMM, 2008) também propõe a detecção da atividade de ricina por depurinação. Contudo, a invenção utiliza sondas e supressores fluorescentes de RNA, anelamento nucleotídico e respectivo sistema de detecção por fluorescência, além de uma estrutura de tetraloop específico de RNA como substrato para ação catalítica de endonucleases.

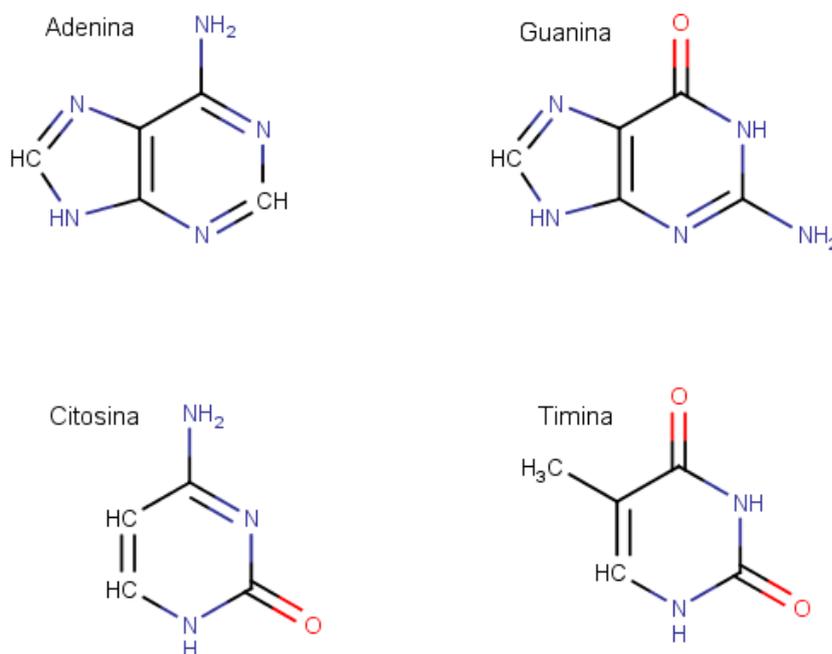
A seguir, apresentamos um breve levantamento de técnicas de detecção e quantificação de adenina que serviram de aporte ao desenvolvimento do ensaio para medição de adenina liberada durante a atividade de depurinação da holoricina no hsDNA por técnicas eletroquímicas.

### 2.2.3 Determinação de Adenina por Técnicas Eletroquímicas

A molécula de DNA em fita dupla consiste em dois filamentos compostos de unidades mais simples chamadas nucleotídeos entrelaçados um no outro para formar uma dupla hélice. Os nucleotídeos são moléculas orgânicas formadas pela ligação covalente de um monossacarídeo de cinco carbonos (pentose), uma base nitrogenada e um grupo fosfato. Estes apresentam papéis diferentes nos processos vitais, mas o mais importante refere-se à formação das unidades estruturais do ácido ribonucleico (RNA) e do ácido desoxirribonucleico (DNA) (NELSON; COX, 2008). Cada nucleotídeo do DNA é composto de uma base nitrogenada: adenina (A), guanina (G), citosina (C) ou timina (T) - Figura 4, bem como de um açúcar monossacarídeo - desoxirribose e um grupo fosfato. As bases nitrogenadas do DNA são compostos orgânicos cíclicos que incluem dois ou mais átomos de nitrogênio em suas sequências e classificadas em dois grupos, purinas (A e G) e pirimidinas (C e T).

A detecção e quantificação de bases nitrogenadas, em especial as técnicas que quantificam a adenina, são relatadas na literatura. Por exemplo, os métodos de eletroforese capilar (CE) (WANG, P.; REN, 2004), eletroforese capilar/espectrometria de massa (CE/MS) (YANG *et al.*, 2009), e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (NIKITAS *et al.*, 2011). Nesse sentido, nos últimos anos, o desenvolvimento de técnicas eletroquímicas tem sido proposto como uma alternativa promissora por algumas vantagens sobre os outros métodos, como baixo custo, resposta rápida, simplicidade de construção, pequenas dimensões dos dispositivos, pequeno volume de amostra de teste e alta sensibilidade (JANKOWSKA-ŚLIWIŃSKA *et al.*, 2017).

Figura 4 - Bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), citosina (C) ou timina (T).



Fonte: Do autor.

A literatura reporta a determinação de adenina com uso de diversos eletrodos, tais como carbono vítreo (OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 2004; WANG, H.-S.; JU; CHEN, 2002a) ou eletrodos de carbono vítreo modificado, como: grafeno funcionalizado com ácido carboxílico (grafeno-COOH/CGE) (HUANG, K. J. *et al.*, 2011), líquido iônico grafeno quitosano (NIU *et al.*, 2012), grafeno-Nafion (YIN *et al.*, 2010), nanopartículas de prata-polidopamina-grafeno (HUANG, K.-J. *et al.*, 2011), PbO<sub>2</sub>-nanotubos de carbono (LIU, T. *et al.*, 2011b), nanocompósito TiO<sub>2</sub> – grafeno (FAN, Y. *et al.*, 2011), filme de quitosana contendo nanopartículas de diamante funcionalizadas (f-DNPs / CS) (HABIBI; JAHANBAKHSI, 2016), e nanopartículas de dióxido de manganês (MnO<sub>2</sub>) e líquido iônico de grafeno funcionalizado (IL-GR) ligado a uma membrana de polidopamina (PDA) (ZHANG, S. *et al.*, 2019). Eletrodos de pasta de carbono também foram utilizados na forma não modificada (GILMARTIN; HART, 1992), e modificada com ciclodextrina (ABBASPOUR; NOORI, 2008). Outros eletrodos como o de cobre (TRNKOVA *et al.*, 2008) e mercúrio (SMITH; ELVING, 1962) também foram estudados para a determinação de adenina.

Um conjunto de técnicas eletroquímicas de análises foram estudadas para detecção e quantificação de bases nitrogenadas. Entre as mais recentes, estão as técnicas de pulso como a voltametria de pulso diferencial (VPD) (HABIBI; JAHANBAKHSI, 2016; KARIMI-MALEH *et al.*, 2018; PRADHAN *et al.*, 2019;

ZHANG, J. *et al.*, 2019; ZHANG, S. *et al.*, 2019) e a voltametria de onda quadrada (VOQ) (LIU, X. *et al.*, 2012; MANIKANDAN; DEEPA; NARAYANAN, 2019). As técnicas empregam por vezes a acumulação do analito à superfície do eletrodo (*stripping*, 5 min) (WANG, H.-S.; JU; CHEN, 2002b), ou não (YAO; WASA; MUSHA, 1977).

### 2.3 INIBIDORES DE RICINA

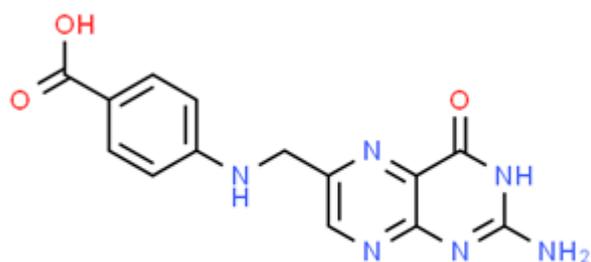
Embora seja a RTB a cadeia responsável pela interação da ricina à membrana celular que antecede sua toxicidade, existem dois domínios responsáveis pela ligação a resíduos de galactosídeos, separados por cerca de 50 Å, reduzindo as chances de síntese de um composto que possa interagir fortemente ao sítio de ligação (JASHEWAY *et al.*, 2011). Dessa forma a literatura apresenta um direcionamento às plataformas para inibição da cadeia catalítica RTA.

Ensaio que inibem a atividade enzimática das cadeias A têm limitado sucesso, e nenhuma forma terapêutica para reverter os efeitos da intoxicação utilizando-se de moléculas pequenas pós-exposição encontra-se disponível, ao menos até a última revisão de literatura desta monografia, realizada em 21/11/2020 (LEGLER *et al.*, 2017; TUMER, 2020)

Os mais potentes inibidores, entretanto, possuem modesto valor de IC<sub>50</sub> em torno de  $1 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. Dos principais estudados, o ácido pterico (*Figura 5*) e seus derivados (pterina, neopterina, formicina, guaninas e pteridinas alquiladas) interagem com ao menos cinco resíduos durante a ligação da ricina ao ribossomo e sua consequente depurinação: Glu177, Arg180, Trp211, Tyr80 e Tyr123 (YAN *et al.*, 1997).

A pterina, por exemplo, interage especificamente com um resíduo Tyr80 por efeito hidrofóbico e forças de van der Waals a um Ki aparente de 0,6 mmol.L<sup>-1</sup> resultante de sua interação ao região de especificidade da adenina e ao anel de benzoato (YAN *et al.*, 1997), valor experimental em acordo com o predito por programas de triagem virtual (SAITO *et al.*, 2013).

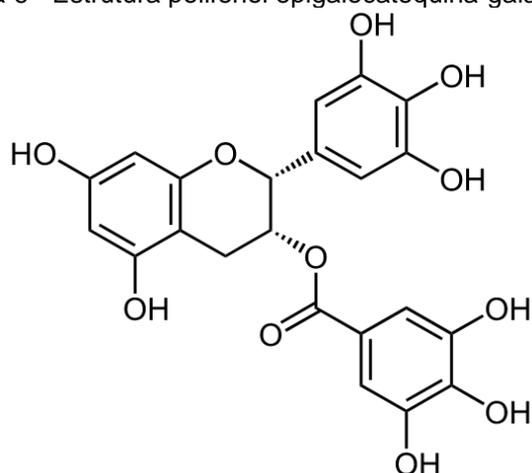
Figura 5 - Estrutura do ácido pterico.



Fonte: Do autor.

Estudos recentes investigaram a interação do polifenol epigalocatequina-galato (eGCG, *Figura 6*) (DYER *et al.*, 2016), em relação ao seu impacto sobre a toxicidade da ricina *in vitro*. Os ensaios indicaram que o polifenol apresentou redução significativa na toxicidade da ricina. Em células de macrófagos humanos foram obtidos valores de  $IC_{50}$  para a ricina livre de  $0,54 \pm 0,024 \text{ ng.mL}^{-1}$  e para a ricina complexada com eGCG de  $0,68 \pm 0,235 \text{ ng.mL}^{-1}$ . A interação foi examinada sobre a subunidade RTB por meio de teste da sua capacidade de ligação com a sepharose conjugada com lactose, sendo a RTB utilizada na presença e na ausência da eGCG.

Figura 6 - Estrutura polifenol epigalocatequina-galato (eGCG).



Fonte: Do autor.

Os resultados apoiaram uma hipótese mecânica da redução da toxicidade associada a ricina na presença de eGCG, pelo menos em parte, como devido a uma interação entre o eGCG e a subunidade RTB. Em paralelo ao desenvolvimento de compostos inibitórios da atividade N-glicosidase de ricina, outras estratégias parecem

envolver o bloqueio do tráfego intracelular desta até o ribossomo (BARBIER *et al.*, 2012). Dessa forma, compostos como ilimaquinona, brefeldin A, golgicida A e Exo2 tem buscado regular ou mesmo interromper o metabolismo do aparelho de Golgi na presença de ricina (BARBIER *et al.*, 2012).

## 2.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA

A maioria das enzimas tem algumas propriedades cinéticas em comum, e estas seguem o modelo cinético do tipo michaeliana onde a enzima (E) se combina com o substrato (S), formando o complexo enzima-substrato (ES), o que pode prosseguir para formar o produto (P) ou dissociar em enzima (E) e substrato (S) (PINTO; MARTINS, 2016).

Parâmetros cinéticos de uma enzima são importantes na determinação da atividade enzimática. Nesse sentido, o modelo cinético de estado estacionário estabelecido por Briggs-Haldane e Michaelis-Menten permite que a atividade de uma enzima seja determinada com base na velocidade de conversão do substrato em produto pela ação da enzima conforme a equação 1.

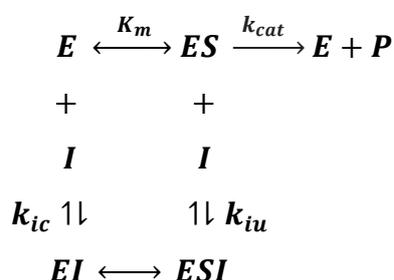
$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Onde  $v$  é a velocidade inicial da reação,  $V_{max}$  é a velocidade máxima da reação,  $[S]$  é a concentração do substrato e  $K_M$  é a constante de Michaelis-Menten de interação da enzima pelo substrato e sua conversão.

Em enzimas de comportamento michaeliano, a velocidade inicial de reação ( $v$ ) é limitada pela etapa de conversão do complexo  $[ES]$  em P, dependendo da concentração da enzima que interage com o substratos, enquanto que o produto da velocidade máxima ( $V_{max}$ ) pela concentração da enzima representa a constante catalítica  $k_{cat}$ , esta por sua vez, também denominada por número de renovação, define o número de ciclos catalíticos por unidade de “tempo e por quantidade de enzima presente em condições de saturação com o substrato (CORNISH-BOWDEN, 2014).

### 2.4.1 Diagnóstico de inibição enzimática

Substâncias que inibem a atividade de uma enzima podem ser classificadas por inibição do tipo reversíveis ou irreversíveis, de acordo com a estabilidade gerada pela sua ligação com a enzima. Os inibidores irreversíveis se ligam às enzimas levando à inativação definitiva desta. Os inibidores reversíveis podem ser basicamente divididos em competitivos, incompetitivos e não-competitivos conforme o diagrama de inibição enzimática a seguir (esquema 1) (BISSWANGER, 2008).



Onde E, enzima; ES, complexo enzima/ substrato; EIS, complexo inibidor/enzima/substrato; EI, complexo enzima/inibidor; P, produto;  $K_{ic}$ , constante de inibição competitiva; e  $K_{iu}$ , constante de inibição incompetitiva (BEZERRA; DIAS, 2005). Desse modo, se  $K_{ic}$  e  $K_{iu}$  são insignificantes, obtemos um modelo sem inibição. Se somente  $K_{iu}$  for insignificante, o modelo obtido é de inibição competitiva. Quando  $K_{ic}$  for insignificante o modelo obtido é de inibição incompetitiva. Um terceiro tipo de inibição pode ocorrer quando  $K_{ic} = K_{iu} \neq \infty$ , originando-se uma inibição não-competitiva pura. Finalmente, ainda existe a possibilidade de uma inibição mista, onde  $K_{ic} \neq K_{iu} \neq \infty$ .

Os inibidores competitivos normalmente se assemelham ao substrato, ocupando o sítio ativo e impedindo que o substrato se ligue à enzima. Quando o inibidor for competitivo, o que muda nas constantes cinéticas é o valor de  $K_m$  determinado experimentalmente. Nesse caso, a equação de Michaelis-Menten será modificada conforme a equação 2, onde  $\alpha$ , representa o termo  $1 + [I]/k_{ic}$ .

$$v = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_m + [S]} \quad (2)$$

Inibidores incompetitivos, por sua vez ocupam o sítio ativo complexados ao substrato. No caso de inibidores incompetitivos, a relação entre  $K_m$  e  $V_{max}$  não se altera. Nesse caso, a equação de Michaelis-Menten será modificada conforme a equação 3, onde  $\alpha'$ , representa o termo  $1 + [I]/k_{iu}$ .

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + \alpha' [S]} \quad (3)$$

Já os inibidores não-competitivos puros (equação 4) alteram os parâmetros cinéticos, onde  $K_i = K_{ic} = K_{iu}$ , então  $\alpha''$  representa o termo  $1 + [I]/k_i$ .

$$v = \frac{V_{max} [S]}{\alpha'' K_m + \alpha'' [S]} \quad (4)$$

Por fim, os inibidores mistos (equação 5) também alteram tanto o valor de  $K_m$  (aumenta ou diminui) como o valor de  $V_{max}$  (diminui), onde  $K_{ic} \neq K_{iu}$ .

$$v = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]} \quad (5)$$

Independentemente do tipo de inibição enzimática, o diagnóstico é normalmente realizado por ajustes não lineares dos modelos às equações propostas, ou por linearização das mesmas e aplicação de pesos adequados (BISSWANGER, 2008).

## 2.5 INTERAÇÃO DE LIGANTES COM PROTEÍNAS

Para a maioria das enzimas, métodos cinéticos *in vitro*, bem como ensaios termodinâmicos e de interação proteína-ligante, foram desenvolvidos para facilitar a avaliação do efeito inibitório do ligante sobre a ação catalítica da proteína. Comparativamente, são escassos os ensaios disponíveis para a triagem terapêutica anti-ricina utilizando-se técnicas sem o uso de sistemas biológicos e envolvendo processos de reconhecimento molecular. A combinação de substâncias com enzimas

normalmente afeta sua ação biológica. Essa ligação pode ser analisada quantitativamente sob o aspecto cinético (atividade biológica) e termodinâmico (energia de ligação) do binômio proteína-composto envolvido.

Dessas análises é possível estabelecer se, como, onde e quando um composto qualquer é capaz de interagir com uma proteína, alterar sua ação biológica e conformação nativa (GORE, 2000).

A interação de um ligante (L) a uma proteína (P) resulta no complexo



proteína-ligante (PL), e pode ser descrita a partir da lei de ação de massas pela constante de dissociação ( $K_d$ ) ou o valor do seu recíproco, a constante de associação ( $K_b$ ) (BISSWANGER, 2008).

$$K_d = \frac{1}{K_b} = \frac{[P]+[L]}{[PL]} \quad (7)$$

Esse parâmetro, juntamente com o número de sítios de interação, representa o conjunto de parâmetros de equilíbrio para uma associação desse tipo, também possibilitando uma análise conformacional da interação dos compostos.

### 2.5.1 Interação ricina-inibidor por espectrofluorimetria

A determinação experimental de parâmetros termodinâmicos, constantes de afinidade, juntamente à estequiometria da formação de complexos, constitui uma importante ferramenta para os estudos envolvendo processos de reconhecimento molecular (GORE, 2000). Tais medidas adicionam informação a estudos teóricos e experimentais, auxiliando na construção de modelos que permitam a elucidação de mecanismos bioquímicos, função de proteínas, relação entre propriedades de compostos e sua atividade biológica, entre outros.

Com base no conhecimento da interação de determinadas moléculas com uma proteína alvo é possível, por exemplo, desenhar compostos capazes de controlar sua atividade, interrompendo ou estimulando as rotas metabólicas das quais a proteína alvo participa (HARVEY, 2011). Nesse trabalho utilizaremos a espectroscopia de

fluorescência para determinação, respectivamente, de parâmetros termodinâmicos da interação da ricina com seus candidatos a ligante.

A ricina apresenta intensidade de fluorescência decorrente de seus fluoróforos intrínsecos (triptofano, tirosina e fenilalanina). Na prática, o triptofano é o fluoróforo intrínseco dominante, e alterações nos espectros de emissão do triptofano podem estar ligadas a transições conformacionais, associação de subunidades, ligação ao substrato ou desnaturação. Essas interações podem afetar o ambiente local na circunvizinhança do anel indol (GORE, 2000).

A intensidade de fluorescência de uma proteína pode ser diminuída como resultado de uma ampla variedade de processos e tais declínios podem ser resultados de diferentes interações moleculares entre a proteína e o ligante (GORE, 2000). Especificamente para a ricina, sua intensidade de fluorescência pode ser detectável a uma excitação de 295 nm e monitoramento da emissão de 320 a 420 nm, com um pico observado a 340 nm (LULKA *et al.*, 2000).

Os mecanismos de extinção da fluorescência podem ser avaliados pela relação de Stern-Volmer conforme a Equação 8 a seguir:

$$\frac{F_0}{F} = k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (8)$$

onde  $F_0$  e  $F$  representa as intensidades de fluorescência da proteína na ausência e na presença de ligante, respectivamente,  $[Q]$  a concentração do ligante,  $k_q$  a constante da interação bimolecular,  $\tau_0$  é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do ligante e constante de interação de Stern-Volmer será  $K_{sv}$  (VALEUR, 2012).

Em experimentos de interação ligante-macromolécula, o valor de  $K_{sv}$  é comumente considerado como a constante de interação do complexo ( $K_b$ ) (RASHIDIPOUR; NAEEMINEJAD; CHAMANI, 2016; VAN DE WEERT; STELLA, 2011).

## 2.6 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

As técnicas eletroanalíticas são cada vez mais utilizadas em áreas como medicina, bioquímica, biologia molecular, química ambiental e físico-química, para obter-se informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas das substâncias.

São encontrados na literatura estudos de processos de oxidação e redução em diferentes meios, de adsorção em superfícies e de mecanismo de transferência de elétrons, utilizando-se diversos tipos de eletrodos com e sem modificação (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

Para aplicação de potencial variável no tempo, o método pode ser executado por varredura linear e voltametria cíclica, ou por técnicas de pulsos como a voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial. Em qualquer caso, a corrente medida é plotada junto ao potencial correspondente (COMPTON; BANKS, 2011). As técnicas de varredura linear e voltametria cíclica permitem as análises qualitativas e/ou quantitativas sobre reações eletroquímicas (FERNANDES *et al.*, 2015). Em relação às voltametrias de pulso, são extensivamente empregadas em eletroanálise, pois oferecem maior sensibilidade e sinais mais apropriados para estudos quantitativos (COMPTON; BANKS, 2011). Maiores detalhes sobre as técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada são descritos a seguir.

### 2.6.1 Voltametria Cíclica

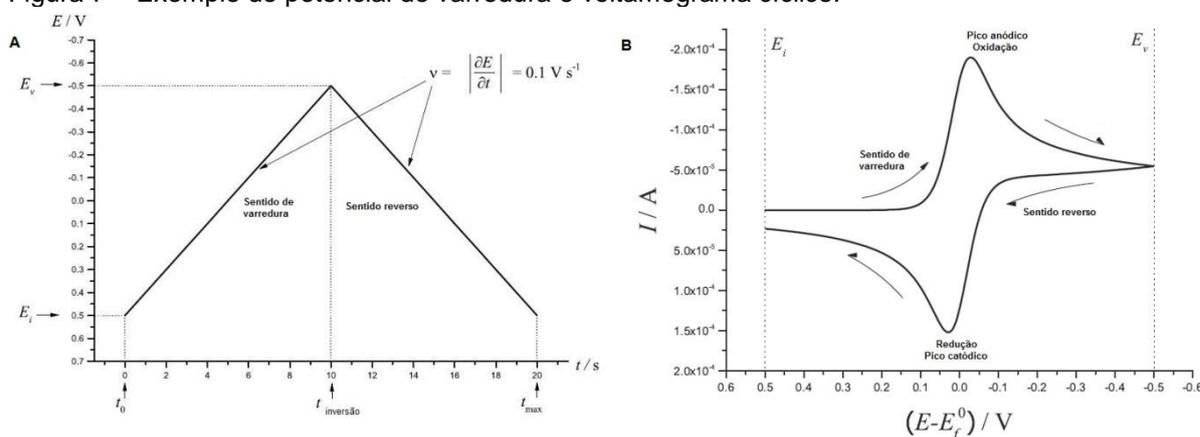
A técnica de voltametria cíclica (CV) permite por inspeção rápida dos voltamogramas a obtenção de informações sobre a natureza difusiva ou adsortiva do processo no eletrodo, seus parâmetros eletrocinéticos e termodinâmicos, bem como a existência e as características de reações químicas homogêneas acopladas (BARD; FAULKNER, 2000). Este método eletroquímico também é muito útil para a avaliação da magnitude de efeitos indesejáveis, como os derivados de queda ôhmica ou capacitância de dupla camada. Conseqüentemente, a voltametria cíclica é frequentemente usada para a análise de espécies e superfícies eletroativas e para a determinação de mecanismos de reação e constantes de taxa (COMPTON; BANKS, 2011).

Podemos representar um processo geral de redução no eletrodo como:



Em um experimento típico de voltametria cíclica, o potencial é varrido linearmente com o tempo, a partir de um potencial inicial pré-definido ( $E_i$ ), onde a espécie A é estável (ou seja, não eletrorreduzida), a outro potencial mais negativo,  $E_v$ , no qual a transferência de elétrons entre as espécies A e o eletrodo é rápida e a espécie B é formada. O potencial é então retornado a  $E_i$ , causando a transferência de elétrons na direção oposta e recompondo a espécie A. Essa forma de onda potencial é mostrada na *Figura 7A*. Durante esse processo, a corrente  $I$  (proporcional à taxa de transferência de elétrons) é registrada, a *Figura 7B* apresenta um voltamograma cíclico típico de um processo redox reversível, envolvendo espécies solúveis e um eletrodo de trabalho inerte.

Figura 7 – Exemplo de potencial de varredura e voltamograma cíclico.



Fonte: COMPTON; BANKS, 2011.

Legenda: (A) Forma de onda do potencial aplicado durante um experimento típico de voltametria cíclica.

Neste caso, o potencial inicial,  $E_i$ , é 0,5 V, o potencial do vértice,  $E_v$ , é -0,5 V, e a taxa de varredura,  $v$ , é 0,1 V.s<sup>-1</sup>.

(B) Exemplo de voltamograma cíclico produzido pela aplicação da forma de onda potencial para sistemas reversíveis.

O voltamograma cíclico da *Figura 7B* revela a formação de um pico anódico no sentido da varredura referente à oxidação da espécie, e durante o percurso catódico (sentido reverso) observa-se o pico catódico, associado ao pico de redução.

Assumindo que a cinética da transferência de elétrons seja rápida em relação à taxa de transporte de massa, o equilíbrio nernstiano é alcançado na superfície do eletrodo durante toda a varredura em potencial. Assim, a equação de Nernst relaciona as concentrações de superfície das espécies A e B ao potencial aplicado no eletrodo,  $E$ , como segue:

$$E = E_f^0 + \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{[A0]}{[B0]} \right) \quad (10)$$

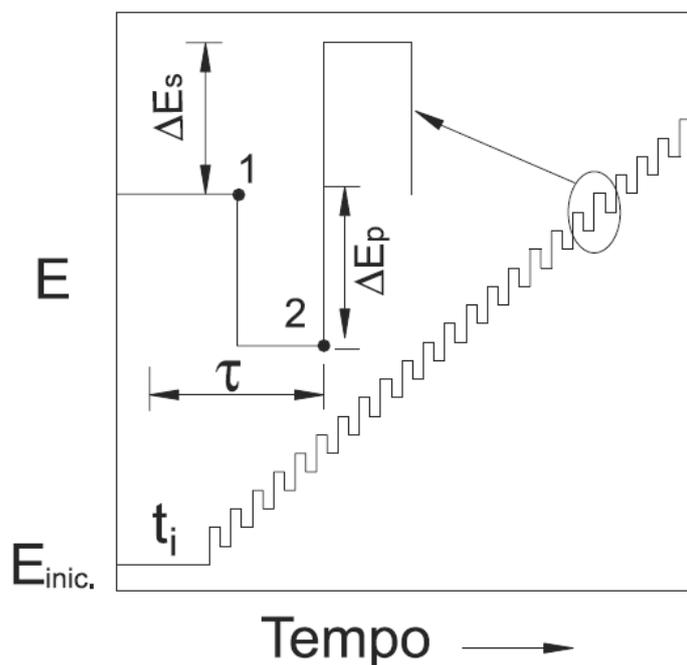
onde  $E_f^0$  é o potencial formal da reação, R é a constante de gás, T é a temperatura (geralmente 298 K), F é a constante de Faraday e [A0] e [B0] são as concentrações de A e B próximas a superfície do eletrodo. Dessa forma, o tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que as espécies A e B sofrem na superfície do eletrodo, o que faz da voltametria cíclica uma importante ferramenta para estudos mecanísticos (PACHECO *et al.*, 2013).

### 2.6.2 Voltametria de Onda Quadrada

A VOQ integra um conjunto de técnicas denominadas técnicas de pulso, baseadas na medição da corrente elétrica em função do tempo de aplicação. Ao contrário da voltametria cíclica, a aplicação do potencial no eletrodo não é uma função linear do tempo do experimento, sendo que a sistemática para a variação de potencial segue uma sequência de pulsos de potenciais, cujas respostas de corrente obtidas dependem de como estes pulsos foram aplicados (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

A modulação de potencial típica usada em VOQ consiste em uma onda de forma quadrada de amplitude  $\Delta E_p$  sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada caracterizada pela amplitude  $\Delta E_s$  (*Figura 8*) (MIRCESKI *et al.*, 2013; PACHECO *et al.*, 2013). Em cada etapa da rampa da escada, dois impulsos de altura igual e potencial direcionado de forma oposta são impostos. Os dois últimos pulsos de potencial completam um único ciclo de potencial em VOQ. Esse ciclo potencial é repetido em cada etapa da rampa da escada durante o experimento voltamétrico (MIRCESKI *et al.*, 2013). Na curva de potencial-tempo, a largura do pulso ( $\tau/2$ ) é chamada  $t$  e a frequência de aplicação dos pulsos ( $f$ ) e é dada por  $(1/t)$  (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). O significado físico da frequência pode ser entendido como um número de ciclos potenciais em uma unidade de tempo (MIRCESKI *et al.*, 2013).

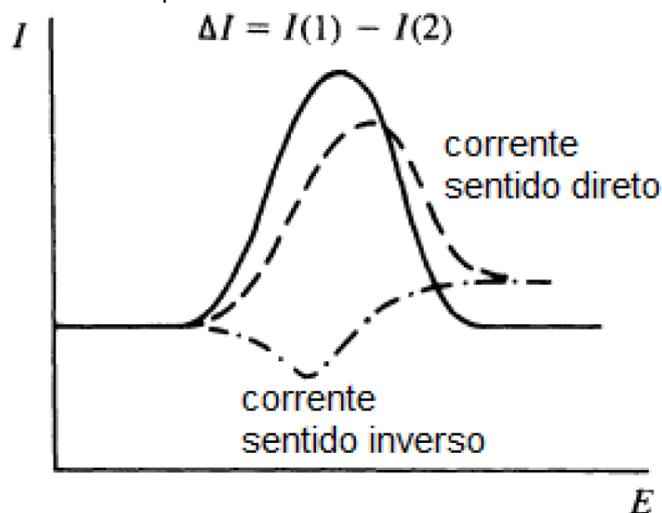
Figura 8 - Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada.



Fonte: DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003.

Conforme relata De Souza (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003), as correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos diretos e reversos, e o sinal é obtido como uma intensidade da corrente resultante ( $\Delta I$ ) de forma diferencial, com excelente sensibilidade e baixas correntes capacitivas. A *Figura 9* apresenta o voltamograma resultante obtido da diferença entre estas duas correntes versus a rampa de potencial aplicado.

Figura 9 - Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada para um processo redox de um sistema reversível.



Fonte: PACHECO *et al.*, 2013.

Para a maioria dos mecanismos de eletro-oxidação, o componente resultante (sinal analítico) é uma curva em forma de sino, permitindo a determinação precisa de sua posição e altura. Portanto, o procedimento de subtração das correntes direta e reversa contribui ainda mais para o cancelamento das correntes capacitivas, que é uma das razões pela alta qualidade e sensibilidade aprimorada dos voltamogramas obtidos por VOQ (MIRCESKI *et al.*, 2013).

### 3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um procedimento eletroquímico para detecção de ricina por sua atividade catalítica, e avaliar parâmetros de interação da ricina combinada a candidatos a inibidores.

Para isso, alguns objetivos específicos se destacam:

- a) extração e purificação de ricina a partir de sementes de mamona;
- b) avaliação de citotoxicidade da proteína purificada;
- c) desenvolvimento e validação de ensaio eletroquímico para caracterização de atividade enzimática da ricina;
- d) avaliação da atividade da ricina em matrizes alimentares;
- e) avaliação da interação de ricina com alguns candidatos a inibidores e possíveis mecanismos de complexação;
- f) avaliação do potencial inibitório de candidatos a ligantes complexados com a ricina.

## 4 JUSTIFICATIVA

A ricina tem direcionado a atenção recente de governos e da comunidade científica por ser considerada uma das mais potentes toxinas de origem vegetal, e por ser um potencial agente para uso no bioterrorismo, registrado em anos recentes. Entretanto, apesar de possuir significativa importância médica, industrial e bélica, a ricina ainda não possui antídoto farmacológico de sua ação letal aprovado por agências governamentais. Diante do exposto, o projeto buscou o estudo de potenciais inibidores-ligantes para a ricina seguido de testes experimentais e a otimização por ensaios termodinâmicos de interação dos candidatos a fármacos produzidos para a ricina.

Embora existam diversos métodos para a detecção de ricina em amostras suspeitas, a imensa maioria reside no emprego de anticorpos monoclonais, técnicas de amplificação gênica, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e técnica de espectroscopia de massas, além do emprego de reagentes múltiplos para identificação da toxina. Diante do exposto, o projeto buscou a elaboração de um procedimento eletroquímico que pudesse envolver poucos reativos e equipamento de custo relativamente modesto em relação aos empregados. Junto à sua validação, o trabalho também considerou avaliar alguns candidatos complexadores da toxina e seu potencial inibitório, junto a uma rede de pesquisa denominada BaBel ((UFMG, UNIFEI, UFSJ, UFPB, FURG, Embrapa/PB), no âmbito no âmbito da elaboração racional de ligantes para alvos drogáveis (edital Capes nº 051/2013).

## 5 METODOLOGIA

Nesta sessão são apresentados os materiais e procedimentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho executado no Laboratório de Bioquímica, Unifal-MG em Alfenas, MG.

### 5.1 MATERIAIS

Todas as soluções foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico e água ultrapura obtida em um sistema Millipore Milli-Q® (modelo Direct-Q 3), com resistividade > 18,0 MΩ cm.

As soluções estoque de DNA de esperma de arenque (hsDNA, Sigma-Aldrich) e de Adenina (Sigma-Aldrich) foram preparadas em 50 mmol.L<sup>-1</sup> de tampão acetato de sódio pH 4,6, ambas na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, e respectivamente, estocadas sob refrigeração a 4 °C e protegidas da luz.

As matrizes alimentares de clara de ovo de galinha comum e leite desnatado foram adquiridos em comércio local, sendo que, os dois possuem classificação clara no DISPOA que regulamenta produtos de origem animal.

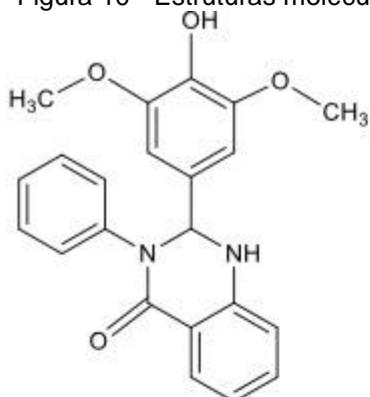
A ricina foi purificada no Laboratório de Bioquímica, Unifal-MG em Alfenas, MG, a partir de sementes de *R. communis* conforme metodologia apresentada a seguir e em conformidade com protocolo de segurança.

#### 5.1.1 Seleção dos ligantes

Foram empregados como moléculas controle os compostos Retro-2 (Sigma-Aldrich, *Figura 10*) e ácido pteróico (Sigma-Aldrich, *Figura 5*), adquiridas comercialmente. Adicionalmente, sete candidatos a ligantes para ricina foram sintetizados pelo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – UFPB, sob a coordenação do Prof. Dr. Luiz Cezar Rodrigues, e cedidos por esse frente a um esforço conjunto de rede de pesquisa multistitucional que inclui a UNIFAL-MG (Rede BaBel) para avaliação *in silico* e *in*

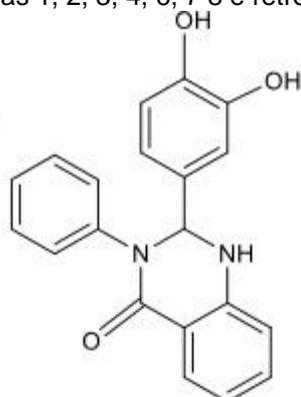
*in vitro* de alvos drogáveis. As estruturas das moléculas podem ser observadas junto à Figura 10.

Figura 10 - Estruturas moléculas 1, 2, 3, 4, 6, 7 8 e retro-2 (5R).



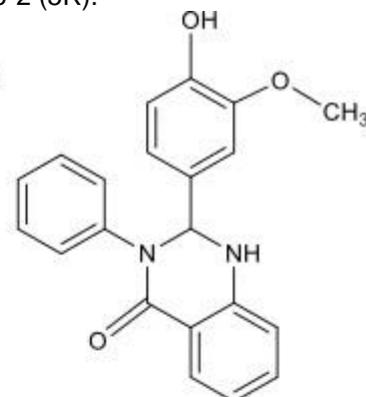
Molécula "1" - 225 mg

Massa molar: 376,41 g/mol



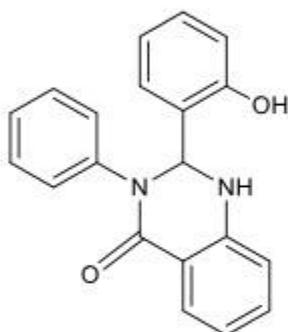
Molécula "2" - 22,5 mg

Massa molar: 332,35 g/mol



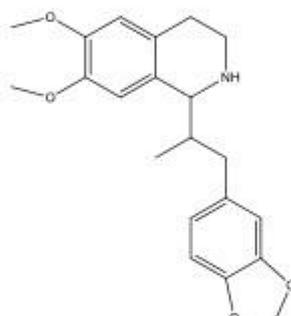
Molécula "3" - 86 mg

Massa molar: 346,38 g/mol



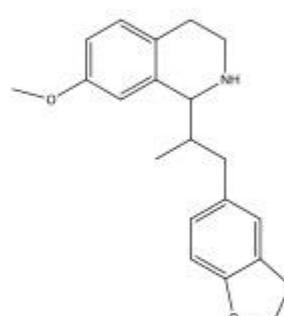
Molécula "4" - 126 mg

Massa molar: 316,35 g/mol



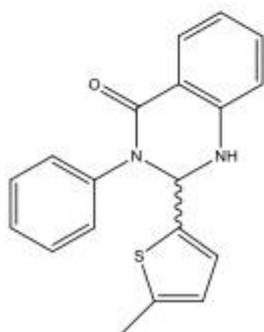
Molécula "6" - 135 mg

Massa molar: 355,18 g/mol

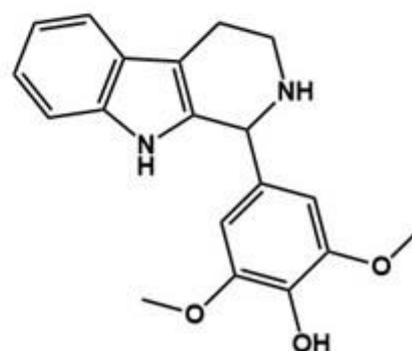


Molécula "7" - 14 mg

Massa molar: 325,41 g/mol



Molécula Retro-2 (5R)



Molécula "8"

Chemical Formula: C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Molecular Weight: 324,38

Fonte: Do autor.

### 5.1.2 Protocolo de Segurança

A ricina é um agente biológico de risco grau III, classificado pela Comissão de Biossegurança em Saúde/MS e Agência Nacional de Biossegurança, bem como Categoria B como agente de bioterrorismo pelo CDC de Atlanta (Center for Disease Control and Prevention”) (SINHA; SINGH, 2016), portanto, todos os ensaios envolvendo a ricina foram conduzidos adotando-se técnicas e práticas de trabalho em conformidade com a classe de risco.

A utilização e manuseio da ricina no laboratório de bioquímica encontra-se liberada pela Comissão Permanente de Prevenção e Controle de Riscos Ambientais - CPPCRA da UNIFAL-MG sob o PARECER TÉCNICO N°01/2015 de 24 de abril de 2015 (anexo A). Adicionalmente, também já se encontra liberada autorização junto ao Exército Brasileiro para aquisição, manuseio, e armazenamento da ricina na relação de produtos controlados da UNIFAL-MG (CR n°28378, anexo B).

## 5.2 ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram obtidos a um mínimo de triplicatas e representados por média  $\pm$  desvio padrão. Foram aceitos como significativos os resultados dos ajustes obtidos com p valor menor que 0,05, após tratamento dos dados com auxílio do pacote estatístico de distribuição livre R (versão 3.21) e OriginPro, versão 2019b. A qualidade dos ajustes matemáticos lineares foi aferida por comparação simples dos valores de coeficiente de correlação de Pearson (R), bem como dos parâmetros de dispersão.

## 5.3 OBTENÇÃO DE RICINA

A obtenção da ricina foi realizada a partir de adaptações da metodologia de Simmons e Russell (SIMMONS; RUSSELL, 1985). Para a extração da ricina, aproximadamente 20 g de sementes de mamona (*Ricinus communis L.*) obtidas na região da cidade de Alfenas-MG foram trituradas lavadas com uma solução de 20 mL

de acetona e 20 mL hexano para retiradas de gorduras presentes na torta de mamona. Homogeneizou-se essa torta em 100 mL de solução de NaCl 0,15 mol.L<sup>-1</sup> e mantidas em seguida por um período de 24h à 4°C, sob agitação. Obteve-se o extrato bruto após filtração simples. Submeteu-se este extrato à precipitação de proteínas com sulfato de amônio até alcançar 60% de saturação seguido de incubação overnight a 4°C conforme ensaios já realizados por Ngo et al. (2016). A mistura foi centrifugada a 15.000 rpm durante 10 min a temperatura de 4 °C e o precipitado dissolvido posteriormente na quantidade 10 mL de água destilada e dialisado durante 72 h para remoção do excesso de sais.

### 5.3.1 Cromatografia

Em um primeiro momento, o extrato pré-purificado da ricina foi submetido a uma coluna cromatográfica de exclusão por tamanho utilizando-se gel de filtração sephadex G-50 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MA, EUA). O gel foi ativado em solução salina 0,9% a temperatura ambiente durante 6 horas. Posteriormente, o gel foi empacotado em uma coluna de vidro (2,5 cm x 25 cm) e pré-equilibrado com 100 mL de solução salina 0,9%. As frações de proteína foram eluídas com a mesma solução a uma vazão de 0,2 mL/minuto e recolhidas para teste em espectrofotômetro Libra S22 UV/Vis (Biochrom LKB, St Albans, Reino Unido) a 280 nm para delineamento do perfil de eluição.

Em um segundo momento, a fração de maior valor de absorbância coletada anteriormente foi submetida a uma nova cromatografia de exclusão por tamanho utilizando-se gel de filtração sephadex G-100 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MA, EUA). Procedeu-se para as etapas de ativação, pré-equilíbrio, eluição e coleta das frações de proteína de forma análoga ao procedimento anterior.

### 5.3.2 Teste de pureza (Eletroforese)

Para a análise eletroforética (SDS-PAGE) foi utilizado o sistema da marca Biorad e a metodologia de preparação dos geis descrita por Laemmli (LAEMMLI,

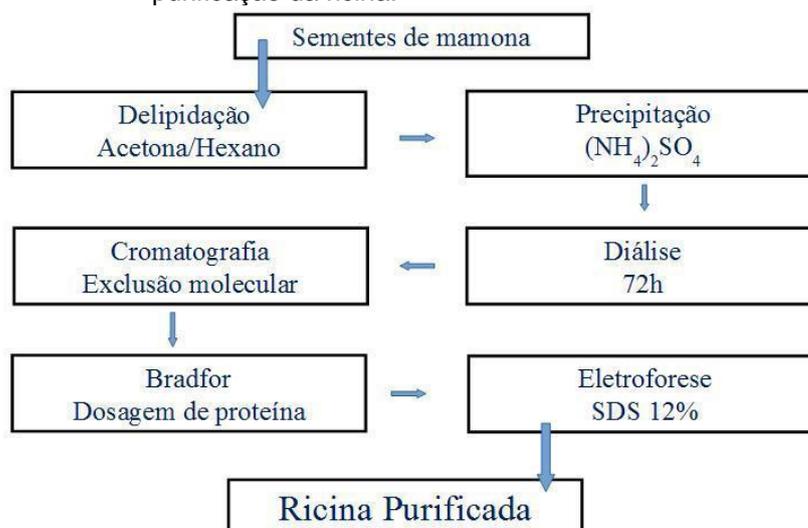
1970). Para o gel de corrida foi utilizada acrilamida (Sigma-Aldrich) na concentração de 12% e de 4% no gel de aplicação da amostra. As proteínas dos géis foram coradas “overnight” com uma solução de ácido acético 10% (v/v), álcool metílico 40% (v/v) e Coomassie Brilliant Blue R250 1% (v/v, Sigma-Aldrich). O gel foi descorado em solução contendo 10% (v/v) de ácido acético e 40% (v/v) de álcool metílico, renovando a solução a cada 30 minutos, até obtenção de revelação nítida. O marcador de massa molecular utilizado foi do fabricante Ludwig Biotec de uma mistura de seis proteínas (entre 17 kDa e 100 kDa).

### 5.3.3 Determinação de proteína (Bradford)

As alíquotas selecionadas após análise do cromatograma foram submetidas ao método de Bradford (1976) para quantificação de proteínas e eletroforese das amostras dos precipitados de cada intervalo de saturação em gel de poliacrilamida a 12%, sob condições desnaturantes.

A *Figura 11* apresenta de forma resumida o procedimento adotado para extração e purificação da ricina.

Figura 11 - Fluxograma resumido do procedimento de extração e purificação da ricina.



Fonte: Do autor.

### 5.3.4 Análise da atividade enzimática específica

Para o ensaio de atividade enzimática das alíquotas obtidas durante a etapa de purificação, 0,18  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  do hsDNA desnaturado solubilizado em tampão acetato de sódio 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 4,6, foram incubados com amostras de 250  $\mu\text{L}$  do extrato bruto e das alíquotas da purificação sob agitação por 60 minutos a 25 °C. A adenina liberada durante a atividade de depurinação de ricina no hsDNA foi analisada por VOQ conforme descrito no item 5.4.4.

### 5.3.5 Cálculo do fator de purificação e rendimento (recuperação)

A eficiência de purificação é estimada pela determinação do rendimento da atividade enzimática e do fator de purificação (WOODWARD, 1990). A partir dos resultados de atividade enzimática e concentração de proteína, calculou-se a atividade específica, o fator de purificação e o rendimento (equações 11, 12 e 13):

$$\text{Atividade específica } (\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}) = \frac{\text{Atividade enzimática } (\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1})}{\text{Proteínas totais (ug)}} \quad (11)$$

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Atividade enzimática do material purificado } (\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1})}{\text{Atividade enzimática do extrato bruto } (\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1})} \quad (12)$$

$$\text{Fator de purificação} = \frac{\text{Atividade enzimática específica do material purificado } (\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1})}{\text{Atividade enzimática específica do extrato bruto } (\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1})} \quad (13)$$

### 5.3.6 Teste de citotoxicidade celular

Células HEP2 de cultura imortalizada cultivadas na sala de cultivo do laboratório de Bioquímica foram utilizadas para o teste de citotoxicidade *in vitro*.

As células foram semeadas numa placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano a uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço e deixadas em repouso para aderir na placa durante 24 horas a 37°C numa incubadora umidificada de 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por um meio fresco e então tratado com várias concentrações da ricina durante 24 horas a 37°C em atmosfera

umidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período de incubação, o meio de cultura foi novamente substituído por um meio fresco (BAHUGUNA *et al.*, 2017).

Determinou-se o número de células viáveis pelo ensaio MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}, onde avalia-se a viabilidade celular colorimetricamente, por meio da metabolização desse composto pelas mitocôndrias, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, refletindo no estado funcional da cadeia respiratória (RISS *et al.*, 2004).

Neste ensaio, adicionou-se de 10 µL de solução de trabalho MTT (5 mg.mL<sup>-1</sup> em solução tampão fosfato de sódio 2 mmol.L<sup>-1</sup>) a cada poço e incubação da placa durante 4 horas a 37°C na estufa umidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida aspirou-se o meio e os cristais formados foram solubilizados por adição de 50 µL de DMSO por poço durante 30 min a 37°C na estufa umidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, a intensidade da solução (cor púrpura) foi quantificada utilizando um leitor de placas ELISA a 540nm (Anthos Zenyth 200 rt, Biochrom, Reino Unido) (GERLIER; THOMASSET, 1986).

O valor do IC<sub>50</sub> foi obtido através de regressão não-linear de uma equação semi logarítmica aplicada aos dados de porcentagem de viabilidade em função da concentração do analito conforme equação 14.

$$Y = \frac{A1+(A2-A1)}{(1+10^{\wedge \text{Log IC50}-x})} \quad (14)$$

### 5.3.7 Teste de viabilidade em microcrustáceo

Adicionalmente, conduziu-se testes de toxicidade utilizando microcrustáceos *Artemia salina*, em que verifica-se o efeito do composto sobre a vitalidade dos organismos (SHARIFIFAR; ASSADIPOUR; MOSHAFI, 2017). Uma quantidade de 50mg de cistos de *Artemia* foi cultivada em solução salina contendo 17,98 g de sal marinho e 500 mL de água destilada por 48 horas em temperatura ambiente (25-29 °C) e em ambiente iluminado. Após a eclosão dos ovos e o tempo para as larvas alcançarem o estágio de metanúplio (24 horas), realizou-se o ensaio de

citotoxicidade de *Artemia salina* conforme o método descrito por Meyer et al, (1982) (MEYER *et al.*, 1982) com algumas modificações.

Para este bioensaio, transferiu-se um total de 10 larvas (náuplios) para cada tubo de ensaio contendo 5 mL de solução salina. Os náuplios coletados foram tratados com várias concentrações (10, 100 e 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) da amostra purificada de ricina. Sobreviventes foram contados após 24 horas e a percentagem de mortes foi determinada.

## 5.4 ENSAIOS DE ATIVIDADE DA RICINA LIVRE E COMPLEXADA A INIBIDORES

### 5.4.1 Análises Voltamétricas

Os ensaios de atividade da ricina foram realizadas com um potenciostato PG-39MSCV (Omin Metra Ltda, RJ) acoplado a bastidor com placa PCI Express (National Instruments, Inc, E.U.A.).

Para este equipamento foi utilizada uma célula eletroquímica de vidro jaquetada, com capacidade de 10 mL acoplada a um banho de circulação de água modelo Q214-SC (Quimis, São Paulo, Brasil) com programação de rampas de temperatura controlada por microprocessador. Adaptou-se a essa célula eletroquímica uma tampa de borracha, contendo orifícios para o posicionamento de três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar), orifício para injeção de amostra e orifício para desaeração da solução com nitrogênio (Linde, BR), conforme apresentado na Fotografia 1.

Fotografia 1 - Imagens equipamento e célula eletroquímica



Do autor.

Legenda: a) potenciostato/galvanostato PG-39;  
b) célula eletroquímica com arranjo de três eletrodos;  
c) Eletrodos utilizados.

#### 5.4.1.1 Preparo dos eletrodos

Foram realizados testes com um eletrodo de pasta de carbono (EPC) funcionalizado por eletroquímica de área geométrica  $4,91 \text{ mm}^2$  construídos no laboratório.

A pasta de carbono empregada no EPC, foi preparada pela mistura de pó de grafite (99,95%, malha 325, Sigma-Aldrich) e de óleo mineral. As combinações de proporções em massa 85/15, 80/20 e 75/25 (%m/m) de grafite e óleo mineral foram testadas com o intuito de obter uma pasta de composição química consistente e que proporcionasse um sinal voltamétrico sensível e reproduzível na análise de adenina e do hsDNA.

Em seguida, a mistura resultante foi compactada no orifício de um tubo de vidro conectada eletricamente a um fio de cobre. O EPC foi submetido a um procedimento de condicionamento eletroquímico por voltametria cíclica em solução tampão acetato de sódio pH 4,6 (50 mmol.L<sup>-1</sup>) em velocidade de varredura de 50 mV.s<sup>-1</sup> com variação de potencial entre -0,3 V a +1,2 V até obtenção de um voltamograma estável (aproximadamente, 40 ciclos).

Um fio de platina foi utilizado como eletrodo auxiliar e como eletrodo de referência, empregou-se tubo de vidro contendo um fio de prata recoberto com AgCl (Ag/AgCl), reaproveitado de um eletrodo combinado de vidro danificado, acoplado a uma ponteira em que, na sua extremidade foi fixada por aquecimento uma ponta de platina (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996a). O interior deste sistema foi preenchido com uma solução de cloreto de potássio 3 M saturado com cloreto de prata.

#### *5.4.1.2 Voltametria cíclica*

A transferência de elétrons da reação de oxi-redução de adenina em solução tampão acetato de sódio pH 4,6, foi caracterizada pela voltametria cíclica (VC) com taxa de varredura de 10 - 500 mV.s<sup>-1</sup> e janela potencial de +0,40 a +1,45 V.

#### *5.4.1.3 Voltametria de onda quadrada*

A adenina liberada durante a atividade de depuração da holoricina no hsDNA foi medida por voltametria de onda quadrada (VOQ). Os parâmetros de onda quadrada, como frequência da onda quadrada (f), amplitude da onda quadrada (a) e incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ), foram avaliados para obter a maior relação sinal/ruído para oxidação de adenina levando-se em consideração a estabilidade, repetibilidade e a magnitude da corrente de pico (sinal analítico). Os ensaios foram conduzidos fixando-se dois desses parâmetros em um valor constante ao medir a de outros. Os parâmetros foram estudados na faixa de 10-100 mV de amplitude, 1-10 mV de variação do incremento de varredura e 20-200 s<sup>-1</sup> para a frequência.

#### 5.4.2 Cinética enzimática

Adicionou-se ricina à célula eletroquímica contendo o eletrólito de suporte (tampão acetato de sódio, pH 4,8) sob agitação contínua a uma concentração final de [0,87 pmol]. Após um período de estabilização potenciométrica de 30 min, o hsDNA previamente desnaturado foi adicionado em concentrações variadas (0,08 - 0,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e com um intervalo de 10 minutos entre as leituras. O hsDNA desnaturado foi obtido seguindo Bevilacqua et al. (BEVILACQUA *et al.*, 2010). Resumidamente, 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  de hsDNA nativo foi dissolvido em tampão acetato de sódio 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ , aquecido em banho-maria a 95°C por 5 min, seguido de resfriamento em gelo por mais 5 min. Para a calibração analítica, a liberação de adenina foi previamente padronizada por VOQ por adições sucessivas de uma solução estoque de adenina na amostra de hsDNA usando uma micropipeta. Após cada adição, a solução foi agitada para homogeneizar sua composição antes da aquisição dos dados.

#### 5.4.3 Atividade de Ricina em Matrizes Alimentares

Alguns ensaios foram realizados com o propósito de se verificar a possibilidade de interferência de compostos inerentes à matrizes complexas, tais como leite e ovo, para a detecção de ricina.

Para minimizar os efeitos da matriz alimentar no desempenho do ensaio, as amostras de leite e ovo foram diluídas para 1:3 em tampão acetato de sódio pH 4,6 (50  $\text{mmol.L}^{-1}$ ). Sob as condições experimentais já relatadas, a ricina purificada foi adicionada em duas concentrações as matrizes de ovo e leite.

Neste ensaio, alíquotas de ricina foram adicionadas em amostras de clara de ovo e de leite e incubadas por 10 minutos a 25 °C para que a ricina pudesse ser absorvida no alimento. Em seguida, 400  $\mu\text{L}$  da mistura (matriz alimentar-ricina) foram adicionadas ao sistema eletroquímico contendo 0,18  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  do hsDNA desnaturado solubilizado em tampão acetato de sódio 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 4,6, sob agitação por 60 minutos a 25 °C. A adenina liberada durante a atividade de depuração de ricina no

hsDNA foi analisada por VOQ e comparada a um controle em mesma condição com substituição da matriz alimentar por tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 4,6.

O efeito da matriz alimentar, na presença ou ausência de ricina, foi avaliado pela atividade da toxina expressa como percentagem residual em relação ao controle em tampão.

#### 5.4.4 Determinação de adenina liberada por potenciostato portátil

Afim de se averiguar a possibilidade de implementação da detecção da atividade tóxica da ricina em campo por equipamentos portáteis interfaceados à dispositivos móveis, realizamos medidas eletroquímicas em um potenciostato portátil Sensit Smart (PalmSens, GA, Netherlands). O sistema foi constituído com um eletrodo impresso comercial de carbono, os quais consistem em um arranjo contendo os três eletrodos depositados em uma mesma placa de cerâmica de alumina (AC1.W4.R1, da PalmSens).

As medidas eletroquímicas foram realizadas por VOQ em procedimento semelhante ao executado anteriormente. Para o ensaio de atividade, 0,18 µmol.L<sup>-1</sup> do hsDNA desnaturado solubilizado em tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 4,6, foi incubado com a ricina [0,87 pmol] sob agitação e volume total da reação de 3 mL a 25 °C. Em intervalos regulares, uma alíquota de 100 µL foi retirada do sistema reacional e adicionada ao eletrodo impresso para realização da leitura.

#### 5.4.5 Determinação de adenina liberada por HPLC

Para o ensaio de atividade, 0,18 µmol.L<sup>-1</sup> do hsDNA desnaturado solubilizado em tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 4,6, foi incubado com a ricina [0,87 pmol] sob agitação e volume total da reação de 3 mL a 25 °C. Em intervalos regulares, uma alíquota de 100 µL foi retirada do sistema reacional e adicionada a um frasco de amostra para HPLC contendo uma mistura de 10 µmol.L<sup>-1</sup> de alopurinol (padrão interno) em ácido fórmico 0,1%. Em seguida, injetadas no HPLC para leitura.

Os perfis de cromatografia líquida (HPLC) foram obtidos usando equipamento Shimadzu Prominence (Tokyo, Japão) modelo LC-100 com injetor automático (40 µL)

e detector UV/VIS a 280 nm. O sistema foi equipado com coluna analítica C18 (Shimadzu CLC-ODS, 250 mm x 4,4 mm diâmetro interno x 5 µm). As análises cromatográficas foram realizadas no modo isocrático seguindo metodologia proposta por Hines et al. (HINES; BRUEGGEMANN; HALE, 2004) alterando o sistema de detecção para UV/VIS a 280nm. A fase móvel consistiu em uma solução de ácido fórmico 0,1%, a um fluxo de 1,0 ml.min<sup>-1</sup> ajustado com bomba de alta pressão. O tempo de execução do método foi de 10 min e todas as experiências foram realizadas a 25° C. A cada 10 injeções a coluna foi purgada com acetonitrila a 70% para remoção da ricina e de substrato retido.

A concentração da adenina foi calculada usando curva analítica baseada na relação de área do pico em função da concentração do padrão de adenina (0,1 – 18 µmol.L<sup>-1</sup>).

#### 5.4.6 Determinação da porcentagem de inibição enzimática

As porcentagens de inibição das moléculas controle e dos candidatos a inibidores sobre a ricina foram calculadas comparando-se o sinal eletroquímico das amostras (ensaio contendo inibidor + ricina + hsDNA) com a do controle da enzima (ensaio contendo tampão + ricina + hsDNA). Os valores correspondentes à liberação de adenina na ausência dos ligantes foram utilizados como referência à 100% da atividade da enzima. Assim, as porcentagens de inibição das amostras foram calculadas conforme a equação 15 abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = \left( \frac{\text{atividade da ricina na presença de inibidor}}{\text{atividade do controle com ricina em tampão}} \right) \times 100 \quad (15)$$

#### 5.4.7 Determinação dos valores de IC<sub>50</sub> dos compostos

Os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos através de regressão não-linear de uma equação semi logarítmica aplicada aos dados de porcentagem de inibição em função da concentração do analito conforme equação 14.

## 5.5 INTERAÇÃO DE RICINA COM INIBIDORES

Ensaio de interação proteína-ligante foram conduzidos por espectrofluorimetria para obtenção de parâmetros termodinâmicos de complexos de ricina com novos candidatos a inibidor. As análises foram efetuadas em fluorofotômetro CaryEclipse Spectro (Modelo: Varian, Austrália) utilizando-se uma cubeta de quartzo jaquetada de água com caminho ótico de 1 cm interligado a um banho de circulação de água modelo Q214-SC (Quimis, São Paulo, Brasil) utilizando microprocessador com programação de rampas de temperatura. Os dados coletados foram submetidos a temperaturas de solução constante de 288K, 298 e 308K. A temperatura da solução foi aferida por um termômetro digital MT-600 acoplado ao computador (Minipa, São Paulo, Brasil).

Para a realização dos ensaios, utilizou-se o a fração conjunta purificada de ricina com tampões pH 4,6 e pH 7, em análises separadas. Foi adicionado alíquotas para concentrações crescentes dos ligantes (Moléculas do ácido pteróico, Retro-2, 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 8) de 0 a  $2,05 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>. Após cinco minutos de incubação foi monitorado o espectro de varredura. As medições de fluorescência foram realizadas no comprimento de onda de excitação de 280 nm (FREITAS *et al.*, 2012).

A emissão de fluorescência, medida em 90 graus em relação ao feixe de excitação, foi registrada em comprimento de onda 290-500 nm.

Os espectros utilizados no trabalho foram obtidos a partir da média de três espectros para cada experimento. A análise dos dados foi realizada tomando como base a equação de Van't Hoff descrita a seguir (GORE, 2000). Utilizando Kb, a energia de Gibbs ( $\Delta G$ ) pode ser estimada a partir da equação 16.

$$\Delta G = -RT \ln Kb \quad (16)$$

A equação de van't Hoff é derivada da equação 17 para cálculo da energia de Gibbs.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (17)$$

Igualando e rearranjando as Equação 16 e Equação 17, obtemos a equação de van't Hoff (Equação 18) (GORE, 2000).

$$\ln k_b = - \left( \frac{\Delta H}{R} \right) \left( \frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta S}{R} \quad (18)$$

A equação de Van't Hoff constitui uma representação linear em que um gráfico  $\ln K_b$  versus  $\frac{1}{T}$  produz uma linha reta com inclinação  $\frac{-\Delta H}{R}$  e intercepto  $\frac{\Delta S}{R}$ , desde que não haja alteração na capacidade calorífica em função dos limites de temperatura utilizados.

### 5.5.1 Ensaio de fluorescência síncrona

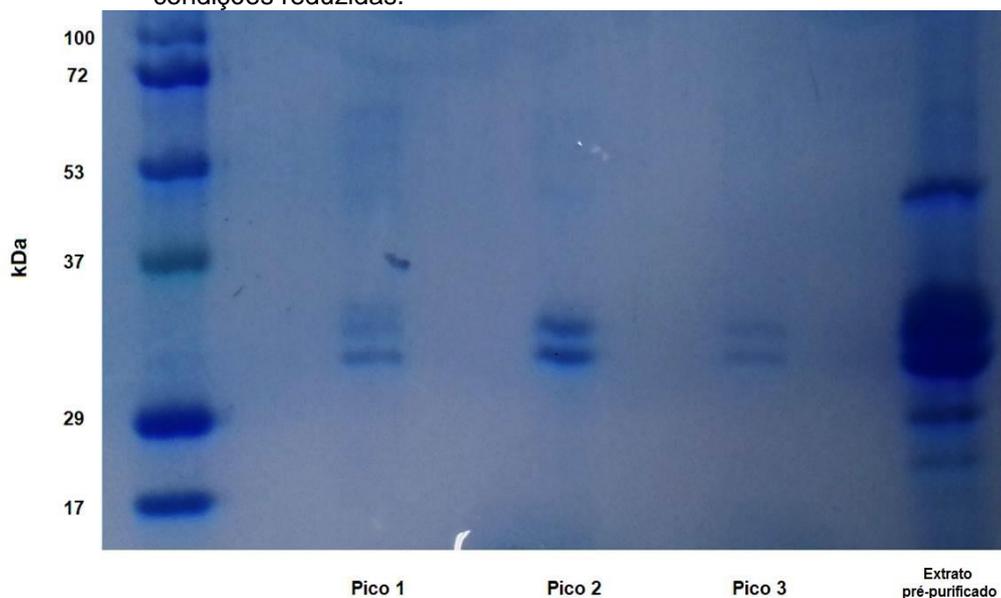
O ensaio de fluorescência síncrona da interação de ricina com novos ligantes foi realizado utilizando o mesmo procedimento descrito no item anterior. A faixa de espectro sincronizada foi de  $\Delta\lambda = 15$  nm e  $\Delta\lambda = 60$  nm, característicos dos resíduos de tirosina e triptofano presentes na proteína, respectivamente.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 ISOLAMENTO DE RICINA

As frações proteicas eluídas do extrato pré-purificado da ricina em gel de filtração Sephadex G-50 foram lidas em espectrofotômetro Libra S22 UV/Vis a 280 nm. Para essa etapa, observou-se apenas uma fração de maior intensidade no perfil espectrofotométrico. A seguir, realizamos a análise por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE), e tratadas com 2-mercaptoethanol para eletroforese em condição reduzida, para a fração de maior intensidade (extrato pré-purificado, *Figura 12*). A análise revelou a presença das subunidades RTA e RTB referente à ricina (SEHGAL *et al.*, 2010), entretanto, observa-se a presença de contaminantes de menor intensidade nas regiões de 17-29 kDa, e 37-53 kDa.

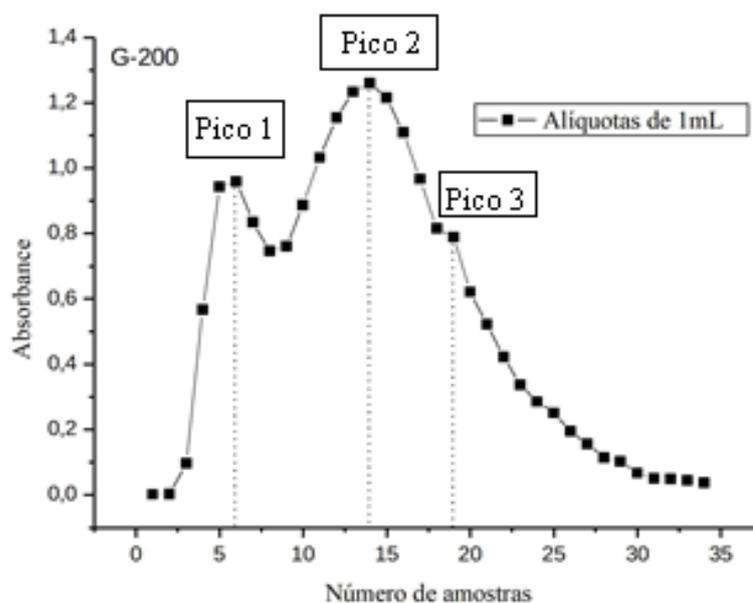
Figura 12 - Purificação e caracterização da ricina, SDS-PAGE (12%) de ricina purificada sob condições reduzidas.



Fonte: Do autor.

A fração obtida por cromatografia em Sephadex G-50 foi submetida a uma nova cromatografia em Sephadex G-100. Assim, observou-se três frações no perfil espectrofotométrico, das frações de 6 mL (pico 1), 14 mL (pico 2) e 19 mL (pico 3) (Figura 13).

Figura 13 - Perfil espectrofotométrico das frações de ricina obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex G-100.



Fonte: Do autor.

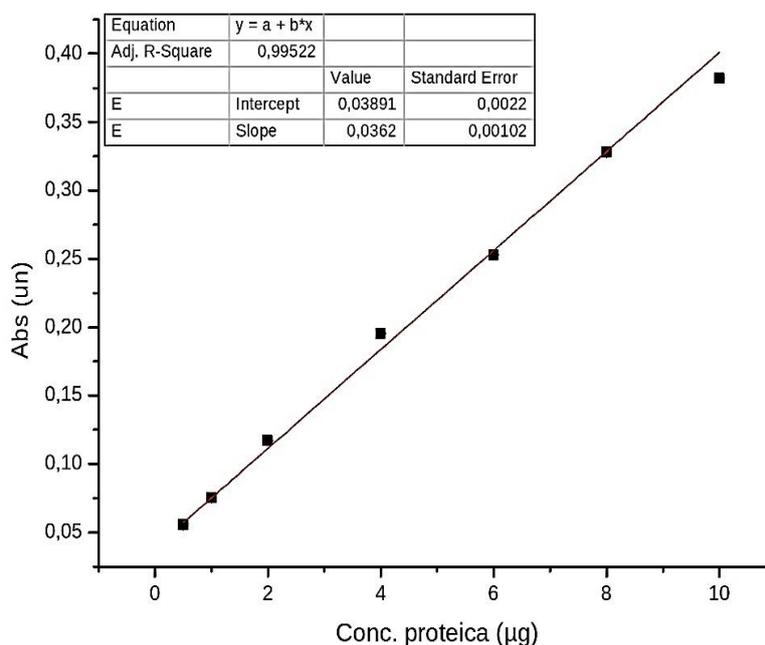
As frações dos picos provenientes da purificação pela coluna cromatográfica utilizando-se gel de filtração Sephadex G-100 também foram submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo observado a presença da proteína ricina nos três picos principais (pico 1, 2 e 3) (Figura 12).

Nota-se no pico 1 um arraste de proteínas de PM entre 37 a 53 kDa e 53 a 72 kDa. O pico 2 é o que apresentou a maior resolução das bandas proteicas referentes a cadeia A e cadeia B da ricina, embora indistinguíveis pelo método. Já o pico 3, manteve-se com apenas duas bandas, porém de menor intensidade quando comparado ao pico 2.

A dosagem espectrofotométrica referente ao método de Bradford (1976) foi realizada para acompanhar o processo de purificação. A partir dos valores da absorbância para concentrações conhecidas de BSA (0,5 a 10  $\mu\text{g}$  de proteína. $\text{mL}^{-1}$ ), obtidas em espectrofotômetro a 595 nm, foi construída uma curva analítica (Figura 14).

Fonte: Do autor.

Figura 14 - Método de Bradford com curva-padrão em albumina sérica bovina (BSA).



De acordo com a equação da reta, foi possível determinar a concentração de proteínas ( $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) provenientes das alíquotas cromatográficas. A concentração final

estimada para as frações resultantes da segunda etapa de purificação podem ser vistas na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração de proteína ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) referente aos picos cromatográficos

Amostra Cromatográfica	Proteína ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
Pico 1	17,22 +/- 0,92
Pico 2	23,00 +/- 1,03
Pico 3	10,15 +/- 0,41

Fonte: Do autor.

Conforme os resultados obtidos nas corridas eletroforéticas, onde o pico 1 não apresentou pureza satisfatória, reunimos em um “pool” os picos 2 e 3, obtendo-se por nova dosagem espectrofotométrica uma concentração final de  $17,03 \pm 0,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Procedeu-se com os demais testes deste trabalho a partir desta alíquota denominada ricina purificada.

#### 6.1.1 Etapas de purificação da amostra

Os valores de atividade enzimática, concentração de proteínas, atividade específica, fator de purificação e rendimento foram calculados e apresentados na

Tabela 2. Os resultados obtidos representam os desempenhos gerais de cada etapa.

A atividade total diminuiu à medida que o processo de purificação foi ocorrendo, enquanto a atividade específica foi elevada em cento e quatorze vezes. Não encontramos reportados na literatura dados sobre a atividade específica e fator de purificação da ricina obtida a partir de sementes de mamona.

Tabela 2 - Etapas de purificação da ricina

Etapa de Purificação	Proteínas Totais ( $\mu\text{g}$ )	Atividade Total $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$	Atividade Específica $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$	Fator de Purificação Veze	Recuperação (%)
Extrato bruto	1094,8	2,6	0,0024	1,0	100,0
Sulfato de Amônio (60%)	370,9	2,2	0,0059	2,4	82,6
Extrato pré purificado (Sephadex G-50)	20,6	1,5	0,0726	30,0	56,6
Amostra purificada (Sephadex G-100)	4,6	1,3	0,2782	114,9	48,3

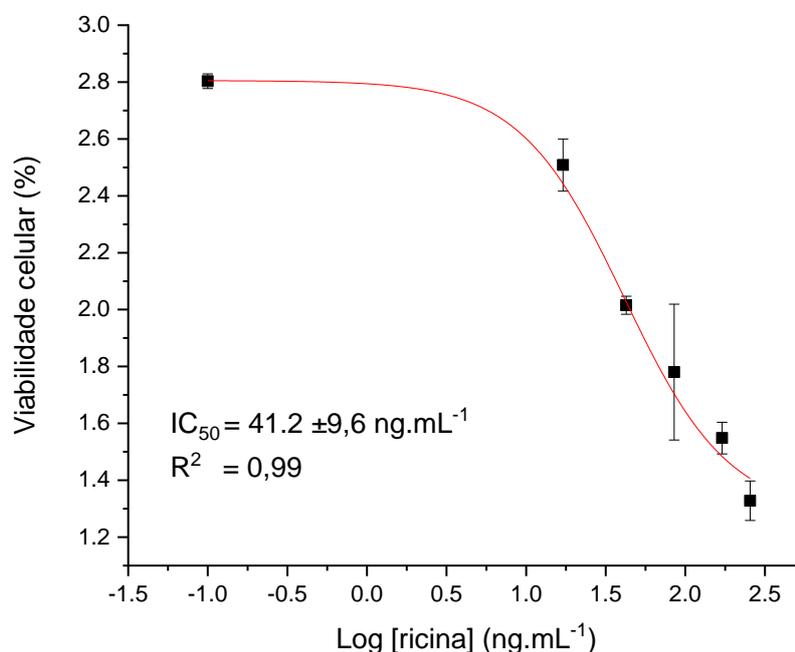
Fonte: Do autor.

Utilizando esse procedimento de purificação, obteve-se uma recuperação de 48,3%, com fator de purificação de 114,9 vezes e atividade específica aproximada de  $0,28 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$  (Tabela 2).

### 6.1.2 Citotoxicidade celular

Utilizamos o ensaio MTT para determinar o efeito citotóxico da mistura ricina (fração F2 e F3) nas células HEP2 (*Figura 15*). Nos ensaios de determinação da viabilidade celular foi verificado que as células utilizadas são sensíveis a proteína ricina.

Figura 15 - Curva dose-resposta e valor de IC<sub>50</sub> do tratamento das células HEP2 incubadas por 48 horas, e com diferentes concentrações de ricina purificada.



Fonte: Do autor.

Os resultados demonstraram a potência da ricina purificada frente a células HEP2 com um valor de IC<sub>50</sub> de 41,2 ng.mL<sup>-1</sup>, sugerindo que a ricina afeta a viabilidade das células de maneira dependente da dose. De fato, a literatura reporta valores de IC<sub>50</sub> para isoformas da ricina em linhagem celular Vero entre 8 a 60 ng.mL<sup>-1</sup> (SEHGAL *et al.*, 2010) e de 5,2 a 34,1 ng.mL<sup>-1</sup> para células cancerígenas (NGO *et al.*, 2016).

### 6.1.3 Citotoxicidade em *Artemia salinas*

O ensaio de toxicidade utilizando microcrustáceos *Artemia Salina* foi também utilizado para verificar a citotoxicidade da amostra de Ricina. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

De acordo com os resultados (Tabela 3), a ricina exibiu citotoxicidade crescente relacionadas ao aumento das concentrações utilizadas no ensaio.

Tabela 3 - Ensaio de toxicidade em *Artemia salinas*

	Concentração do tratamento (nmol.L <sup>-1</sup> )	n° microrganismos viáveis após 24 horas			média n° microrganismos após 24 horas
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3	
controle	0	9	8	9	8,67 +/- 0,82
Tratamento 01	20,5	3	6	4	4,33 +/- 2,16
Tratamento 02	40,1	2	1	2	1,67 +/- 0,82

Fonte: Do autor.

Nessa parte do trabalho, avaliou-se o isolamento da ricina a partir de sementes de mamona e sua citotoxicidade frente a células HEP2 e viabilidade em microcrustáceo *Artemia salinas*.

O resultado obtido na aplicação das frações cromatográficas no gel de eletroforese indicando a presença das cadeias A e B e a potência da ricina frente a células HEP2 com IC<sub>50</sub> de 41,2 ng.mL<sup>-1</sup> comprovou que o método de extração para a toxina foi realizado com sucesso. O aumento da atividade específica em relação ao extrato bruto com valores de fator de purificação elevados para ensaios de purificação de proteínas (WOODWARD, 1990), também corroboram com a hipótese de eficiência do ensaio de purificação.

Em resumo, embora existam procedimentos para a purificação de ricina com utilização de outras metodologias ou matérias, tais como técnicas de cromatografia por afinidade (DORSEY; EMMETT; SALEM, 2015), a metodologia utilizada neste trabalho para purificação da ricina permitiu obter-se amostras com pureza suficiente para os próximos ensaios.

## 6.2 CATÁLISE ENZIMÁTICA DE RICINA

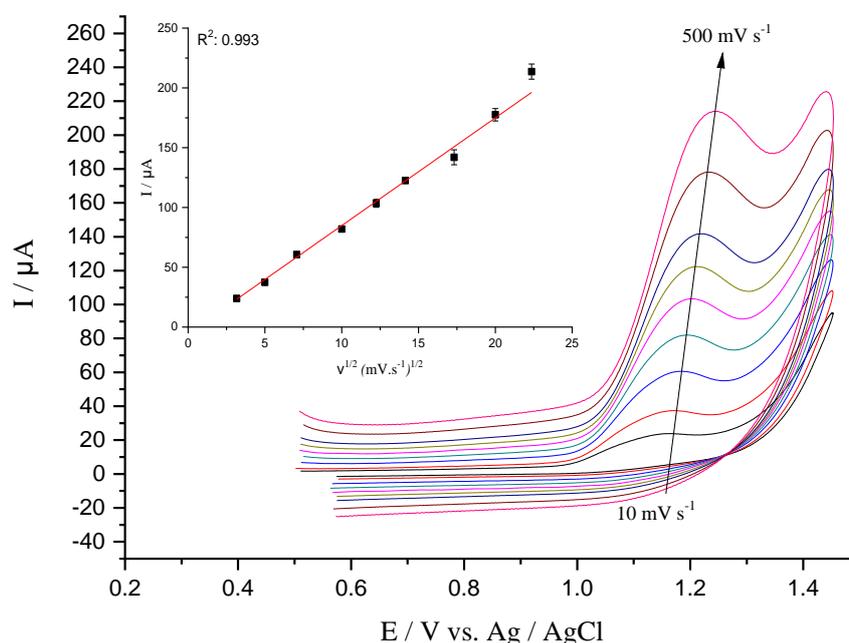
### 6.2.1 Voltametria Cíclica da Adenina

Estudos preliminares foram realizados para verificar a resposta eletroquímica da adenina no eletrodo EPC. Das combinações de proporções em massa 85/15, 80/20e 75/25 (%m/m) de grafite e óleo mineral testadas para confecção do eletrodo,

a que apresentou melhor desempenho foi com 75/25 (%m/m) de grafite e óleo mineral. Os resultados estão disponíveis no Anexo C – Material Suplementar.

A Figura 16 mostra o efeito da taxa de varredura na faixa de 10 a 500  $V.s^{-1}$  na corrente de oxidação da adenina a  $25 \mu mol.L^{-1}$  em tampão acetato de sódio (pH 4,6) registrado de +0,40 a +1,40 V vs Ag / AgCl (sat. KCl).

Figura 16 - VC de  $25,0 \mu mol.L^{-1}$  de adenina a taxas de varredura de 10-500  $mV.s^{-1}$  em EPC pH 4,6.



Fonte: Do autor.

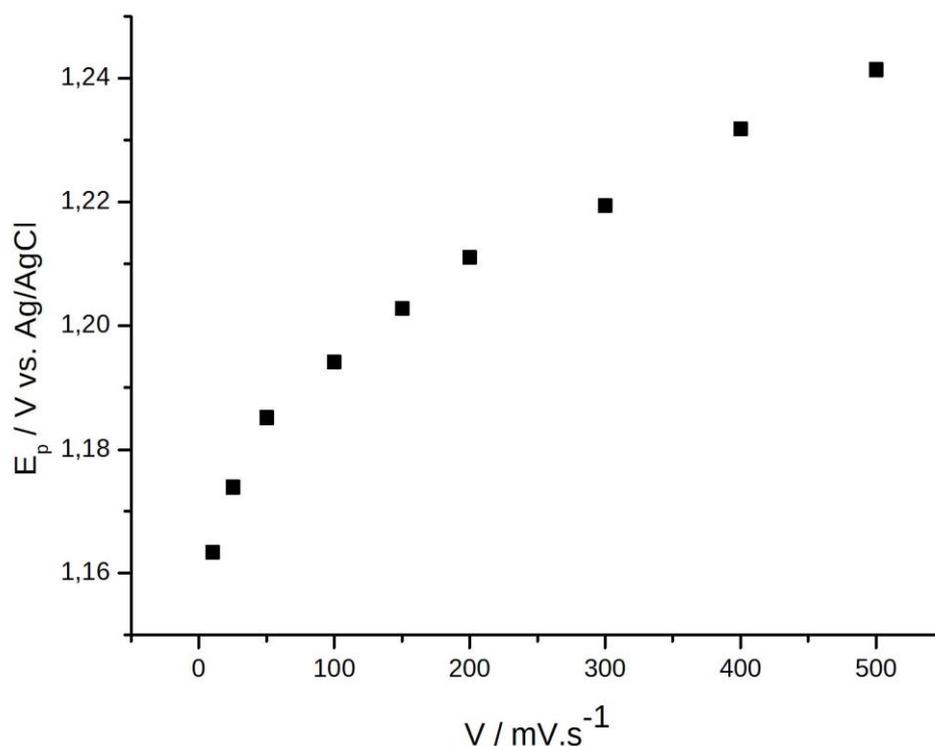
Legenda: Inseto - Representação de Randles-Ševčík da corrente de pico da adenina *versus* a raiz quadrada da taxa de varredura.

A análise do voltamograma cíclico (correntes e potenciais de pico) fornece a base para os diagnósticos de reversibilidade, *quasi* reversibilidade e irreversibilidade do sistema voltamétrico (ELGRISHI *et al.*, 2018; WANG, J., 2000). Um pico de oxidação pode ser observado a +1,20 V para a velocidade de varredura de 200  $mV.s^{-1}$ , enquanto a ausência de um pico de redução na varredura reversa indica uma oxidação eletroquímica irreversível da adenina na EPC (Figura 16).

O estudo de variação da velocidade de varredura também possibilita a coleta de informações sobre a reversibilidade do sistema eletroquímico. De acordo com Wang (WANG, J., 2000), sistemas totalmente irreversíveis também são

caracterizados por um deslocamento do potencial de pico com a taxa de varredura. A seguir, apresentamos a variação do potencial de pico em função da velocidade de varredura do potencial (*Figura 17*).

Figura 17 - Variação do potencial de pico ( $E_p$ ) em função da velocidade de varredura de potencial para a adenina  $25,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ .



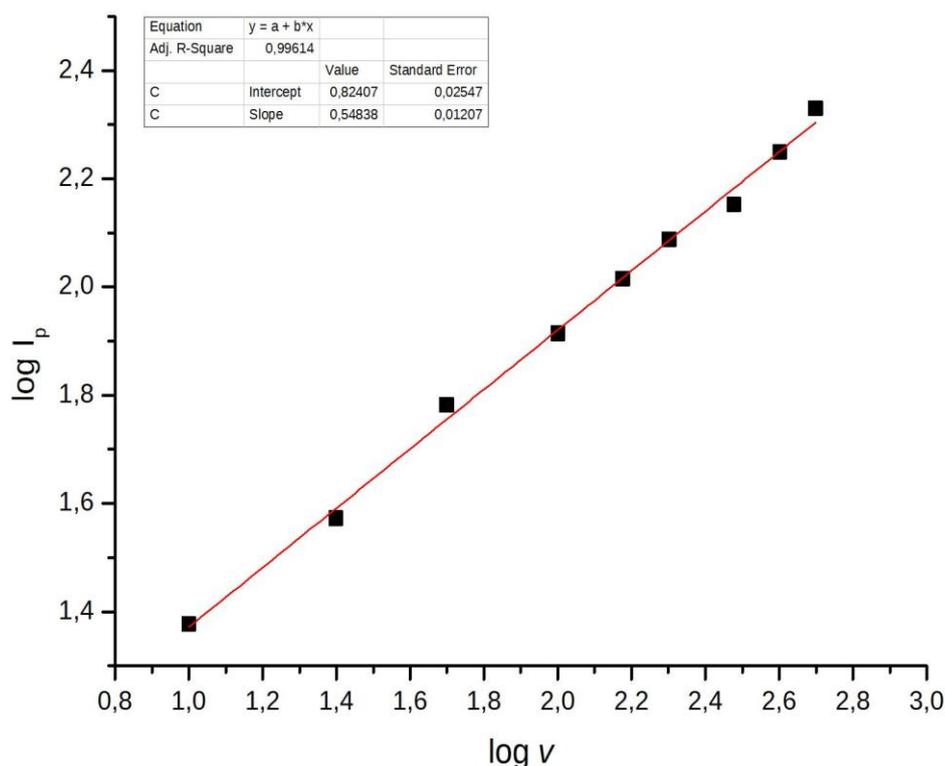
Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais com eletrólito de suporte acetato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 4,6 e eletrodo de trabalho EPC.

Desta forma, o diagnóstico apresentado na *Figura 17*, indica um deslocamento de  $E_p$  para potenciais mais positivos com o aumento da velocidade de varredura, corroborando com a hipótese de um sistema irreversível. O resultado está coerente com ensaios realizados por outros autores que estudaram as reações redox envolvendo a adenina e concluíram que trata-se de um sistema irreversível (CHANG *et al.*, 2016; ENSAFI *et al.*, 2013; HABIBI; JAHANBAKHSHI, 2016; ZHANG, J. *et al.*, 2019).

A corrente de pico de oxidação da adenina contra a taxa de varredura mostrou-se linear (*Figura 16*, inserção), sugerindo que a reação é controlada por difusão (BARD; FAULKNER, 2000). Adicionalmente, avaliou-se também a relação entre o logaritmo da corrente de pico de oxidação ( $\log I_p$ ) pelo logaritmo da velocidade de varredura de potencial ( $\log v$ ) como apresentado na *Figura 18*. A literatura reporta que valores de inclinação próximos a 0,50 para um ajuste linear, indicam que o processo de transporte de massa presente no sistema é predominantemente dado por difusão, enquanto valores de coeficiente angular próximos de 1,0 relacionam-se com processo controlado por adsorção (BARD; FAULKNER, 2000).

Figura 18 - Variação do logaritmo da corrente de pico de oxidação ( $\log I_p$ ) versus o logaritmo da velocidade de varredura de potencial ( $\log v$ ) para a adenina  $25,8 \mu\text{mol L}^{-1}$



Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais com eletrólito de suporte acetato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 4,6 e eletrodo de trabalho EPC.

A relação logarítmica de corrente com a taxa de varredura apresentou um valor de inclinação de 0,54, corroborando a observação de natureza controlada por difusão

para a reação e com uma contribuição mínima da adsorção (BARD; FAULKNER, 2000).

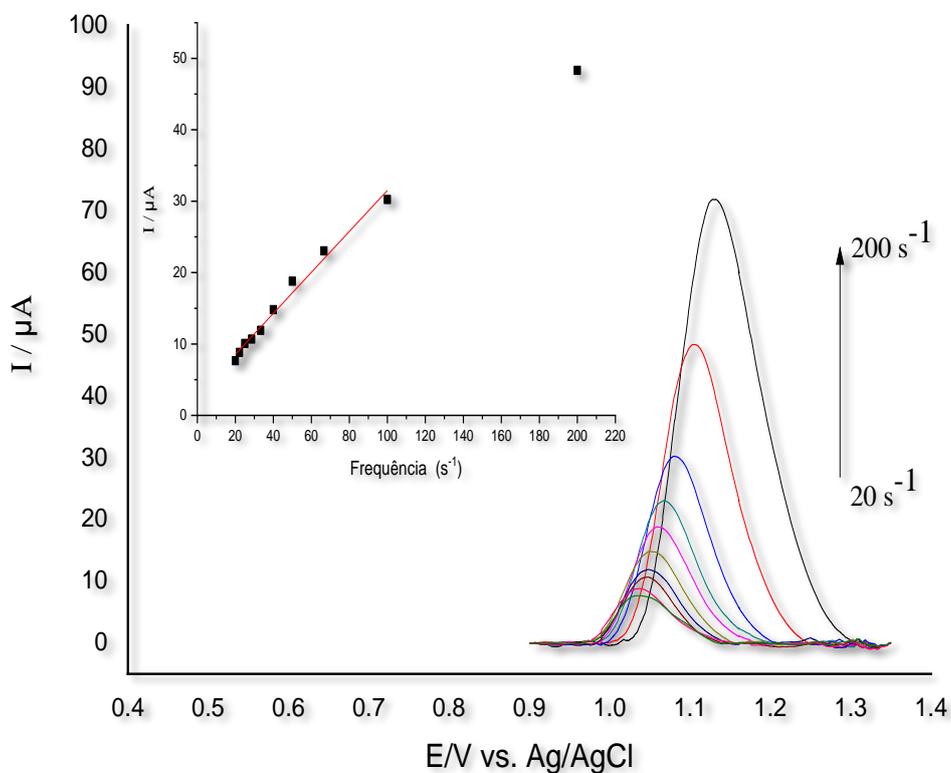
### 6.2.2 Voltametria de onda quadrada (VOQ).

A VOQ foi escolhido devido à sua alta seletividade e sensibilidade para a determinação da adenina (MANIKANDAN; DEEPA; NARAYANAN, 2019). A seguir, avaliamos os parâmetros de onda quadrada, como frequência da onda quadrada ( $f$ ), amplitude da onda quadrada ( $a$ ) e incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ) na obtenção do sinal eletroquímico para a adenina.

### 6.2.3 Influência da frequência ( $f$ )

A frequência da onda quadrada é um dos mais importantes parâmetros da VOQ, pois é ela que determina a intensidade dos sinais e, conseqüentemente, a sensibilidade do método (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996b). A seguir, apresentamos a influência da variação da frequência da onda quadrada no sinal analítico da adenina (*Figura 19*).

Figura 19 - Influência da variação da frequência da onda quadrada para adenina  $25,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$



Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais com eletrólito de suporte acetato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 4,6 e eletrodo de trabalho EPC,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ .  
Frequências: 20-200  $\text{s}^{-1}$ .

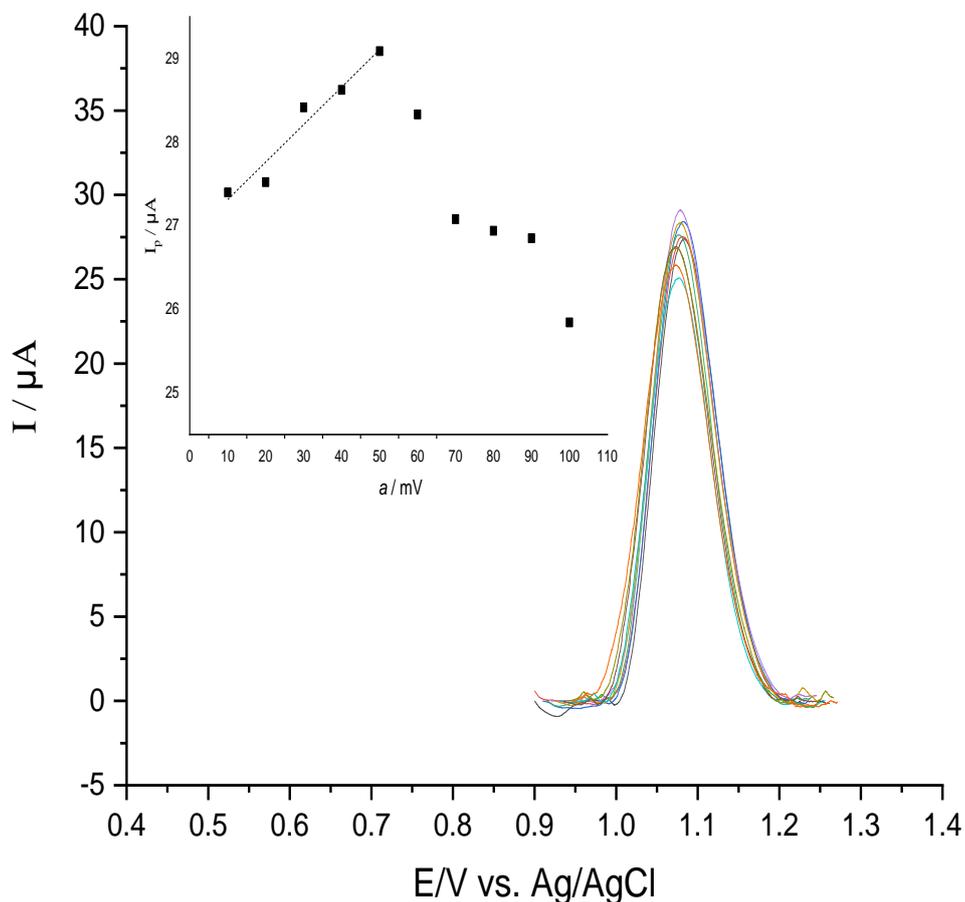
Inserção - Dependência da corrente de pico com a frequência para adenina.

A Figura 19 mostra uma proporcionalidade da corrente de pico com o aumento no valor da frequência até  $100 \text{ s}^{-1}$ , além de um deslocamento dos potenciais de pico para regiões mais positivas.

#### 6.2.4 Influência da amplitude (a)

A amplitude de aplicação dos pulsos de potencial também influencia nos valores obtidos para a corrente de pico. A Figura 20 mostra o efeito da variação da amplitude na corrente de pico para adenina.

Figura 20 - Influência da variação de amplitude da onda quadrada para a  $25,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$



Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais com eletrólito de suporte acetato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 4,6 e eletrodo de trabalho EPC,  $a = 0 - 100 \text{ mV}$ ,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ .

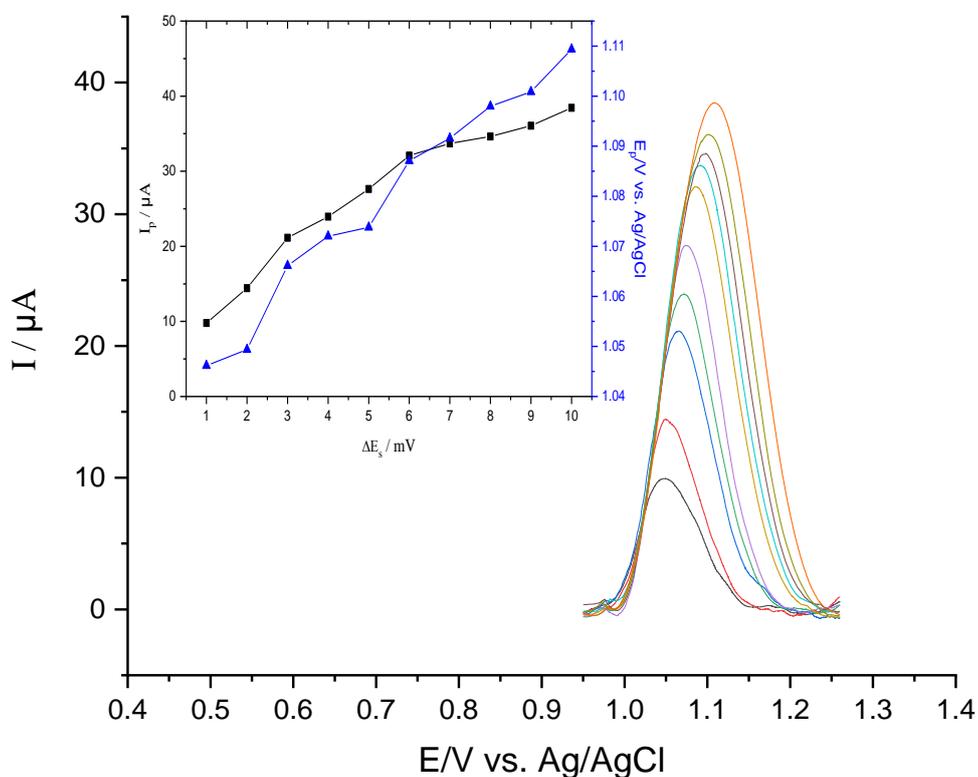
Inserção - Dependência da corrente de pico com a variação de amplitude da onda quadrada para a adenina.

Os resultados apresentam respostas lineares no aumento da intensidade de corrente até 50 mV de amplitude, sendo assim, amplitudes maiores parecem causar decréscimo no valor do sinal analítico.

### 6.2.5 Efeito do incremento de varredura ( $\Delta E_s$ )

O  $\Delta E_s$  é um parâmetro que também deve ser analisado. O efeito do incremento de varredura maior pode aumentar o sinal obtido; entretanto, também pode provocar perda de resolução do voltamograma por alargamento nos picos obtidos (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). Desta forma, também avaliamos o efeito da variação do incremento de varredura sobre as correntes e potenciais de pico para a adenina (Figura 21).

Figura 21 - Efeito da variação do incremento de varredura sobre as correntes e potenciais de pico para a adenina  $25,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$



Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais com eletrólito de suporte acetato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 4,6 e eletrodo de trabalho EPC,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta E_s = 1 - 10 \text{ mV}$ .

Inserção - Dependência da corrente de pico e do potencial de pico com a variação do incremento de varredura para a adenina.

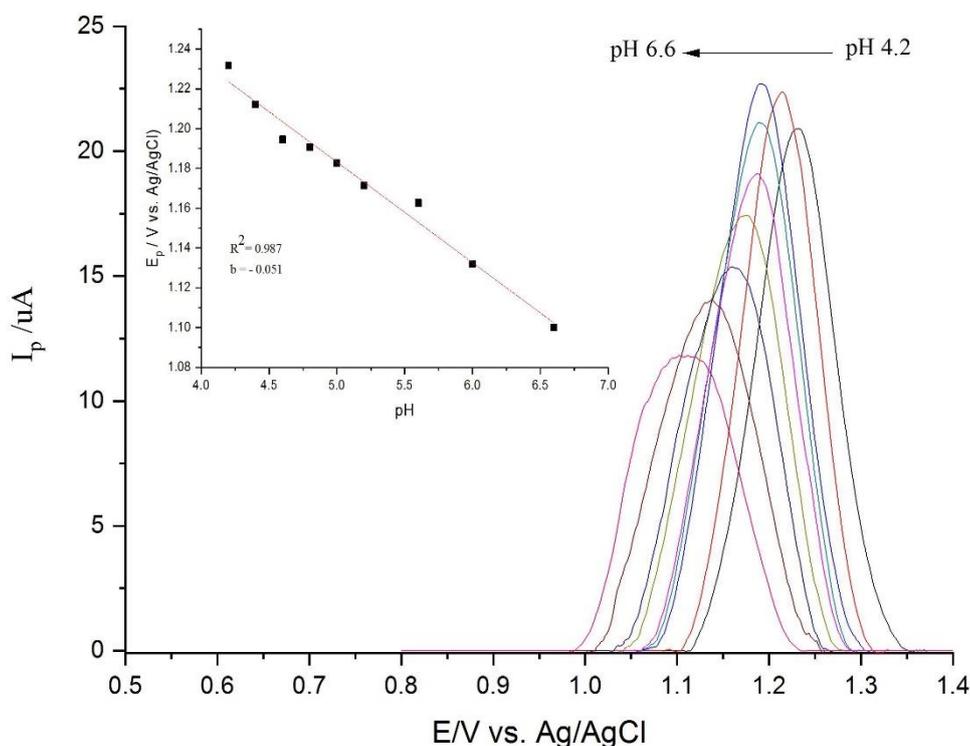
Observa-se que, com o aumento do incremento de varredura, ocorreu um deslocamento do potencial de pico para região mais positiva e em conjunto, um aumento da intensidade de corrente.

Em resumo, a dependência da corrente de pico com parâmetros de onda quadrada foi estudada na faixa de 10-100 mV de amplitude, 1-10 mV de variação do incremento de varredura e 20-200 s<sup>-1</sup> para a frequência. Os valores ótimos resultantes para amplitude, variação do incremento de varredura e frequência, foram 5 mV, 50 mV e 100 Hz, respectivamente.

### 6.2.6 Efeito do pH na eletro-oxidação da adenina

A influência do pH nos sinais voltamétricos para oxidação de adenina no eletrodo de pasta de carbono foi estudada em solução tampão acetato de sódio na faixa de pH de 4,2 a 6,6 por VOQ (Figura 22).

Figura 22 - VOQ de oxidação de adenina 25,0  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  a diferentes valores de pH.



Fonte: Do autor.

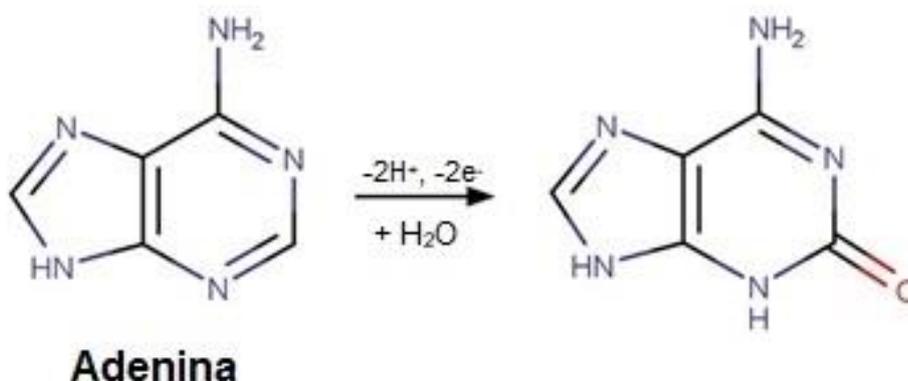
Legenda: Condições experimentais com eletrólito de suporte acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 4,2-6,6 e eletrodo de trabalho EPC, a = 50 mV, f = 100 s<sup>-1</sup>, ΔEs = 5 mV.

Inserção - correntes de pico em relação aos valores de pH.

Observou-se que o pico de oxidação da corrente da adenina aumentou com o pH de 4,2 para 4,6 e, em seguida, seguindo-se uma diminuição gradual do sinal em pH de 4,6 para 6,6, conforme a inserção da *Figura 22*. A corrente de pico mais alta foi obtida com pH 4,6, valor selecionado para as análises subsequentes.

A dependência do potencial de pico (Ep) para a oxidação da adenina com o pH da solução tampão também foi examinada. Como pode ser mostrado na *Figura 22*, o pico de oxidação mudou para valores positivos com a diminuição do pH. Também foi observada uma relação linear com uma equação de ajuste de:  $E(V) = -0,051\text{pH} + 1,44$  ( $R^2 = 0,987$ ). De acordo com a relação de Nernst, uma inclinação de 0,051 V/pH é característica de um processo que envolve o mesmo número de prótons H<sup>+</sup> e elétrons (HABIBI; JAHANBAKHSI, 2016). De fato, o mecanismo de eletro-oxidação da guanina e da adenina parece envolver uma única razão elétron: próton, conforme relatado por Zhang, et al. (ZHANG, S. *et al.*, 2019), na faixa de valores de pH de 3,0 a 8,0. A *Figura 23* mostra o provável mecanismo de eletro-oxidação de adenina na faixa de pH de 4,2 a 6,6.

Figura 23 - Mecanismo de eletro-oxidação da adenina na faixa de pH de 4,2 a 6,6

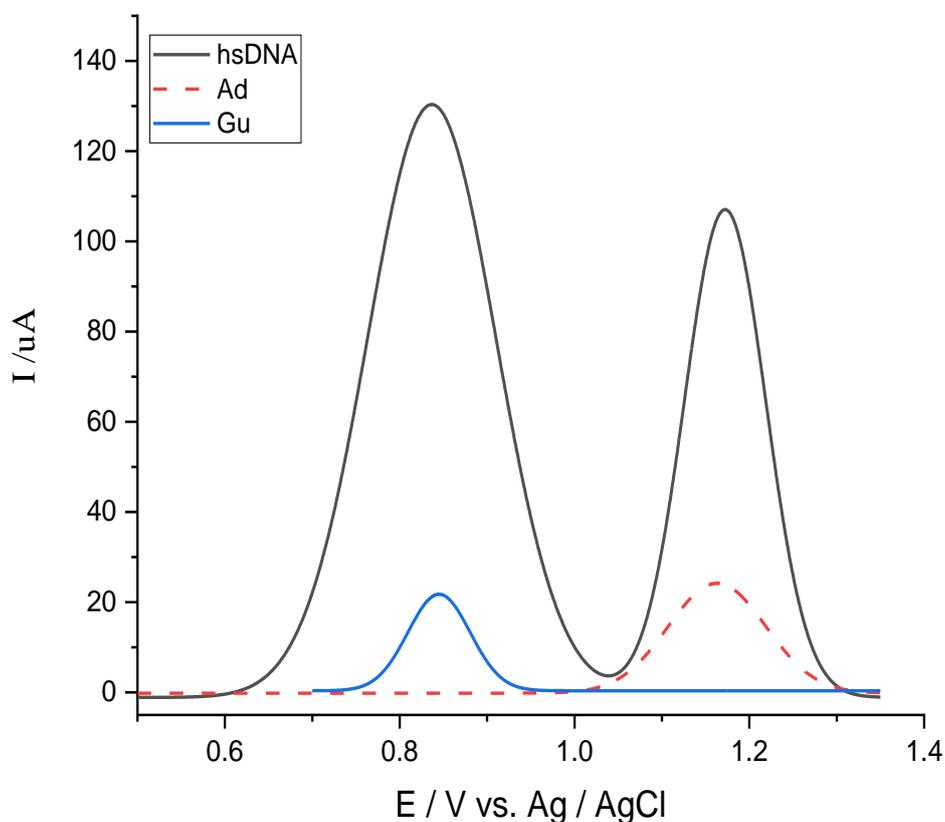


Fonte: Do autor.

### 6.2.7 Eletro-oxidação de hsDNA por VOQ

Considerando a capacidade do eletrodo EPC em detectar tanto a adenina quanto a guanina em solução aquosa, comparamos o sinal amperométrico obtido com amostras em separado de adenina e de guanina na concentração de  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  com o hsDNA hidrolizado com HCl  $25 \text{ mmol.L}^{-1}$  (Figura 24).

Figura 24 - Resposta da VOQ para  $0,08 \mu\text{mol.L}^{-1}$  hsDNA hidrolisado,  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de Ad e  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de Gu



Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais com eletrólito de suporte acetato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 4,6 e eletrodo de trabalho EPC,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ .

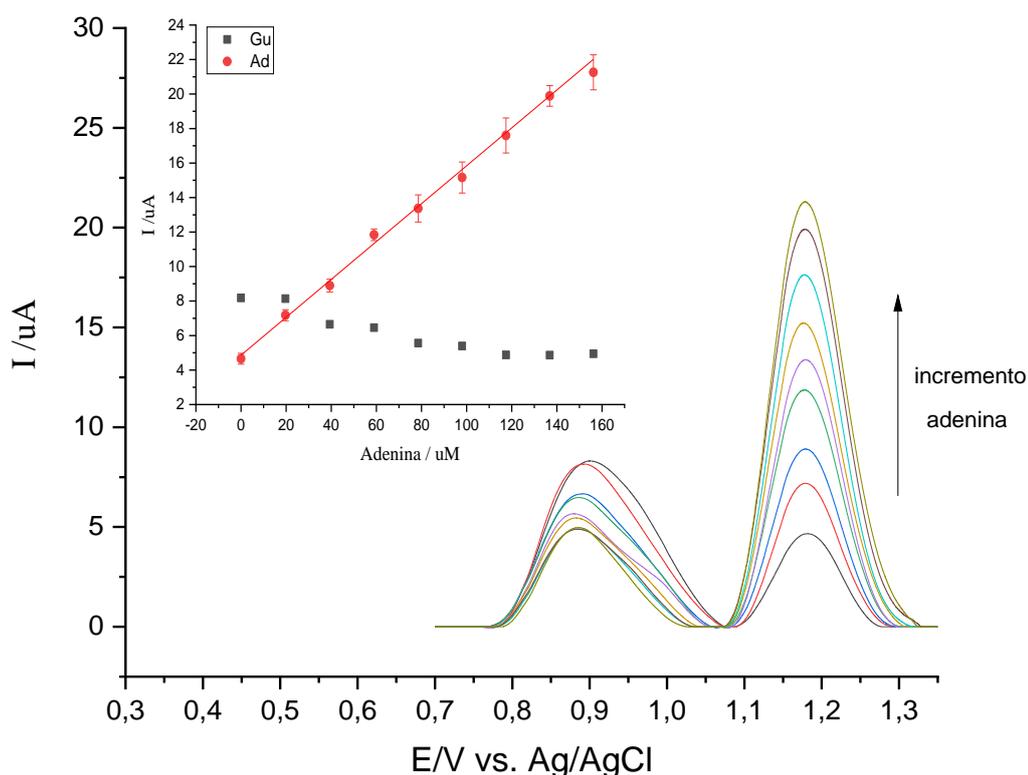
Os resultados mostraram dois picos muito distintos provavelmente atribuídos à oxidação dos resíduos Gu e Ad para o hsDNA hidrolisado (Figura 24). Isso é confirmado pela similaridade com a resposta eletroquímica obtida para amostras padrão em separado de guanina e adenina no eletrodo EPC em tampão acetato (pH 4,6). Os

valores de  $E_p$  encontrados neste trabalho para Ad e Gu foram próximos aos encontrados por Karimi-Maleh com hsDNA (KARIMI-MALEH *et al.*, 2018).

### 6.2.8 Curva analítica

Sob as condições ideais atingidas, uma curva analítica foi obtida por adições sucessivas de uma solução padrão de adenina à solução de eletrólito de suporte contendo amostras de hsDNA. A curva analítica da adenina em concentrações variadas dopadas na solução de hsDNA a  $0,17 \mu\text{mol.L}^{-1}$  é mostrada na *Figura 25*.

Figura 25 - VOQ para concentrações variáveis de Ad na faixa de  $0-160 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em hsDNA ( $0,17 \mu\text{mol.L}^{-1}$ )



Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais com eletrólito de suporte acetato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 4,6 e eletrodo de trabalho EPC,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ . A seta representa concentrações crescentes de adenina.

Inserção: curva analítica de Ad e corrente de pico de oxidação de Gu.

Para se determinar os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) frente ao eletrodo EPC, realizamos 10 medidas da corrente no potencial de oxidação da adenina. A partir do desvio padrão da média, calculou-se os limites através das equações 19 e 20.

$$LD = \frac{3(\text{desvio padrão})}{\text{inclinação da reta}} \quad (19)$$

$$LQ = \frac{10(\text{desvio padrão})}{\text{inclinação da reta}} \quad (20)$$

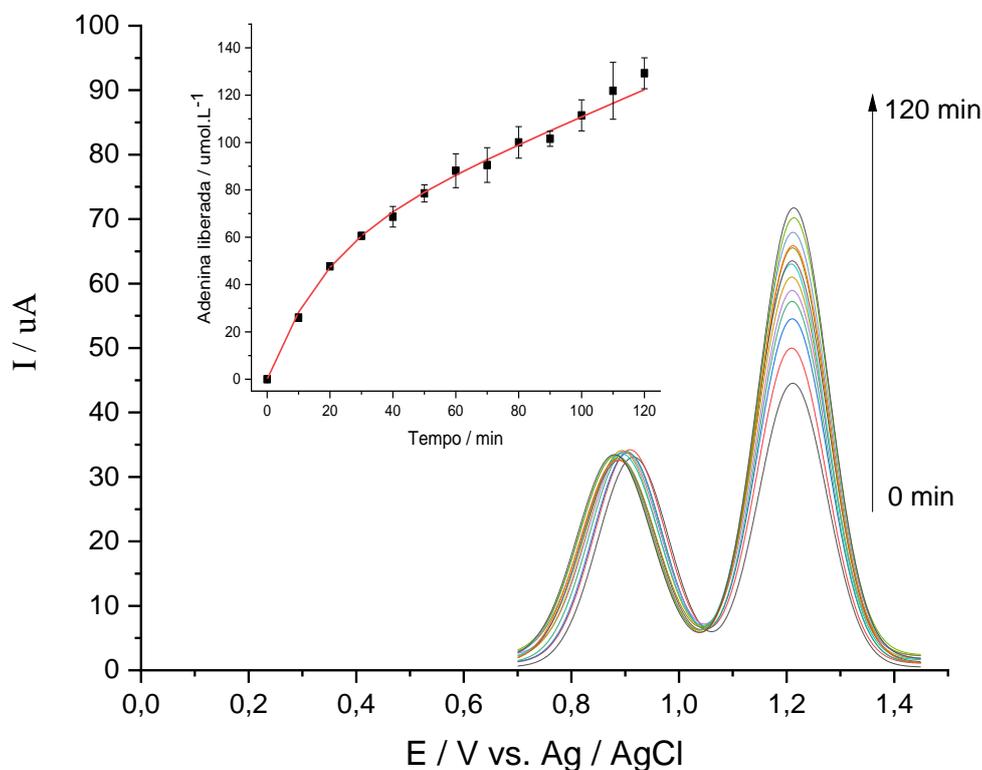
As correntes de pico da adenina dopada na solução de hsDNA aumentaram linearmente com concentrações na faixa de 0,1 a 160  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (inserção *Figura 25*), com um limite de detecção de 0,19  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , limite de quantificação de 0,65  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , e uma equação de regressão de:  $I_p (\mu\text{A}) = 0,113 (\pm 0,005) C (\mu\text{M}) + 4,80 (\pm 0,15)$ ,  $R^2 = 0,996$ .

O aumento da concentração de adenina, causou perturbação na corrente do pico de oxidação da guanina, provocando diminuição do  $I_p$  com tendência a estabilidade após a metade do ensaio. Avaliamos para o ocorrido, não haver interferência no sinal obtido para a adenina, que é o foco das medidas experimentais deste trabalho.

#### 6.2.9 Depuração de hsDNA com ricina por VOQ

A liberação de adenina obtida a partir da atividade catalítica de 0,87 pmol de ricina em 0,50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de hsDNA foi seguida por VOQ, e os dados foram registrados durante 120 minutos e em intervalos de 10 minutos (*Figura 26*).

Figura 26 - Cinética da liberação de adenina a partir de  $0,50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de hsDNA catalisada por ricina a  $0,87 \mu\text{mol}$



Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais com eletrólito de suporte acetato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 4,6 e eletrodo de trabalho EPC,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ .

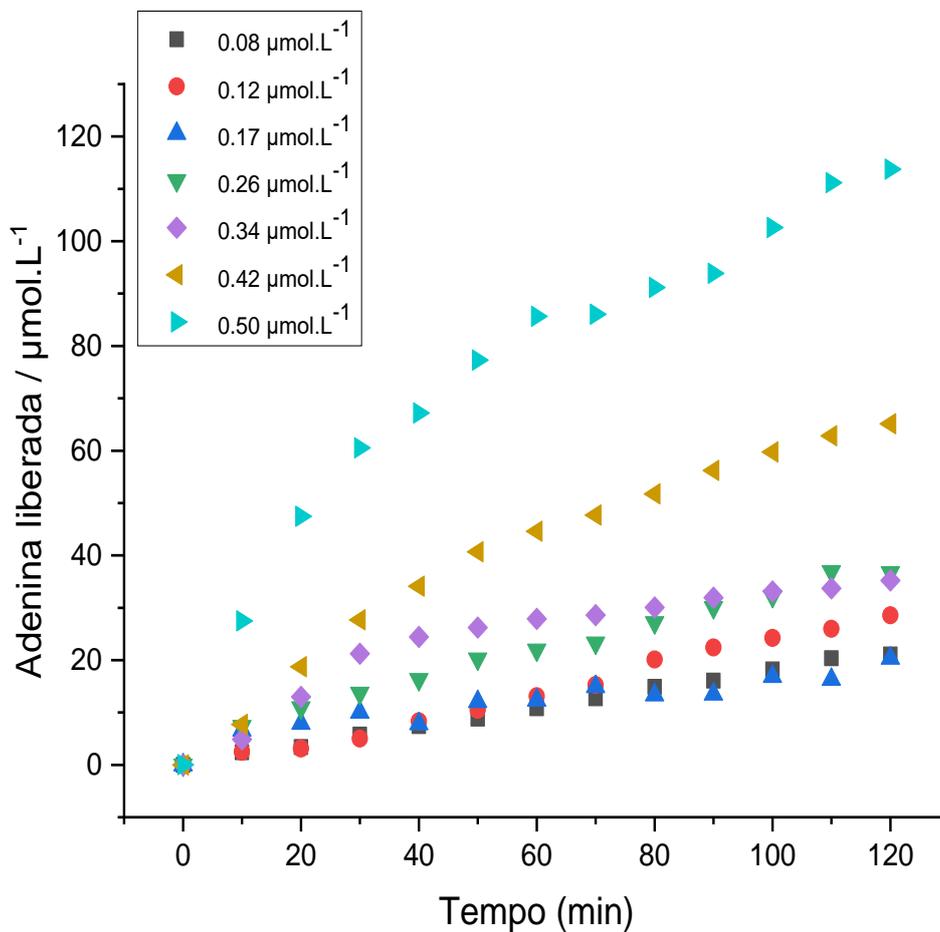
Inserção: liberação de adenina dependente do tempo e o ajuste no estado pré-estável.

A curva progressiva mostrada na *Figura 26* sugere que a liberação de adenina mediada por ricina exibiu um comportamento bifásico de catálise, com um estado pré-estável anterior à cinética de Michaelis-Menten, e a reação geral dependente da concentração do substrato (*Figura 27*).

Após uma liberação significativa de adenina em intervalo reduzido (“burst”), parece ter ocorrido uma diminuição na velocidade de formação do produto atingindo um estado estacionário (*Figura 26*). Esse comportamento de “burst” também pode ser verificado em outros trabalhos para depuração de oligonucleotídeos pela ricina

(BEVILACQUA *et al.*, 2010; HEISLER *et al.*, 2002; HINES; BRUEGGEMANN; HALE, 2004), conforme pode ser observado na *Figura 28*.

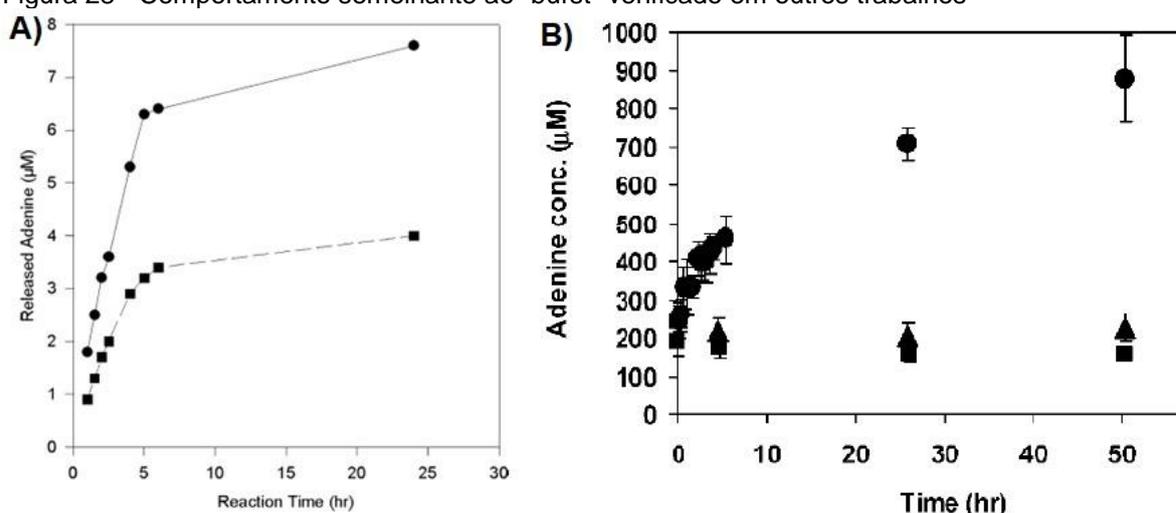
Figura 27 - Curva progressiva de liberação de adenina a partir de hsDNA ( $0,08 - 0,50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) catalisada por ricina a  $0,87$



Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais com eletrólito de suporte acetato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 4,6 e eletrodo de trabalho EPC,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ .

Figura 28 - Comportamento semelhante ao "burst" verificado em outros trabalhos



Fonte: A) HINES; BRUEGGEMANN; HALE, 2004; B) BEVILACQUA et al., 2010.

Com o objetivo de entender o mecanismo cinético da ricina sobre hsDNA, uma análise cinética do estado pré-estacionário foi realizada seguindo o esquema mínimo 2 abaixo e assumindo a irreversibilidade da reação química (JOHNSON, 1992). Este esquema descreve as etapas básicas para a ligação do substrato ( $k_s$ ), a reação química catalítica ( $k_2$ ) e a liberação do produto ( $k_3$ ).

### Esquema 2



A partir do Esquema 2, a dependência no tempo da formação do produto pode ser descrita por uma tendência exponencial seguida por uma fase linear (Inserção, Figura 26). Um exponencial de primeiro grau foi então ajustado aos dados pela equação 21 a seguir:

$$[P]_{obs}/[E_0] = ([EP] + [P])/[E_0] = A_0(1 - e^{-\lambda t}) + K_{cat}t \quad (21)$$

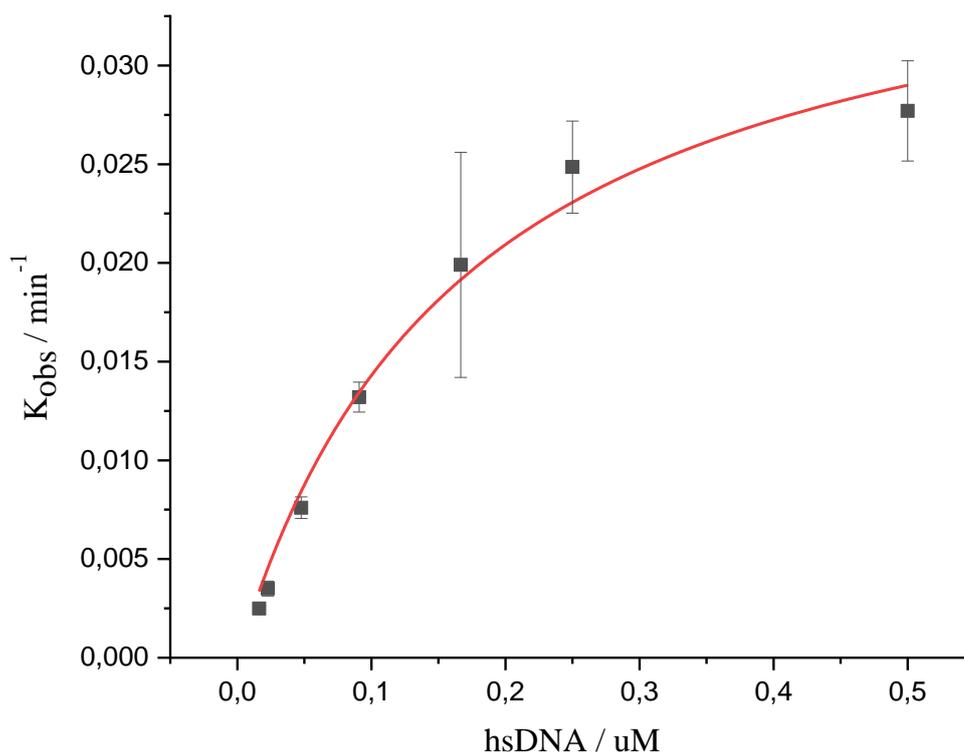
onde  $E_0$  representa a concentração da enzima,  $A_0$  a amplitude do sinal da reação,  $\lambda$  é a constante da taxa de fase de ruptura e  $K_{cat}$  é a constante da taxa de estado estacionário (TOKARSKY et al., 2016). Com as constantes microscópicas de taxa e a

amplitude no Esquema 1, são definidas por  $A_0 = k_2 + k_3$ ,  $\lambda = [k_2/(k_2 + k_3)]^2$ , e  $K_{cat} = k_2 k_3/(k_2 + k_3)$ .

$$K_{obs} = k_3 + k_2 * S/(k_3 + K_s) \quad (22)$$

Os dados amperométricos registrados na *Figura 29* apresentaram uma dependência hiperbólica das constantes da taxa de pseudo-primeira ordem aparente observada ( $K_{obs}$ ) na concentração de hsDNA. A partir das constantes de taxa observadas resultantes  $k_2$  e  $k_3$ , uma solução para a constante de dissociação de equilíbrio  $k_s$  pode ser obtida ajustando os dados da *Figura 29* aos valores de  $K_{obs}$  como segue (TOKARSKY *et al.*, 2016):

Figura 29 - Constantes de taxa observadas ( $k_{obs}$ ) em função da concentração de hsDNA.



Fonte: Do autor.

Legenda: A curva sólida é o ajuste dos dados experimentais com a equação 15.

Assim, a constante  $K_m$  de Michaelis-Menten aparente foi então calculada pela equação 23 (TANG *et al.*, 2003).

$$K_m = k_s * k_3 / (k_2 + k_3) \quad (23)$$

Os valores encontrados obtidos para a análise cinética do estado pré-estacionário são mostrados na *Tabela 4*.

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos para a hidrólise do hsDNA catalisado pela ricina

Parâmetros Cinéticos	Valor
$k_{cat}$	49 +/- 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$
$k_2$	19 $\text{min}^{-1}$
$k_3$	0.14 $\text{min}^{-1}$
$k_s$	218 +/- 28 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
$K_m$	75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$

Fonte: Do autor.

A partir dos procedimentos acima, o valor de  $k_s$  foi de 218  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e o valor de  $K_m$  foi de 75  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Considerando-se um valor  $k_{cat}$  de 49  $\text{min}^{-1}$  ao usar 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  para hsDNA (peso molecular médio de 20 kDa, (Sigma-Aldrich), foi calculada a eficiência catalítica da ricina em hsDNA,  $k_{cat}/K_m$  como  $1,1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}.\text{mol.L}^{-1}$ , um valor dentro da faixa de frequência de encontro controlada por difusão de uma enzima e um substrato para proficiência catalítica (BAR-EVEN *et al.*, 2011). Os valores encontrados para a proficiência catalítica foram semelhantes aos relatados por Sturm e Schramm (STURM; SCHRAMM, 2009) quando ribossomos de reticulócitos de coelho e ribossomos de levedura foram usados como substrato.

#### 6.2.10 Método comparativo - depuração de hsDNA com ricina por HPLC

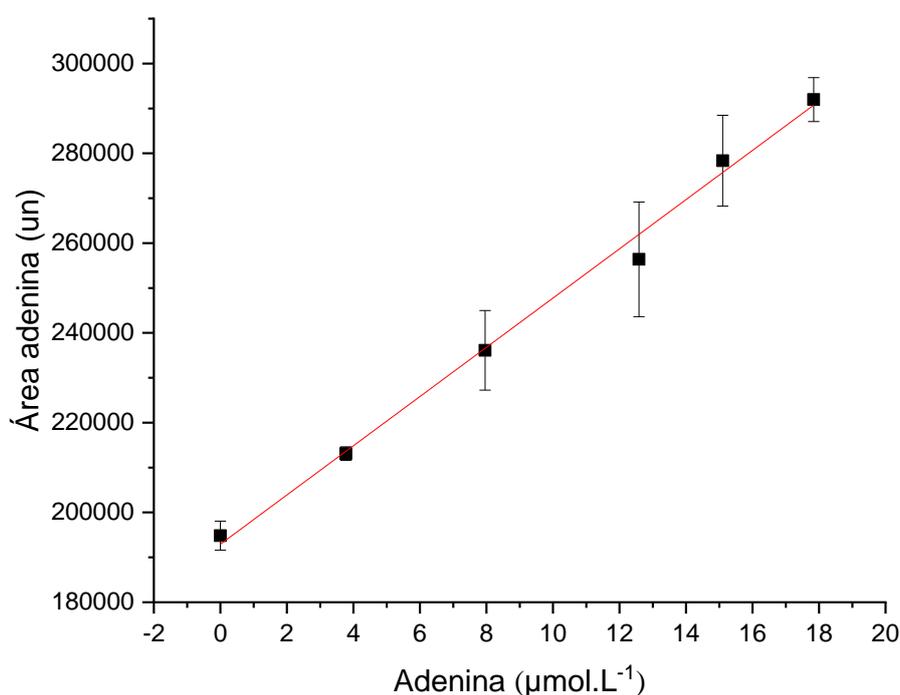
Dentre os métodos para medição da atividade de ricina por quantificação de adenina liberada podem ser referenciados fluorescência, colorimetria e eletroquimiluminescência (BEVILACQUA *et al.*, 2010; HEISLER *et al.*, 2002; HINES; BRUEGGEMANN; HALE, 2004; ZAMBONI *et al.*, 1989b). Os ensaios envolvendo a

cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectrometria de massas (MS) são os mais utilizados para essa finalidade por serem altamente específicos e quantitativos (KALB *et al.*, 2015). Com tudo, apresentam algumas desvantagens quanto à necessidade de infraestrutura laboratorial e/ou deslocamento do equipamento até o local de exposição à toxina para análise. Além disso, podem necessitar de tempo de preparação para análise, como o enriquecimento da amostra, bem como modificação ou derivatização do analito.

Neste estudo, buscamos a comparação do ensaio eletroquímico proposto com o ensaio por HPLC consolidado na literatura para detecção de adenina liberada por ricina.

A Figura 30 apresenta a curva analítica para o ensaio de detecção de adenina por HPLC usando as condições de análise descritas na metodologia.

Figura 30 - Curva analítica obtida pela análise de adenina no intervalo de 0,1 – 18  $\mu\text{mol.L}^{-1}$

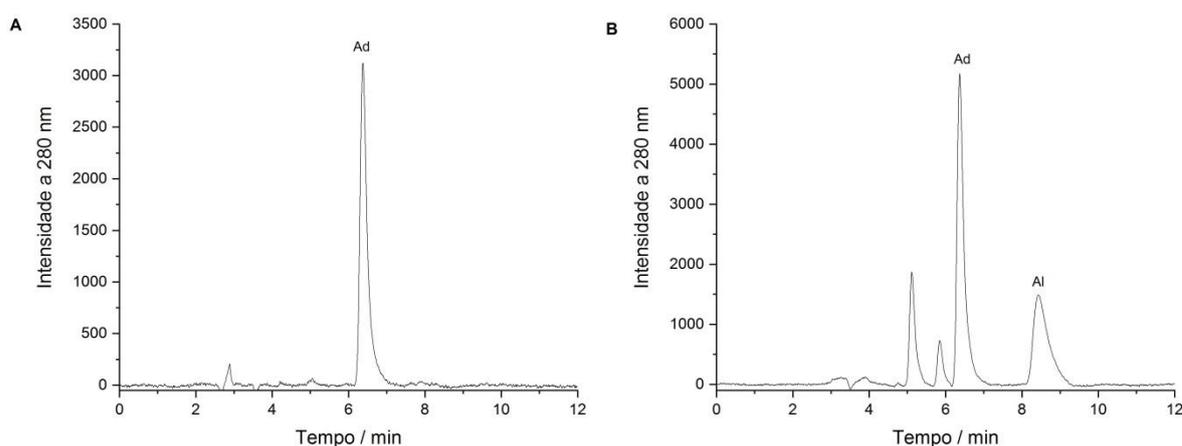


Fonte: Do autor.

O método utilizado mostrou-se linear para a curva analítica na faixa de concentração de 0,1 – 18  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , com coeficientes de correlação linear (R) maior que 0,99.

A *Figura 31A* e *31B* apresenta um cromatograma de adenina padrão em concentração de  $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e da depurinação de hsDNA com ricina após início da reação.

Figura 31 - Cromatograma de eluição por HPLC



Fonte: Do autor.

Legenda: A) padrão de adenina [ $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ]

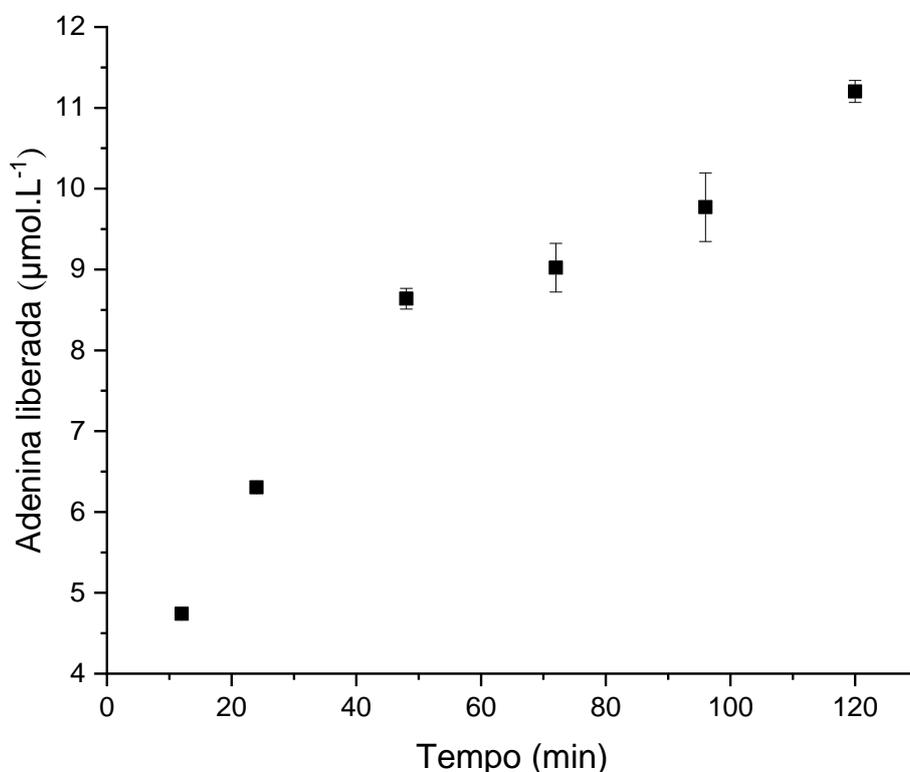
B) amostra de hsDNA [ $0,15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ]

Deteccção:  $\lambda = 280 \text{ nm}$ . Picos: Ad, adenina; e Al, alopurinol.

Uma vez verificada a linearidade da resposta de adenina, foi realizada a monitoração da liberação de adenina do hsDNA pela ricina por deteção em HPLC. Os dados foram registrados durante 120 minutos e em intervalos variáveis (*Figura 32*).

A taxa de liberação de adenina também sugere um comportamento bifásico de catálise (*Figura 32*), com possível estado pré-estacionário para o sistema, tal como evidenciado eletroquimicamente (*Figura 26*). Assim, conduzimos a análise cinética nos moldes do que foi realizado pela depurinação de hsDNA com ricina por VOQ, e utilizando um ajuste exponencial de primeiro grau aos dados (equação 14) para obter o valor de  $k_{\text{cat}}$  para o ensaio cinético realizado por HPLC.

Figura 32 - Liberação de adenina a partir de  $0,15 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de hsDNA catalisada por ricina a  $0,87 \text{ pmol}$



Fonte: Do autor.

A Tabela 5 apresenta os resultados comparativos entre os valores obtidos nas duas metodologias para concentrações semelhantes de substrato.

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos comparativos obtidos por hidrólise de hsDNA catalisada por ricina, tal como obtidos por HPLC e VOQ.

Parâmetros Cinéticos	Metodologia	
	HPLC	VOQ
Concentração hsDNA	$0,15 \mu\text{mol.L}^{-1}$	$0,17 \mu\text{mol.L}^{-1}$
$A_0$	$6,42 \pm 0,68 \mu\text{mol.L}^{-1}$	$7,91 \pm 1,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$
$k_{obs}$	$0,095 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$	$0,121 \pm 0,048 \text{ min}^{-1}$
$k_{cat}$	$4,5 \pm 0,88 / \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$	$11,5 \pm 3,1 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$

Fonte: Do autor.

Os resultados apresentados para os parâmetros cinéticos estão na mesma ordem de magnitude entre os métodos em condições semelhantes de substrato e condições iguais de concentração de ricina.

A Tabela 6 apresenta um comparativo entre os métodos de detecção de ricina biologicamente ativa disponíveis na literatura.

Tabela 6 - Comparativo entre métodos de detecção de ricina biologicamente ativa

Método de detecção de ricina ativa	LOD ng / mL	Tempo	Publicação	Referência
[ <sup>3</sup> H] -boro-hidreto incorporada ao ribossomo modificado	400	15 min	artigo	(LING; LIU; WANG, 1994)
Ensaio de depurinação com DNA marcado com radioisótopo ( <sup>3</sup> H]DNA)	1400	40 min	artigo	(BRIGOTTI <i>et al.</i> , 1998)
Imunoafinidade para captura da ricina e ensaio de depurinação detectada por HPLC/MS	0,1-0,3	24 h	artigo	(BECHER <i>et al.</i> , 2007)
Ensaio de depurinação com substrato de oligodesoxirribonucleotídeo contendo um resíduo de desoxiadenosina ou desoxiuridina.	0,1	ausente	patente	(KEENER; WARD, 2007)
Ensaio de liberação de adenina luminescente	1,6 - 200	20 min.	artigo	(STURM; SCHRAMM, 2009)
Ensaio de depurinação qPCR rRNA	7	3 h	artigo	(MELCHIOR; TOLLESON, 2010)
Ensaio de citotoxicidade de alto rendimento	65	27 h	artigo	(STECHMANN <i>et al.</i> , 2010)
Ensaio de citotoxicidade de alto rendimento	5	48 h	artigo	(WAHOME <i>et al.</i> , 2010)
MS de diluição de isótopos para detecção direta da ricina e ensaio de depurinação em substrato sintético com detecção por MS	0,6	4-6 h	artigo	(MCGRATH <i>et al.</i> , 2011)
Ensaio de citotoxicidade de impedância celular	0,2-14	4 h	artigo	(PAULY <i>et al.</i> , 2012)
Detecção por emissão de fluorescência de um fragmento de DNA marcado em ambos os lados, por ricina ou toxinas afins.	12,5	2 h	patente	(HELEN <i>et al.</i> , 2014)
Método em sistema in vitro para ensaio ribossomal, transcrição reversa (produção de c-DNA) e PCR.	0,5	3 h	patente	(ADI <i>et al.</i> , 2018)
Ensaio detecção de ricina e sua atividade enzimática centrada na depurinação do hsDNA, herring sperm DNA, por eletroanálise	18	15 mim	Presente trabalho	Do autor

Fonte: Do autor.

Os resultados obtidos com o comparativo entre os métodos demonstram que o ensaio de detecção de ricina por eletroanálise desenvolvido neste trabalho apresentou alta sensibilidade e baixo tempo de ensaio.

Essa informação permite afirmar que a depurinação de hsDNA por voltametria de onda quadrada descrita neste trabalho pode estabelecer um novo procedimento para detecção e caracterização de ricina. Entre suas vantagens em relação ao método tradicional destacam-se a possibilidade de medições em campo, uma vez que os

sistemas amperométricos são facilmente miniaturizados, além de não necessitar de modificação ou derivatização do analito para detecção, ou combinação de técnicas para pré-purificação de amostra antes da detecção.

#### 6.2.11 Atividade de Ricina em Matrizes Alimentares

Para determinar os efeitos das matrizes alimentares sobre o desempenho dos ensaios eletroanalíticos de depuração do hsDNA na ausência e presença de ricina, os dois produtos alimentícios, leite desnatado e clara de ovo de galinha, foram analisados.

A Tabela 7 apresenta os valores de atividade para as concentrações de ricina nas duas matrizes alimentares.

Tabela 7 - Atividade ricina em diferentes matrizes alimentares.

Concentração de Ricina (nmol.L <sup>-1</sup> )	Atividade residual de Ricina (%)	
	Leite desnatado	Clara de ovo
0	0,90 ± 0,04	4,43 ± 0,28
24	9,78 ± 0,33	43,52 ± 1,92
48	70,24 ± 1,17	68,34 ± 0,79

Fonte: Do autor.

Esses resultados demonstraram que o leite e o ovo contêm componentes que podem interferir no ensaio de depuração do hsDNA sobre ação da ricina (HE *et al.*, 2008). No entanto, o ensaio pode ser usado com segurança para a detecção da toxicidade da ricina em concentrações superiores a 48 nmol.L<sup>-1</sup> para o leite e 24 nmol.L<sup>-1</sup> para a clara de ovo.

### 6.2.12 IC<sub>50</sub> dos candidatos a inibidores de ricina

A atividade de inibição de duas moléculas controle bem como dos candidatos sintetizados em parceria junto à rede BaBel de pesquisa foi avaliada e os resultados estão apresentados na *Tabela 8*.

Tabela 8 - Atividade de inibição dos controles positivos, moléculas de ácido pteróico e retro-2.

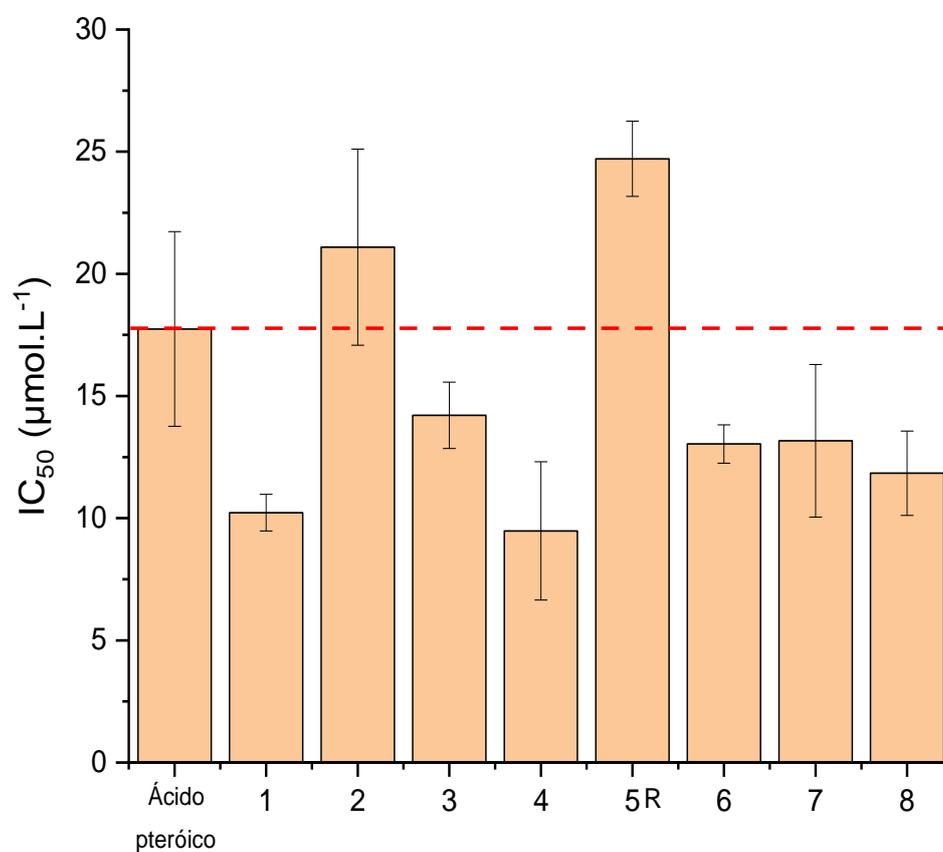
Inibidor	Un	Concentração inibidor				
		μmol.L <sup>-1</sup>				
		0	5	10	15	20
Ác. Pteróico	%	100 ±1,5	92 ±2,2	75,3 ±1,9	67,8 ±2,5	53,7 ±3,0
Retro-2	%	100 ±8,6	91 ±6,7	78 ±3,0	69,4 ±7,8	59,4 ±1,0
Molécula 1	%	100 ±2,3	85 ±4,1	46,6 ±2,2	25 ±1,2	10,4 ±4,7
Molécula 2	%	100 ±0,2	92,6 ±2,3	73,9 ±2,6	54,8 ±2,9	34,5 ±3,2
Molécula 3	%	100 ±4,7	98,9 ±8,5	87 ±2,5	71,1 ±4,7	56,1 ±5,7
Molécula 4	%	100 ±5,3	90 ±1,4	47,4 ±7,6	37 ±2,3	30,1 ±0,3
Molécula 6	%	100 ±6,1	84,8 ±9,1	57,3 ±4,6	40,9 ±5,0	38,5 ±8,9
Molécula 7	%	100 ±7,1	82,8 ±1,0	66 ±1,4	56 ±1,9	47,3 ±1,1
Molécula 8	%	100 ±4,7	75,7 ±7,3	50,4 ±8,1	30,2 ±6,5	26 ±6,9

Fonte: Do autor.

Os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos a partir de ajustes não lineares da Equação 14 aos dados de porcentagem de inibição em função da concentração de ácido pteróico, em faixa de 0 a 20 μmol.L<sup>-1</sup>. O ácido pteróico apresentou uma inibição máxima de 53,7% na concentração máxima testada, e um valor de IC<sub>50</sub> de 17,7 μmol.L<sup>-1</sup>. A literatura relata um valor de IC<sub>50</sub> para o ácido pteróico sobre a subunidade RTA de 600 μmol.L<sup>-1</sup> em ensaios de tradução *in vitro* (PRUET *et al.*, 2011). As diferenças entre os métodos utilizados para extração e detecção de ricina poderiam explicar a discrepância de 25 vezes entre os valores encontrados.

Os resultados compilados para o IC<sub>50</sub> das moléculas 1; 2; 3; 4; retro-2 (5R); 6; 7 e 8 estão apresentados na *Figura 33*.

Figura 33 - Valores de IC<sub>50</sub> para inibidores de ricina



Fonte: Do autor.

Legenda: Ácido pteróico como controle positivo, e (1) ao (8) são respectivamente as moléculas 1; 2; 3; 4; retro-2 (5R); 6; 7 e 8.

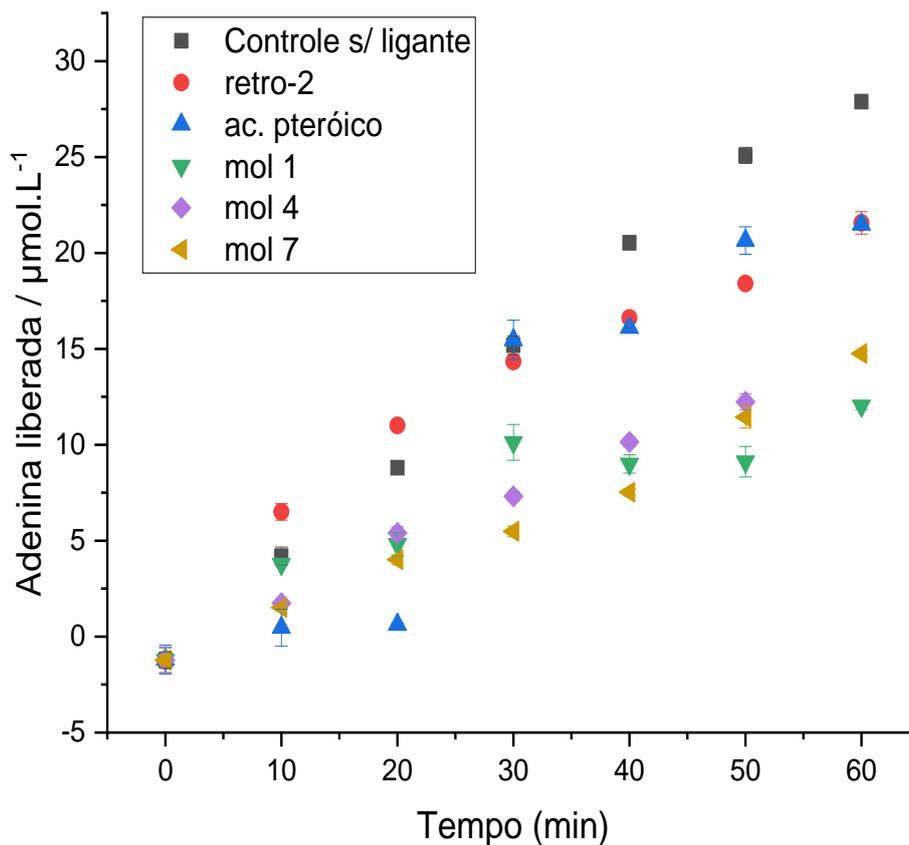
Os resultados mostraram que os inibidores 1, 2, 3, 4, 3, 6, 7 e 8 apresentaram inibição máxima superior ao controle entre 10,4 a 47,3% na concentração máxima testada, e valores de IC<sub>50</sub> de 9,5 a 13,2 µmol.L<sup>-1</sup>.

#### 6.2.13 Ensaios para diagnóstico de inibição da catálise da ricina

A cinética de liberação de adenina a partir do hsdDNA em presença de ricina complexada com os candidatos a inibidores (ácido pteróico, retro-2 (5R) e as

moléculas 1, 4, 7) foram avaliadas por VOQ em tempo total de reação de 60 minutos na temperatura de 25°C (Figura 34).

Figura 34 - Avaliação da atividade enzimática da ricina [0.87 pmol] em 0,18  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de hsDNA na ausência e presença dos candidatos a inibidores.



Fonte: Do autor.

Legenda: Moléculas ácido pteróico, retro-2 (5R) e as moléculas 1, 4, 7 na concentração de  $2,05 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$  em temperatura de 25°C.

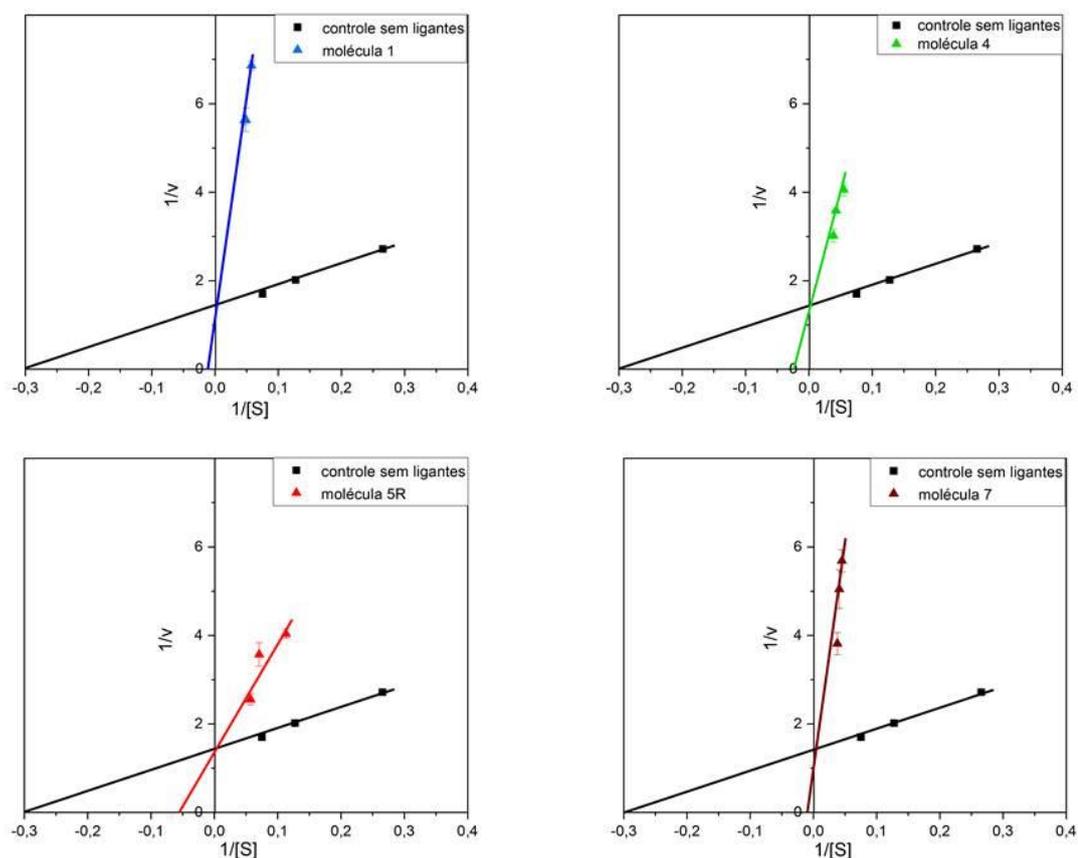
De acordo com as condições de cinética do estado pré-estacionário, a formação do produto ocorre em uma fase exponencial rápida, seguida por uma fase linear de menor velocidade (JEFFREY *et al.*, 2003). Para a cinética da ricina com o hsDNA discutida neste trabalho, observa-se que para concentrações inferiores de substrato (por exemplo:  $0,18 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), a fase estacionária é atingida antes dos 10 minutos de experimento. Dessa forma, analisou-se o mecanismo de inibição dos

ligantes complexados a ricina usando as taxas iniciais do estado estacionário (HINSCH; KULA, 1981).

Por esta análise, determinou-se as taxas instantâneas e concentrações de substrato a partir de uma curva progressiva para cada reação, seguindo metodologia proposta por Yun e Suelter (YUN; SUELTER, 1977).

Assim, o ajuste linear aos dados obtidos a partir do gráfico de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER; BURK, 1934),  $1/v$  em função de  $1/[S]$  das curvas progressivas de ricina em hsDNA na ausência e presença dos inibidores (Figura 34), está apresentado na Figura 35.

Figura 35 - Ajuste linear de Lineweaver-Burk para a cinética de ricina em hsDNA na ausência (controle sem ligantes) e presença dos ligantes 1, 4, 5R e 7



Fonte: Do autor.

A análise dos resultados obtidos para o estudo cinético da ricina em hsDNA na presença dos ligantes, sugere que as moléculas 1, 4, 5R e 7 agem como inibidores competitivos da ricina.

Uma vez identificado o modelo de inibição competitivo para os ligantes, o cálculo da constante de inibição dos ligantes ( $K_i^{app}$ ) foi determinado a partir da

linearização da equação 3 para inibição competitiva (LINEWEAVER; BURK, 1934). A seguir, apresentamos a equação 24 de duplo recíproco, onde o  $\alpha'$ , representa o termo  $1 + [I]/K_i^{app}$ .

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{\alpha'K_m}{V_{max}}\right)\frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (24)$$

Os valores da concentração inibitória mínima (IC<sub>50</sub>) foram obtidos a partir da equação 25 para a inibição competitiva (CER *et al.*, 2009).

$$IC_{50} = K_i^{app} + \left(1 + \frac{S}{K_m}\right) \quad (25)$$

A Tabela 9, apresenta os valores de  $K_i^{app}$  e IC<sub>50</sub> obtidos para as moléculas 1, 4, 5R e 7, em função dos valores de  $V_{max}$  e  $K_m$  obtidos nesta etapa. O valor de  $K_m$  obtido na ausência dos ligantes foi de mesma magnitude do encontrado na literatura (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (JASHEWAY *et al.*, 2011).

Tabela 9 - Parâmetros do estado estacionário para curvas progressivas de ricina em hsDNA na ausência e presença dos ligantes.

	$V_{max}^{app}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m^{app}$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	$K_i^{app}$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )
Controle	0,69 ±0,02	3,21 ±0,01	-	-
Retro-2 (5R)	0,83 ±0,42	20,94 ±12,82	4,64 x10 <sup>-2</sup>	4,81
Ácido pteróico	0,78 ±0,44	45,67 ±04,75	1,76 x10 <sup>-2</sup>	1,83
Molécula 1	0,86 ±0,25	86,37 ±15,34	1,00 x10 <sup>-2</sup>	1,04
Molécula 4	0,68 ±0,32	33,87 ±15,07	2,13 x10 <sup>-2</sup>	2,21
Molécula 7	0,99 ±0,54	102,05 ±17,32	9,73 x10 <sup>-3</sup>	1,01

Fonte: Do autor

As moléculas apresentaram  $K_i^{app}$  variando de 1,01 a 4,81  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , dentre os quais, as moléculas 1 e 7 apresentaram uma afinidade maior pela ricina e os menores valores de IC<sub>50</sub>.

As moléculas 1 e 4 foram derivadas da molécula 5R obtida comercialmente, e possuem em comum a presença de quinazolinonas. A literatura reporta um crescente interesse nos derivados destes compostos por sua bioatividade em diversas

atividades farmacológicas (KHAN *et al.*, 2014), tais como atividade anti-inflamatória (OSARUMWENSE; USIFOH, 2018), inibição antiproliferativa com ação antibacteriana (WANG, H. X. *et al.*, 2019); e de inibição para as toxinas RIP tipo II como a ricina e a toxina de shiga (STECHMANN *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos sugerem que a substituição do tiofeno ligado a quinazolinona na molécula 5R por um anel fenólico melhorou o potencial inibitório para as moléculas 1 e 4. Além de que, uma ramificação da porção fenólica com dois grupamentos metiletóxi pode ter levado a molécula 1 a atingir um melhor resultado em relação a molécula 4.

A análise estrutural da molécula 7 revela a presença de um grupo derivado da quinolina, porém sem semelhanças estruturais com a molécula 5R, o que dificulta a comparação entre os inibidores. Assim, mais testes deverão ser realizados comparando moléculas de maior semelhança (por exemplo, molécula 6) para demais conclusões.

#### 6.2.14 Ensaios eletroquímicos com dispositivo portátil

A partir dos resultados obtidos buscou-se aplicar o procedimento para detecção e atividade catalítica de ricina em dispositivo portátil empregando-se eletrodos impressos (SPE, “screen printed electrodes”), com vistas a avaliar a identificação da toxina em campo. Para isso foi utilizado uma interface Sensit Smart (Palmsens, Inc) capaz de conectar-se a eletrodos convencionais ou eletrodos SPE por entrada USB a notebook ou smartphone (*Fotografia 2*).

Os eletrodos SPE empregados consistiram de unidades em trilhas combinadas de carbono (trabalho e contra-eletrodo) e mistura de Ag/AgCl (referência).

Fotografia 2 - Sensit Smart conectado ao dispositivo móvel



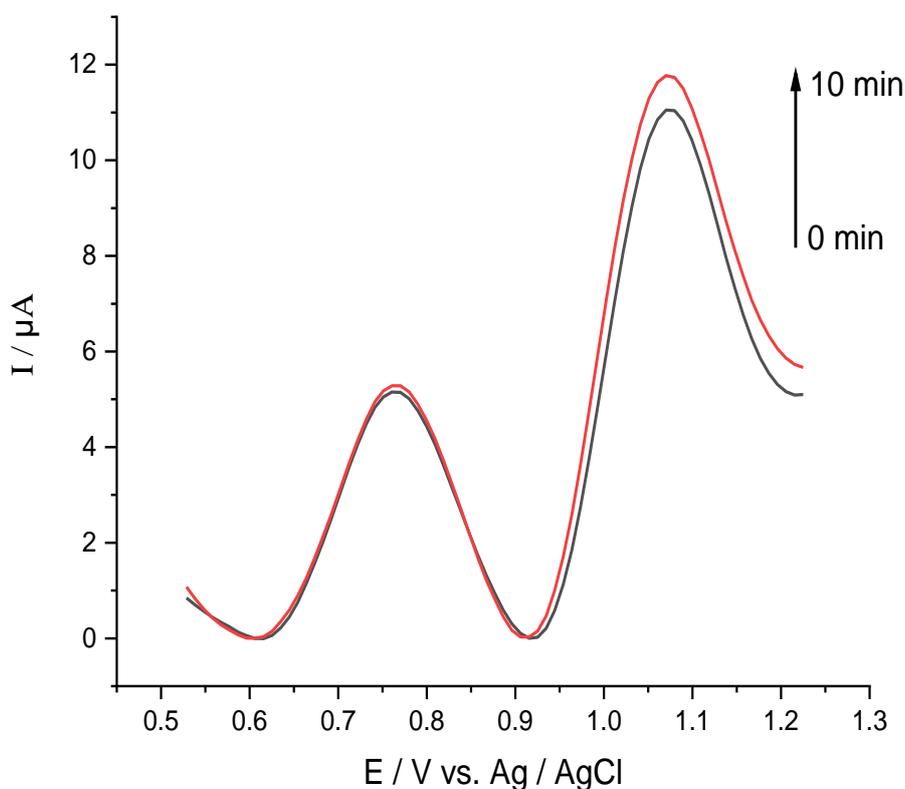
Fonte: Do autor

Em breve ensaio, o hsDNA ( $0,18 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foi incubada com a ricina ativa, seguido de retirada de alíquota para análise no tempo inicial e no tempo final de 30 minutos. Os Voltamogramas referentes as medidas foram apresentados na *Figura 36*.

O comportamento do sinal eletroquímico observado para o hsDNA foi semelhante ao encontrado no potenciostato PG-39MSCV, apresentando dois picos voltamétricos referentes aos resíduos de guanina e adenina. Entretanto, ocorreram deslocamentos do  $E_p$  para valores à esquerda de  $0,9 \text{ V} - 1,2\text{V}$  para  $0,76 \text{ V} - 1,07 \text{ V}$  respectivamente para guanina – adenina na comparação entre os aparelhos. Provavelmente explicado pela troca do conjunto de eletrodos (trabalho, contra-eletrodo e referência individuais) para eletrodo impresso.

A liberação de adenina obtida a partir da atividade catalítica da ricina em 10 minutos de análise foi de  $8,23 \pm 0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

Figura 36 - VOQ de atividade de ricina medida em potenciostato portátil



Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais com eletrólito de suporte acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 4,6 e eletrodo impresso,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ .

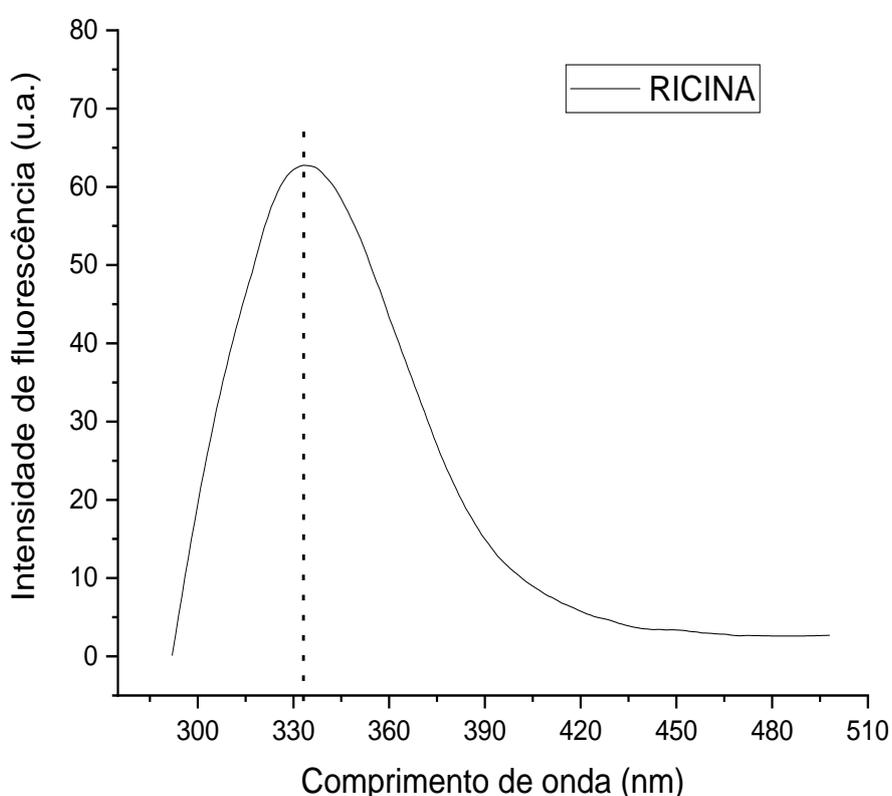
Neste estudo usamos voltametria de onda quadrada para monitorar a adenina liberada pela ação catalítica da ricina do hsDNA, seguindo-se a determinação dos parâmetros cinéticos. O método é relativamente simples, usa eletrodos de pasta de carbono não modificada e pode ser adaptado a várias fontes de amostras suspeitas. Além disso, o ensaio eletroquímico desenvolvido não requer nenhuma preparação da amostra, além de ter se mostrado eficiente na detecção da liberação de adenina em faixa micromolar.

Como um todo, podemos afirmar que a depuração de DNA por voltametria de onda quadrada pode estabelecer um novo procedimento para detecção e caracterização de ricina.

### 6.3 INTERAÇÃO DE RICINA COM INIBIDORES

As técnicas de espectroscopia por fluorescência molecular são bastante utilizadas em estudos de interação proteína-ligante por ser de aplicação generalizada e de simples manuseio com alta sensibilidade, o que permite avaliação de sistemas com baixas concentrações (VALEUR, 2012). O espectro da emissão de fluorescência da ricina na ausência de inibidores é apresentado na *Figura 37*.

Figura 37 - Emissão de fluorescência da ricina em pH 4,6 (T=298K e  $\lambda_{ex}$ =280 nm)



Fonte: Do autor.

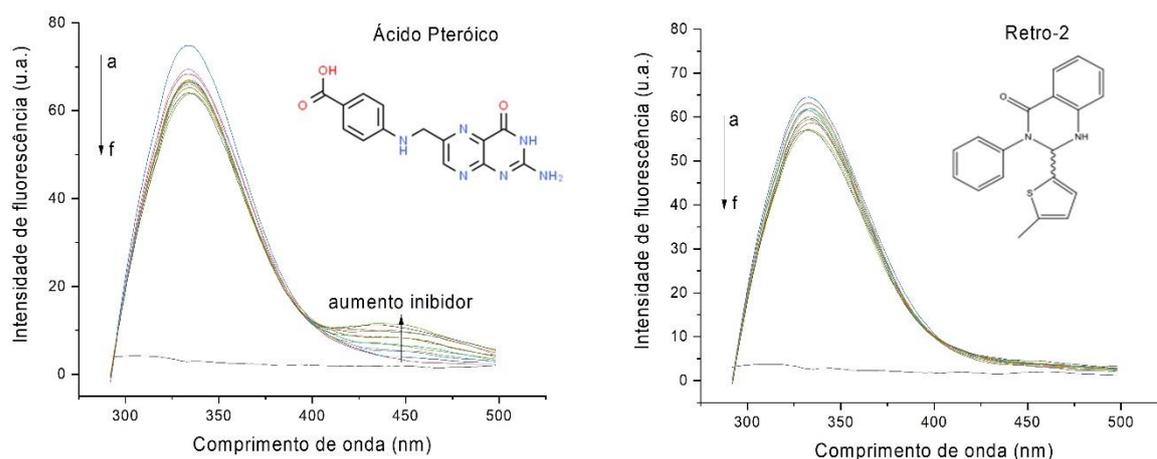
Observa-se uma forte banda de emissão de fluorescência em 334 nm. A emissão de fluorescência da fitotoxina é devida à presença dos resíduos aromáticos, e em especial aos 10 resíduos de triptofano presentes na estrutura da ricina (ID PDB: 3RTI), sendo que a RTB contém 9 dos 10 resíduos de triptofano da proteína (GAIGALAS *et al.*, 2007).

### 6.3.1 Espectrofluorogramas de ricina e dos ligantes

Para avaliar o processo de interação entre a ricina e os inibidores comerciais ácido pteróico e retro-2, e entre a ricina e os candidatos a inibidores 1, 2, 3, 4, 6, 7, e 8, realizou-se uma titulação espectrofluorimétrica, onde acompanhou-se a supressão da fluorescência da intrínseca da proteína.

As Figura 38 exhibe os espectros de emissão de fluorescência da ricina na ausência e presença dos inibidores adquiridos comercialmente (ácido pteróico e retro-2) em pH 4,6.

Figura 38 - Emissão de fluorescência da ricina na ausência e presença do ácido pteróico e da Retro-2 (5R)



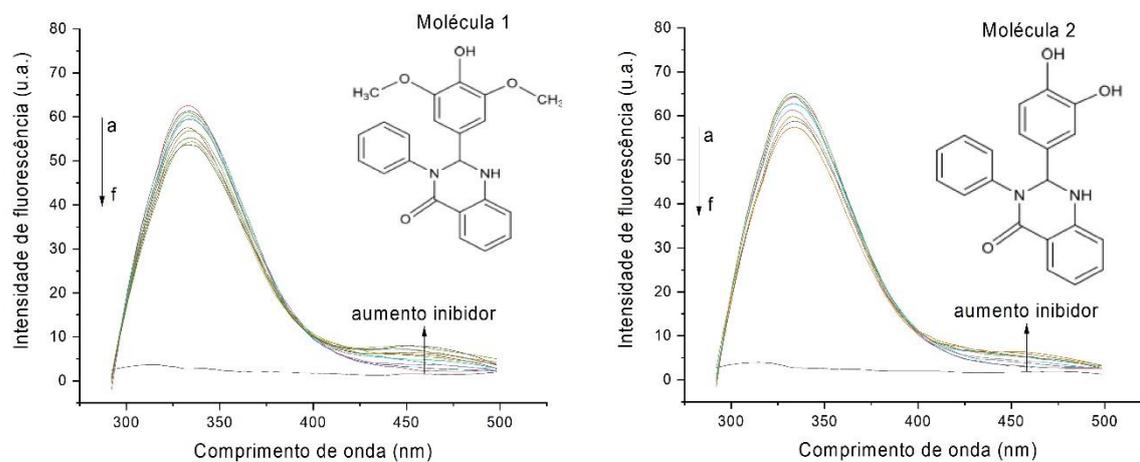
Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais “a-f”: de 0 a  $2,05 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> com incrementos de  $4,1 \times 10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup> em pH 4,6. (T=298K e  $\lambda_{ex}=280$  nm).

Conforme apresentado na *Figura 38*, a medida que a concentração do inibidor em solução aumenta, ocorre a supressão do sinal de fluorescência da ricina.

Em seguida realizou-se o mesmo procedimento com os candidatos a inibidores sintetizados junto a rede de pesquisa denominada BaBel. Os espectros de emissão de fluorescência foram apresentados nas *Figura 39* a *Figura 42*.

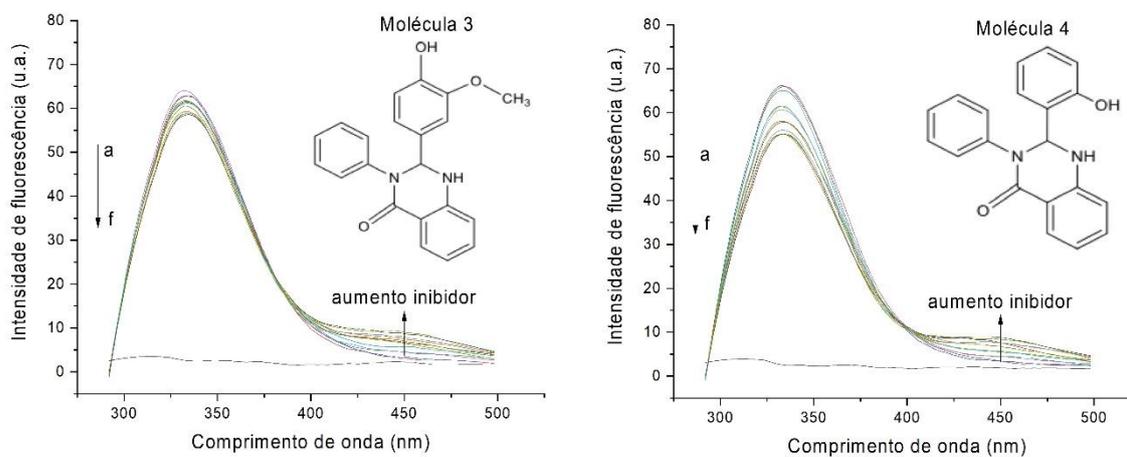
Figura 39 - Emissão de fluorescência da ricina na ausência e presença das Moléculas 1 e 2



Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais "a-f": de 0 a  $2,05 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> com incrementos de  $4,1 \times 10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup> em pH 4,6. (T=298K e  $\lambda_{ex}=280$  nm).

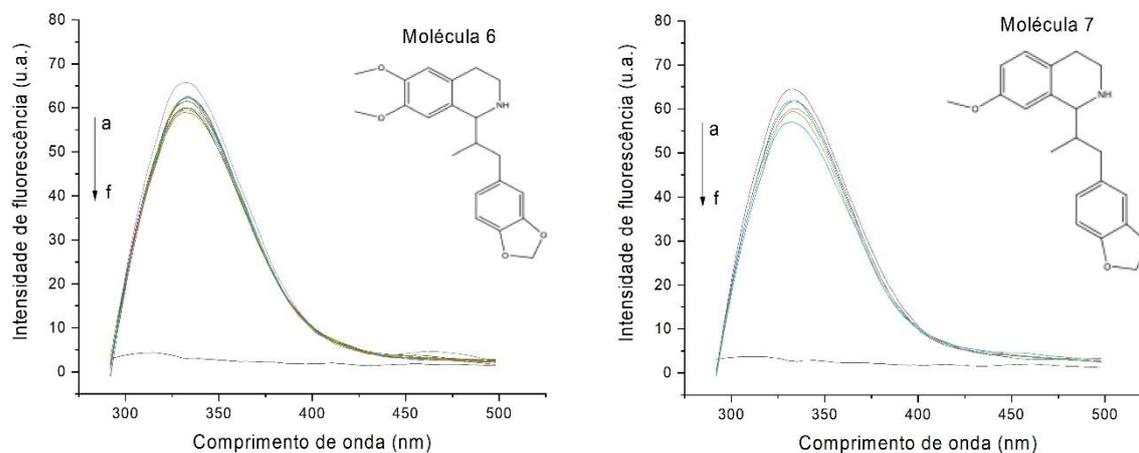
Figura 40 - Emissão de fluorescência da ricina na ausência e presença das Moléculas 3 e 4



Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais "a-f": de 0 a  $2,05 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> com incrementos de  $4,1 \times 10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup> em pH 4,6. (T=298K e  $\lambda_{ex}=280$  nm).

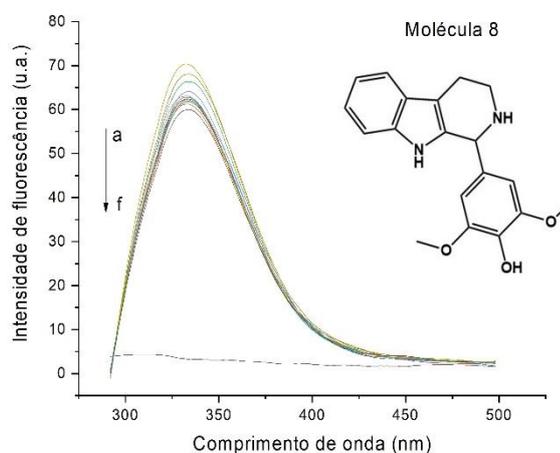
Figura 41 - Emissão de fluorescência da ricina na ausência e presença das Moléculas 6 e 7



Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais “a-f”: de 0 a  $2,05 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> com incrementos de  $4,1 \times 10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup> em pH 4,6. (T=298K e  $\lambda_{ex}$ =280 nm).

Figura 42 - Emissão de fluorescência da ricina na ausência e presença da Molécula 8



Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais “a-f”: de 0 a  $2,05 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> com incrementos de  $4,1 \times 10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup> em pH 4,6. (T=298K e  $\lambda_{ex}$ =280 nm).

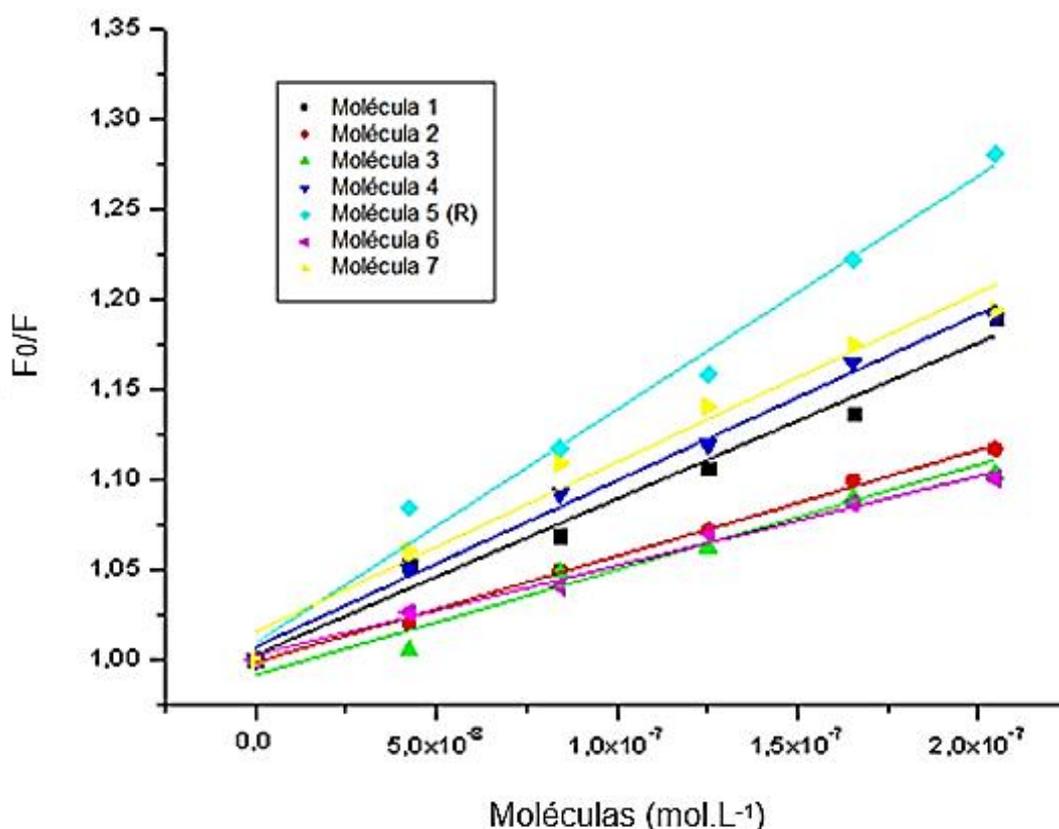
Todos os inibidores testados não absorvem na faixa de excitação e emissão da ricina (excitação: 280 nm e emissão: 334 nm), entretanto, os inibidores ácido pteróico, 1, 2, 3 e 4 apresentaram emissão na faixa de 400 a 500 nm.

Os inibidores provocaram em diferentes proporções supressão do sinal de fluorescência da ricina, e esta interferência foi abordada quantitativamente no tópico a seguir.

### 6.3.2 Determinação de $K_b$ (constante de Stern-Volmer) e variação de energia de Gibbs ( $\Delta G$ )

O efeito da interação entre a ricina e os possíveis candidatos à ligantes foi quantitativamente abordado pela Equação 8 de Stern–Volmer, e está representado na *Figura 43* para pH 4,6. O comprimento de onda de emissão utilizado para os ligantes foi selecionado a partir dos picos obtidos até 334 nm somente, desconsiderando os picos acima desse valor, posto que a equação de Stern-Volmer pressupõe o sinal de fluorescência apenas para a molécula não complexada (GORE, 2000).

Figura 43 - Gráfico de Stern-Volmer da interação da ricina com possíveis candidatos à inibidores. T = 298K em pH 4,6



Fonte: Do autor.

Para todos os ligantes testados os resultados mostraram um comportamento linear com a concentração. Isto está de acordo com um modelo de similitude na

acessibilidade do ligante aos fluoróforos da fitotoxina (resíduos de Trp, principalmente), já que uma curvilinearidade poderia sugerir diferenças significativas nessa acessibilidade, mudança conformacional, ou mesmo desnaturação proteica (LAKOWICZ, 2013).

Adicionalmente, também realizamos o procedimento descrito para a interação ricina-inibidor em pH 7,0. A partir de ajuste linear aos dados experimentais, a constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) pode ser determinada diretamente pela inclinação da reta (MOLAE *et al.*, 2019). A Tabela 10 apresenta os valores das constantes de ligação  $K_{sv}$  para pH 4,6 e pH 7,0.

Tabela 10 - Valores da constante de supressão de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) para as moléculas 1, 2, 3, 4, 5 (R), 6 e 7 em pH 4,6 e pH 7,0

Molécula	pH 4,6		pH 7,0	
	$K_{sv}$ [ $\times 10^4 \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]	R	$K_{sv}$ [ $\times 10^4 \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]	R
1	83,9 $\pm$ 8,4	0,97	32,4 $\pm$ 3,0	0,96
2	58,9 $\pm$ 1,6	0,99	37,9 $\pm$ 2,9	0,97
3	54,8 $\pm$ 4,9	0,96	23,3 $\pm$ 1,9	0,96
4	92,3 $\pm$ 4,0	0,95	7,6 $\pm$ 0,7	0,96
Retro-2 (5R)	108,7 $\pm$ 13,7	0,94	39,6 $\pm$ 1,6	0,99
6	49,7 $\pm$ 2,6	0,99	..	..
7	93,9 $\pm$ 5,4	0,98	30,9 $\pm$ 0,9	0,99
8	22,6 $\pm$ 3,3	0,96	22,7 $\pm$ 1,0	0,98
Ac. pteróico	42,1 $\pm$ 4,3	0,98	28,8 $\pm$ 0,9	0,99

Fonte: Do autor

Devido à baixa supressão de fluorescência do ligante 6 em pH 7,0, não foi possível a verificação da linearidade para o cálculo da constante de Stern-Volmer. Utilizando-se os valores obtidos de  $K_{sv}$ , calculou-se o valor da energia de Gibbs ( $\Delta G$ ) a partir da Equação 16, para as moléculas de ácido pteróico, retro-2 (5R), 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 8 em pH 4,6 e pH 7,0. Os resultados estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 - Valores da Energia de Gibbs ( $\Delta G$ ) das Moléculas 1, 2, 3, 4, 5(R), 6 e 7 a 298 K em pH 4,6 e pH 7,0.

Molécula	$\Delta G$ pH 4,6	$\Delta G$ pH 7,0
1	- 33,78	- 31,42
2	- 32,90	- 31,81
3	- 32,72	- 30,60
4	- 34,01	- 27,83
Retro-2 (5R)	- 34,42	- 31,92
6	- 32,48	..
7	- 34,06	- 31,30
8	-30,53	-30,54
Ac. ptericoico	-32,07	-31,13

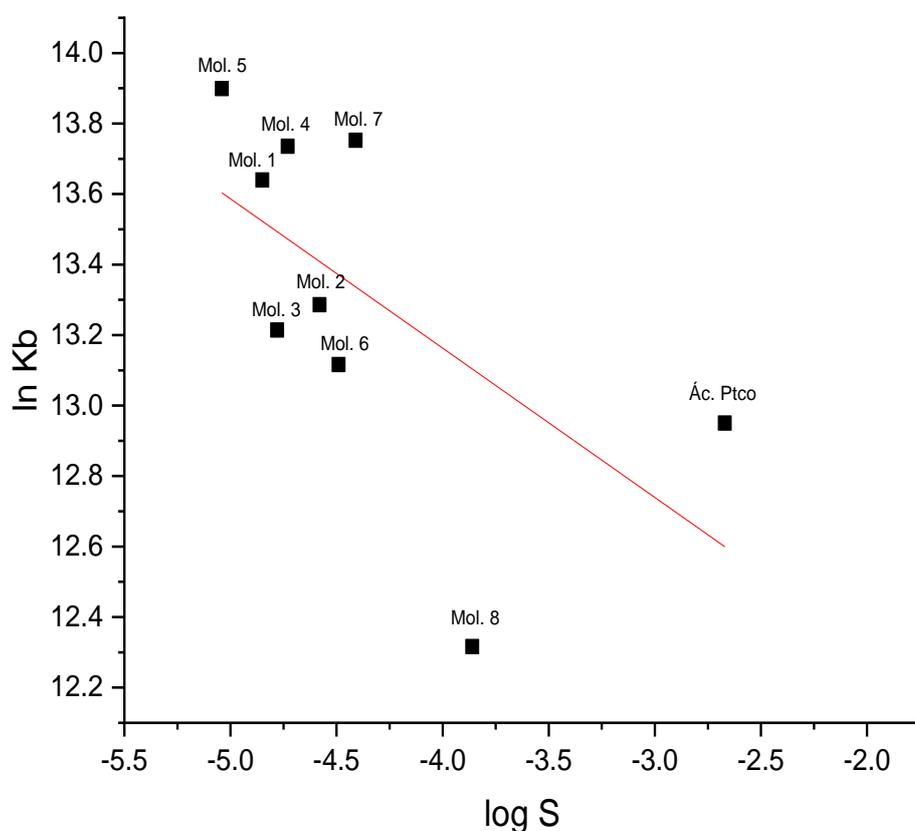
Fonte: Do autor

Nos experimentos de titulação da ricina com os candidatos a ligantes, verifica-se que a molécula retro-2 e as moléculas 1, 4, e 7 apresentaram os valores mais elevados para o  $K_{sv}$  em pH 4,6, e para o pH 7,0, os ligantes 1, 2, 5(R) e 7 apresentaram os valores mais elevados para o  $K_{sv}$ .

Os resultados sugerem que a formação dos complexos ocorre com maior espontaneidade em pH 4,6 do que pH 7,0. A fim de buscar uma correlação entre os valores de  $K_{sv}$  com a estrutura e propriedades dos ligantes, alguns dados quantitativos de estrutura e atividade foram obtidos junto ao banco de dados Chemicalize (CHEMICALIZE), tais como pKa, log S e aceptores de hidrogênio.

A *Figura 44*, apresenta a relação entre os valores de  $\ln K_{sv}$  ( $K_b$ ) com logS como descritor das estruturas.

Figura 44 - Relação da constante de interação do complexo com o descritor de solubilidade dos ligantes



Fonte: Do autor.

Podemos observar uma correlação inversamente proporcional entre os valores de  $\ln K_{sv}$  ( $K_b$ ) com  $\log S$ . Como  $\log S$  representa o valor logaritmo da concentração molar do soluto no solvente, os resultados sugerem que o complexo ligante-ricina pode ter sido favorecido por uma estrutura com menor nº. de ligações de H, como também de menor polaridade.

### 6.3.3 Determinação da população de fluoróforos acessíveis

Os resíduos de triptofano localizados em diferentes locais da proteína podem ser utilizados para avaliar a acessibilidade da proteína ao supressor. Considerando duas populações de fluoróforos (resíduos de Trp, por exemplo), uma acessível ao ligante e outra não. A partir da Equação 26, onde  $F_a$  corresponde

$$F_0 = F_a + F_b \quad (26)$$

à fluorescência da população acessível e  $F_b$  à fluorescência da população não acessível, pode-se deduzir a partir da Equação 8 de Stern-Volmer (LAKOWICZ, 2013) que:

$$\left(\frac{F_0}{\Delta F}\right) = \frac{1}{(f_a K_{sv}[L])} + \frac{1}{f_a} \quad (27)$$

Onde  $f_a$  representa a fração de fluoróforos acessíveis ao ligante (equação de Leher). Com base na Equação 27, a fração acessível pode ser determinada a partir de ajuste linear aos dados gerados (intercepto de um gráfico de  $F_0/\Delta F$  versus  $1/[L]$ ). Os resultados estão apresentados na *Tabela 12*.

Tabela 12 - Representação de fluoróforos acessíveis ao ligante ( $f_a$ ) e coeficiente de determinação em pH 4,6.

LIGANTE	$f_a$	R
1	0,37	0,92
2	0,17	0,98
3	0,27	0,99
4	0,61	0,99
6	0,24	0,95
7	0,25	0,95
8	0,18	0,97
Retro (5R)	0,74	0,99
Ác. Pteróico	0,13	0,99

Fonte: Do autor.

Esses dados sugerem uma acessibilidade entre 13 e 74% para os fluoróforos presentes na fitotoxina, sugerindo uma contribuição significativa para o sinal de fluorescência oriundo principalmente dos dez resíduos de Trp da enzima.

#### 6.3.4 Eficiência de supressão na transferência de energia

A eficiência de supressão de energia (E) mede a fração de fótons absorvidos pelo doador que é transferida ao acceptor. Pode ser representada por diversas relações, entre as quais, representamos a seguir a mais simples para as medidas de intensidade de fluorescência (Equação 28) (LAKOWICZ, 2013).

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (28)$$

O valor médio obtido de eficiência ensaiado em pH 4,6 foi de 15,8%, com coeficiente de variação percentual CV de 3,5%, reforçando o sinal significativo de supressão de fluorescência.

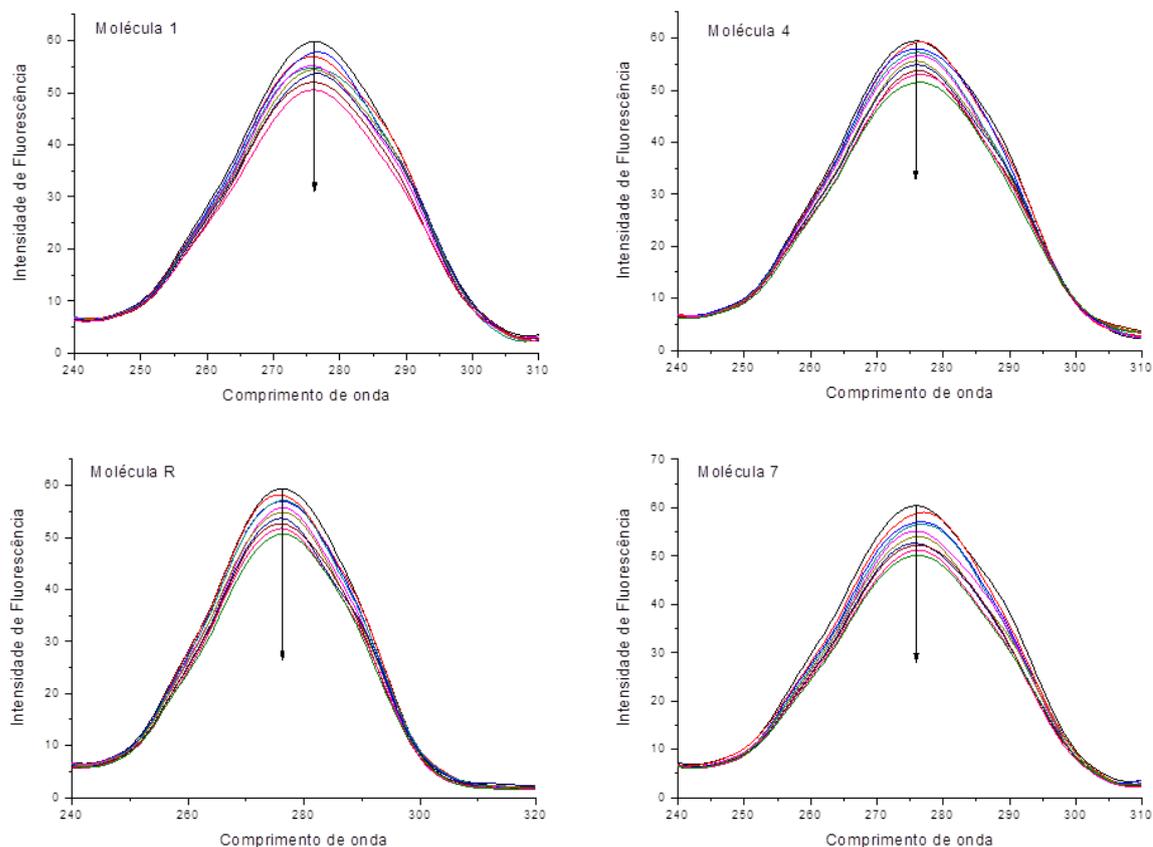
Baseado nos resultados anteriores, onde os maiores valores de  $K_{sv}$  foram obtidos em pH 4,6 (Tabela 10) para os ligantes 1, 4, 5(R) e 7, selecionamos estas moléculas para os experimentos seguintes.

#### 6.3.5 Fluorescência síncrona

O espectro de fluorescência síncrona pode fornecer informações sobre o ambiente molecular nas proximidades de moléculas cromóforas. O ambiente de resíduos de aminoácidos foi estudado medindo-se a possível mudança no comprimento de onda máximo de emissão ( $\lambda_{max}$ ). A mudança de  $\lambda_{max}$  está relacionada às mudanças de polaridade ao redor da molécula de cromóforo (BYADAGI *et al.*, 2017). Quando o valor da variação de comprimento de onda ( $\Delta\lambda$ ) entre o comprimento de onda de excitação e o comprimento de onda de emissão é estabilizado em 15 nm e 60 nm, a fluorescência síncrona fornece informações características sobre a polaridade do resíduo de tirosina (Tyr) e triptofano (Trp), respectivamente (VEKSHIN, 1996).

A fim de investigar uma possível mudança conformacional foi utilizada a espectroscopia de fluorescência sincronizada para a proteína por adição dos ligantes 1, 4, 5(R) e 7 em pH 4,6 apresentados na *Figura 45*, respectivamente.

Figura 45 - Espectros de fluorescência síncrona de Ricina por adição de ligantes 1, 4, 5(R) e 7



Fonte: Do autor.

Legenda: Condições experimentais em pH 4,6 a 298 K quando  $\Delta\lambda = 60$  nm nas concentrações individuais de ligantes A-F: de 0 a  $2,05 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> com incrementos de  $4,1 \times 10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup>.

A diminuição de intensidade de fluorescência em função da adição de ligantes registrados nos espectros de fluorescência síncronos (*Figura 45*) indica que houve interações de todos os ligantes estudados com a ricina. A principal contribuição para a intensidade de fluorescência da proteína resultou dos resíduos de triptofano, uma vez que a intensidade da fluorescência dos resíduos triptofano foi mais forte do que para os resíduos de tirosina.

Também foi observado na *Figura 45* que não houve alteração significativa na posição do comprimento de onda de emissão máxima para os resíduos de triptofano, sugerindo que os ligantes 1, 4, 5(R) e 7 tem pouco efeito sobre o ambiente desses resíduos. Como a ricina e sua subunidade B possuem 90% dos resíduos de triptofano, os resultados encontrados sugerem que a ligação ocorreu em região distante dos

resíduos de triptofano, o que estaria de acordo com interações ligante-RTA. Entretanto, mais ensaios devem ser realizados visando consolidar a confiabilidade do referido teste.

### 6.3.6 Efeito da temperatura e parâmetros termodinâmicos da interação

Os ligantes selecionados para o estudo do efeito da temperatura e determinação de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  foram 1, 4, 5<sup>(R)</sup> e 7, os quais apresentaram maiores valores de  $K_{sv}$  em pH 4,6 (Tabela 10). Dessa forma, a influência da temperatura na formação do complexo ricina-ligante foi estudada para as moléculas 1, 4, 5(R) e 7 em 15°C, 25°C e 35°C, e seus resultados apresentados na Tabela 13.

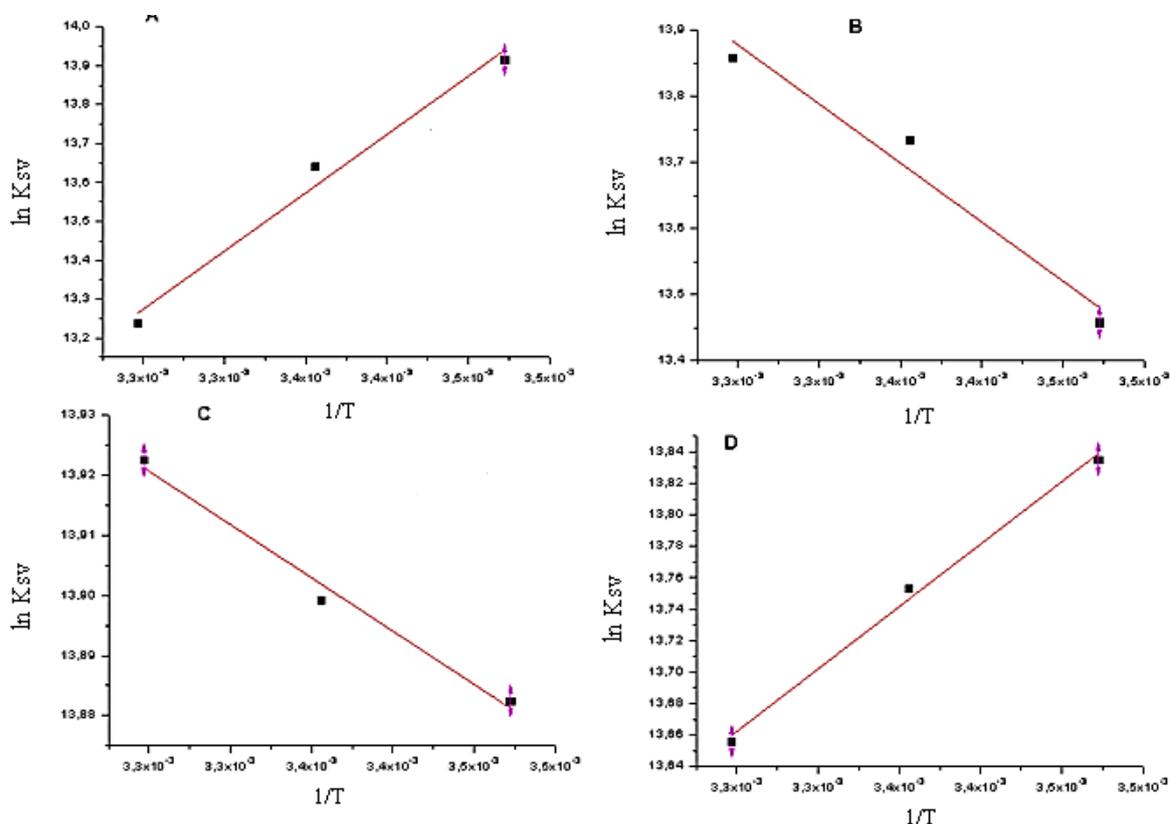
Tabela 13 - Constante de ligação e parâmetros termodinâmicos da interação de ricina e moléculas 1, 4, 7 e 5 (R)

T (K)	Kb [ $\times 10^4 \text{L.mol}^{-1}$ ]			
	Molécula 1	Molécula 4	Molécula 7	Molécula 5 <sup>(R)</sup>
288	110,5 $\pm$ 12,3	69,9 $\pm$ 6,4	106,9 $\pm$ 4,2	102,0 $\pm$ 5,1
298	83,9 $\pm$ 8,4	92,2 $\pm$ 4,0	108,7 $\pm$ 13,7	93,9 $\pm$ 5,4
308	56,1 $\pm$ 3,5	104,5 $\pm$ 11,2	111,3 $\pm$ 7,4	85,3 $\pm$ 6,1

Fonte: Do autor

Os valores obtidos de  $K_{sv}$  para cada temperatura foram utilizados no cálculo de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  usando a equação 18 de Van't Hoff. A representação gráfica de Van't Hoff ( $\ln K_{sv}$  versus  $1/T$ ) informa a dependência linear da constante de ligação com a variação da temperatura em capacidade calorífica constante em que a inclinação da linha reta descreve a entalpia de Van't Hoff (KRIMMER; KLEBE, 2015). Os resultados estão representados na *Figura 46*, e com seus parâmetros termodinâmicos calculados na Tabela 14.

Figura 46 - Dependência da constante de formação do complexo ( $K_b$ ) com a temperatura.  
Moléculas: 1, 4, 7, 5(R)



Fonte: Do autor.

Tabela 14 - Parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  e  $T\Delta S$ ) da interação da ricina com as Moléculas 1, 4, 5 (R) e 7.

Moléculas	$\Delta H$		$\Delta S$	$-T\Delta S$ a 298K
	[kJ.mol <sup>-1</sup> ]	R	[J.mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]	[kJ.mol <sup>-1</sup> ]
1	-24,91 ± 3,2	0,97	29,33 ± 1,1	-8,74 ± 0,33
4	14,85 ± 2,9	0,92	163,71 ± 10	-48,78 ± 2,98
5 <sup>(R)</sup>	-6,59 ± 0,45	0,99	92,09 ± 2	-27,60 ± 0,59
7	1,47 ± 0,17	0,97	120,47 ± 1	-35,90 ± 0,30

Fonte: Do autor.

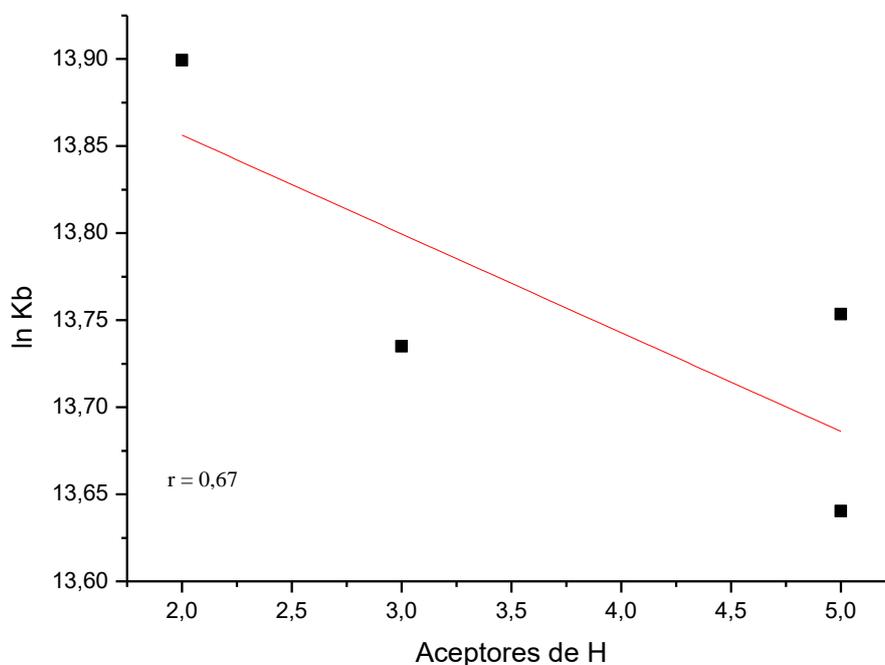
Esses resultados sugerem que os ligantes tiveram mecanismos distintos na complexação com ricina. Enquanto os ligantes 4 e 7 foram endotérmicos na faixa de

temperatura ensaiada (15 - 35 °C), os ligantes 1 e 5 foram exotérmicos (VINCENZI; VARANI; BOREA, 2018).

A Tabela 14 resume os parâmetros termodinâmicos dos ligantes complexados com a ricina, onde as faixas de,  $\Delta H$  e  $\Delta S$  para a interação são apresentadas juntamente com a informação do termo  $-T\Delta S$ . De acordo com os parâmetros obtidos, pode-se observar que para os ligantes 4, 5(R) e 7 o termo entrópico  $T\Delta S$  (por exemplo, em 298K) foi significativamente superior ao termo entálpico  $\Delta H$ , reforçando que formação dos complexos ligante-ricina é favorecida por efeito hidrofóbico (exclusão de solvente), mais do que por ligações de H ou forças eletrostáticas (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). Para o ligante 1, o mecanismo de ligação parece ser entálpico e entropicamente dirigido.

Adicionalmente, contrastarmos o número de aceptores de H para essas estruturas (CHEMICALIZE) com o valor experimental de  $K_{sv}$  obtidos em pH 4,6 (Tabela 10) por uma representação gráfica a seguir (Figura 47).

Figura 47 - Relação da constante de interação do complexo com o descritor de número de acceptor de ligação de hidrogênio



Fonte: Do autor.

Os resultados informam uma correlação inversamente proporcional entre o  $\ln K_b$  e os aceptores de hidrogênio.

Nesta etapa, os ligantes selecionados como alvos para ricina apresentaram valores significativos para as constantes de formação dos complexos ( $K_b$ ,  $56,1 \pm 3,5$  a  $111,3 \pm 7,40 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ ), tal como monitorado por espectrofluorimetria com pico de emissão em 334 nm.

Os valores de variação de energia de Gibbs determinados experimentalmente sugeriram uma complexação maior para os produtos em pH 4,6 do que 7,0. Uma hipótese que justifique o resultado reside na faixa de maior estabilização conformacional da ricina (BUSHUEVA; TONEVITSKY, 1987; FRÉNOY, 1986) e de seu pH ótimo de trabalho para ação N-glicosidase (pH = 5,0) (TAN *et al.*, 2009). Assim, pressupondo-se o caráter competitivo de inibição dos ligantes, então o pH 4,6 utilizado nos ensaios de complexação por fluorescência pode também ter sido mais adequado que o pH 7,0 devido a melhor acomodação conformacional das moléculas candidatas.

A partir de ensaios de temperatura na faixa de 15 a 35 °C, foi possível obter os valores de variação de entalpia e de entropia para a interação. Os parâmetros termodinâmicos obtidos com variação da temperatura sugerem que a formação dos complexos foi entropicamente dirigida, com mecanismo de interação relacionado mais ao efeito hidrofóbico do que a interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio.

## 7 CONCLUSÕES

Tendo em vista o objetivo geral e os objetivos específicos inicialmente propostos para este trabalho, foi possível a elaboração e validação de um método mais simples e com potencial de emprego em campo eletroquímico para detecção de ricina e sua atividade biológica por cinética enzimática, baseado na eletro-oxidação de DNA como único reagente. Também foi avaliada a interação de alguns novos ligantes para ricina por espectrofluorescência, bem com seu potencial inibitório pelo método proposto.

- a) A metodologia utilizada neste trabalho para extração e purificação da ricina obteve pureza satisfatória, possibilitando o uso das frações purificadas nos próximos passos de análise.
- b) O desenvolvimento do ensaio eletroquímico para caracterização de atividade enzimática da ricina apresentou vantagens em comparação aos métodos tradicionais. Entre elas destacam-se a possibilidade de medições em campo, uma vez que os sistemas amperométricos são facilmente miniaturizados, além de não necessitar de modificação ou derivatização do analito para detecção, ou combinação de técnicas para pré-purificação de amostra antes da detecção.
- c) Os ensaios sugerem que a liberação de adenina mediada por ricina exibe um comportamento bifásico de catálise, com um estado pré-estacionário precedendo o comportamento de Michaelis-Menten.
- d) Os inibidores selecionados como alvos para ricina apresentaram inibições superiores aos inibidores obtidos comercialmente e podem representar alternativa promissora na inibição da atividade catalítica da ricina.

Como um todo, os estudos realizados nesse trabalho podem contribuir para as medidas de prevenção e contenção em casos de contaminação com ricina, considerando o novo procedimento para detecção e caracterização de ricina estabelecido nesta monografia, bem como a exploração de novos inibidores da sua ação catalítica.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho inseriu-se em uma colaboração interinstitucional de diversas IES por intermédio da rede Babel de pesquisa para elaboração racional de ligantes para alvos drogáveis (edital Capes nº 051/2013), entre eles a ricina. Assim, as metodologias desenvolvidas até aqui são importantes para os próximos passos do grupo na realização de testes de inibidores para a ricina.

São esperados como próximos passos deste trabalho:

- a) Estudo da interação e atividade enzimática de RTA isolada a partir da ricina e/ou obtido por síntese em cianobactéria junto á rede Babel de pesquisa, sobre os candidatos a inibidores avaliados;
- b) Ensaio de inibição com novos candidatos a inibidores elaborados pela rede Babel a partir dos resultados obtidos até o presente momento.

## REFERÊNCIAS

- ABBASPOUR, A.; NOORI, A. Electrochemical studies on the oxidation of guanine and adenine at cyclodextrin modified electrodes. **The Analyst**, [s. l.], v. 133, n. 12, p. 1664, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1039/b806920d>
- ADI, B.-D. *et al.* **DETECTION OF EXPOSURE TO RIP II TOXINS**. EP18171428A. Concessão: 2018.
- ANDERSON, G. P. *et al.* Single domain antibody-quantum dot conjugates for ricin detection by both fluoroimmunoassay and surface plasmon resonance. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 786, p. 132–138, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.05.010>
- ARGENT, R. H. *et al.* Introduction of a disulfide bond into ricin A chain decreases the cytotoxicity of the ricin holotoxin. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 269, n. 43, p. 26705–26710, 1994.
- BAHUGUNA, A. *et al.* MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 115–118, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3329/bjpv.v12i2.30892>
- BAR-EVEN, A. *et al.* The moderately efficient enzyme: Evolutionary and physicochemical trends shaping enzyme parameters. **Biochemistry**, [s. l.], v. 50, n. 21, p. 4402–4410, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi2002289>
- BARBIER, J. *et al.* Inhibitors of the cellular trafficking of ricin. **Toxins**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 15–27, 2012. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins4010015>
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods. Fundamentals and applications**. 2 ed. Nova York: John Wiley & Sons, 2000.
- BECHER, F. *et al.* Detection of Functional Ricin by Immunoaffinity and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 79, n. 2, p. 659–665, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac061498b>
- BEVILACQUA, V. L. H. *et al.* Ricin activity assay by direct analysis in real time mass spectrometry detection of adenine release. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 798–800, 2010a. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac9025972>
- BEVILACQUA, V. L. H. *et al.* Ricin Activity Assay by Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry Detection of Adenine Release. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 798–800, 2010b. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac9025972>
- BEYER, N. H. *et al.* A mouse model for ricin poisoning and for evaluating protective effects of antiricin antibodies. **Clinical Toxicology**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 219–225, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1080/15563650802716521>
- BEZERRA, R. M. F.; DIAS, A. A. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis: Inhibition

by ethanol and cellobiose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 49–59, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12010-005-0005-5>

BISSWANGER, H. **Enzyme kinetics**. Weinheim: John Wiley & Sons, 2008. v. 6.

BLOME, M. C.; PETRO, K. A.; SCHENGRUND, C.-L. Surface plasmon resonance analysis of ricin binding to plasma membranes isolated from NIH 3T3 cells. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 396, n. 2, p. 212–216, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.09.049>

BOZZA, W. P. *et al.* Ricin detection: Tracking active toxin. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 117–123, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.11.012>

BRIGOTTI, M. *et al.* A rapid and sensitive method to measure the enzymatic activity of ribosome-inactivating proteins. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 26, n. 18, p. 4306–4307, 1998. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/26.18.4306>

BUSHUEVA, T. L.; TONEVITSKY, A. G. The effect of pH on the conformation and stability of the structure of plant toxin - ricin. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 215, n. 1, p. 155–159, 1987. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80132-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80132-1)

BYADAGI, K. *et al.* Investigation of binding behaviour of procainamide hydrochloride with human serum albumin using synchronous, 3D fluorescence and circular dichroism. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 103–109, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.07.004>

CAMPOS, A. R. *et al.* Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Detection of Ricin B Chain in Human Blood. **The Journal of Physical Chemistry C**, [s. l.], v. 120, n. 37, p. 20961–20969, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b03027>

CER, R. Z. *et al.* IC50-to-Ki: a web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 37, n. Web Server, p. W441–W445, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkp253>

CHANG, J. *et al.* Carboxymethyl cellulose assisted preparation of water-processable halloysite nanotubular composites with carboxyl-functionalized multi-carbon nanotubes for simultaneous voltammetric detection of uric acid, guanine and adenine in biological samples. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 780, p. 103–113, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.09.013>

COMPTON, R. G.; BANKS, C. E. **Understanding Voltammetry**. 2 ed. London: Imperial College Press, 2011.

CORNISH-BOWDEN, A. Analysis and interpretation of enzyme kinetic data. **Perspectives in Science**, [s. l.], v. 1, n. 1–6, p. 121–125, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.010>

DANIEL, J. *et al.* Electrochemical Aptamer Scaffold Biosensors for Detection of

Botulism and Ricin Proteins. *In*: [S. l.: s. n.], 2017. p. 9–23. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6958-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6958-6_2)

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1590/s0100-40422003000100015>

DOAN, L. G. Ricin: Mechanism of toxicity, clinical manifestations, and vaccine development. A review. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 201–208, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1081/CLT-120030945>

DORSEY, R.; EMMETT, G.; SALEM, H. **Ricin**. [S. l.: s. n.], 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800159-2.00027-0>

DURACOVA, M. *et al.* Proteomic methods of detection and quantification of protein Toxins. **Toxins**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 99, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins10030099>

DYER, P. D. R. *et al.* An in vitro evaluation of epigallocatechin gallate (eGCG) as a biocompatible inhibitor of ricin toxin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 1860, n. 7, p. 1541–1550, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.024>

ELGRISHI, N. *et al.* A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>

ENSAFI, A. A. *et al.* Simultaneous determination of guanine and adenine in DNA based on NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles decorated MWCNTs as a novel electrochemical sensor using adsorptive stripping voltammetry. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s. l.], v. 177, p. 634–642, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.11.028>

ESTEBAN-FERNÁNDEZ DE ÁVILA, B. *et al.* Aptamer-Modified Graphene-Based Catalytic Micromotors: Off-On Fluorescent Detection of Ricin. **ACS Sensors**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 217–221, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1021/acssensors.5b00300>

FAN, J.-R. *et al.* Plasmonic Metasurfaces Based on Nanopin-Cavity Resonator for Quantitative Colorimetric Ricin Sensing. **Small**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1601710, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1002/smll.201601710>

FAN, Y. *et al.* TiO<sub>2</sub>-graphene nanocomposite for electrochemical sensing of adenine and guanine. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 56, n. 12, p. 4685–4690, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.02.114>

FERNANDES, K. H. A. A. *et al.* Considerações técnicas quanto ao uso da voltametria de varredura escalonada em processos adsorptivos. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 431–435, 2015. Available at: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140317>

FREITAS, P. G. *et al.* Mangiferin binding to serum albumin is non-saturable and induces conformational changes at high concentrations. **Journal of Luminescence**, [s. l.], v. 132, n. 11, p. 3027–3034, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2012.06.020>

FRÉNOY, J. P. Effect of physical environment on the conformation of ricin. Influence of low pH. **The Biochemical journal**, [s. l.], v. 240, n. 1, p. 221–226, 1986. Available at: <https://doi.org/10.1042/bj2400221>

FURTADO, R. F. *et al.* **PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DE ELETRODO IMPRESSO DE TINTA DE CARBONO, ELETRODO IMPRESSO MODIFICADO DE TINTA DE CARBONO, USO DE ELETRODO IMPRESSO MODIFICADO DE TINTA DE CARBONO, SISTEMA BIOSENSOR ELETROQUÍMICO, USO DE SISTEMA BIOSENSOR ELETROQUÍMICO**. BR 10 2012 021218 8 A2. Concessão: 2014.

GAIGALAS, A. K. *et al.* Photophysical properties of ricin. **Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], v. 83, n. 5, p. 1149–1156, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00091.x>

GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 94, n. 1–2, p. 57–63, 1986. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90215-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90215-2)

GILMARTIN, M. A. T.; HART, J. P. Comparative study of the voltammetric behaviour of guanine at carbon paste and glassy carbon electrodes and its determination in purine mixtures by differential-pulse voltammetry. **The Analyst**, [s. l.], v. 117, n. 10, p. 1613, 1992. Available at: <https://doi.org/10.1039/an9921701613>

GODAL, A.; OLSNES, S.; PIHL, A. Radioimmunoassays of abrin and ricin in blood. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 409–417, 1981. Available at: <https://doi.org/10.1080/15287398109530079>

GOMES, F. H. T. *et al.* Consumo, comportamento e desempenho em ovinos alimentados com dietas contendo torta de mamona. **Revista Ciencia Agronomica**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 182–190, 2017. Available at: <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170021>

GORE, M. G. **Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach**. New York: Oxford University, 2000.

GUGLIELMO-VIRET, V.; THULLIER, P. Comparison of an electrochemiluminescence assay in plate format over a colorimetric ELISA, for the detection of ricin B chain (RCA-B). **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 328, n. 1–2, p. 70–78, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.08.003>

HABIBI, B.; JAHANBAKHSI, M. A glassy carbon electrode modified with carboxylated diamond nanoparticles for differential pulse voltammetric simultaneous determination of guanine and adenine. **Microchimica Acta**, [s. l.], v. 183, n. 7, p. 2317–2325, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1868-6>

HALE, M. L. Microtiter-based assay for evaluating the biological activity of ribosome-inactivating proteins. **Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 88, n. 5, p. 255–260, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.2001.880506.x>

HARVEY, D. Analytical Chemistry 2.0—an open-access digital textbook. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 399, n. 1, p. 149–152, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4316-1>

HE, X. Current Technologies for the Detection of Ricin in Different Matrices. *In*: HE, X. (org.). **Ricin Toxin**. [S. l.]: BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2014. p. 38–56. Available at: <https://doi.org/10.2174/9781608058785114010006>

HE, X. *et al.* Development of a novel immuno-PCR assay for detection of ricin in ground beef, liquid chicken egg, and milk. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 695–700, 2010. Available at: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.4.695>

HE, X. *et al.* Effect of food matrices on the biological activity of ricin. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 71, n. 10, p. 2053–2058, 2008. Available at: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.10.2053>

HEISLER, I. *et al.* A colorimetric assay for the quantitation of free adenine applied to determine the enzymatic activity of ribosome-inactivating proteins. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 302, n. 1, p. 114–122, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5527>

HELEN, C. L. *et al.* **METHODS AND SYSTEMS FOR THE DETECTION OF RICIN AND OTHER RIBOSOME INACTIVATING PROTEINS**. KR20147026232A. Concessão: 2014.

HINES, H. B.; BRUEGGEMANN, E. E.; HALE, M. L. High-performance liquid chromatography-mass selective detection assay for adenine released from a synthetic RNA substrate by ricin A chain. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 330, n. 1, p. 119–122, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.03.046>

HINSCH, B.; KULA, M.-R. Reaction kinetics of some important site-specific endonucleases. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 9, n. 13, p. 3159–3174, 1981. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/9.13.3159>

HUANG, K.-J. *et al.* Novel electrochemical sensor based on functionalized graphene for simultaneous determination of adenine and guanine in DNA. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 543–549, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.014>

HUANG, K. J. *et al.* Novel electrochemical sensor based on functionalized graphene for simultaneous determination of adenine and guanine in DNA. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 543–549, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.014>

HUEBNER, M. *et al.* A Glyco-chip for the detection of ricin by an automated

chemiluminescence read-out system. **Analytical Sciences**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 461–466, 2013. Available at: <https://doi.org/10.2116/analsci.29.461>

JANKOWSKA-ŚLIWIŃSKA, J. *et al.* Comparison of electrochemical determination of purines and pyrimidines by means of carbon, graphite and gold paste electrodes. **International Journal of Electrochemical Science**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 2329–2343, 2017. Available at: <https://doi.org/10.20964/2017.03.16>

JASHEWAY, K. *et al.* Structure-based design of ricin inhibitors. **Toxins**, [s. l.], v. 3, n. 10, p. 1233–1248, 2011. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins3101233>

JEFFREY, J. L. *et al.* Dioxolane guanosine 5'-triphosphate, an alternative substrate inhibitor of wild-type and mutant HIV-1 reverse transcriptase. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 21, p. 18971–18979, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M210113200>

JOHNSON, K. A. **Transient-state kinetic analysis of enzyme reaction pathways**. [S. l.: s. n.], 1992. v. XX Available at: [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(08\)60019-0](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(08)60019-0)

KALB, S. R. *et al.* Recommended mass spectrometry-based strategies to identify ricin-containing samples. **Toxins**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 4881–4894, 2015. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins7124854>

KALB, S. R.; BARR, J. R. Ricin Analysis. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, [s. l.], p. 1–26, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9388>

KANAMORI-KATAOKA, M. *et al.* Determination of ricin by nano liquid chromatography/mass spectrometry after extraction using lactose-immobilized monolithic silica spin column. **Journal of Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 46, n. 8, p. 821–829, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1002/jms.1953>

KARIMI-MALEH, H. *et al.* Surface amplification of pencil graphite electrode with polypyrrole and reduced graphene oxide for fabrication of a guanine/adenine DNA based electrochemical biosensors for determination of didanosine anticancer drug. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 441, p. 55–60, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.01.237>

KAUR, R.; BHASKAR, T. Potential of castor plant (*Ricinus communis*) for production of biofuels, chemicals, and value-added products. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 269–310. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818228-4.00011-3>

KEENER, W. K.; WARD, T. E. **Activity-based assay for ricin-like toxins**. US2006/0057596 A1. Concessão: 2007.

KHAN, I. *et al.* Recent advances in the structural library of functionalized quinazoline and quinazolinone scaffolds: Synthetic approaches and multifarious applications. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 76, p. 193–244, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.005>

KRIMMER, S. G.; KLEBE, G. Thermodynamics of protein-ligand interactions as a

reference for computational analysis: How to assess accuracy, reliability and relevance of experimental data. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 867–883, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10822-015-9867-y>

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [s. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. Available at: <https://doi.org/10.1038/227680a0>

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3 ed. New York: Springer Science, 2013.

LAMONT, E. A. *et al.* A single DNA aptamer functions as a biosensor for ricin. **Analyst**, [s. l.], v. 136, n. 19, p. 3884–3895, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1039/c1an15352h>

LANGER, M. *et al.* A nonradioactive assay for ribosome-inactivating proteins. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 243, n. 1, p. 150–153, 1996. Available at: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0493>

LEGLER, P. M. *et al.* Stability of isolated antibody-antigen complexes as a predictive tool for selecting toxin neutralizing antibodies. **mAbs**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 43–57, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1236882>

LI, C. H. *et al.* A graphene oxide-based strand displacement amplification platform for ricin detection using aptamer as recognition element. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 91, p. 149–154, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.010>

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 658–666, 1934. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>

LING, J.; LIU, W. Y.; WANG, T. P. Radioassay for RNA N-Glycosidase with Tritium-Labeled Sodium Borohydride or Amino Acid. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 395–404, 1994. Available at: <https://doi.org/10.1006/bioo.1994.1033>

LIU, H.-Z. *et al.* Galactose-functionalized Magnetic Iron-oxide Nanoparticles for Enrichment and Detection of Ricin Toxin. **Analytical Sciences**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 19–24, 2011a. Available at: <https://doi.org/10.2116/analsci.27.19>

LIU, T. *et al.* Simultaneous determination of adenine and guanine utilizing PbO<sub>2</sub>-carbon nanotubes-ionic liquid composite film modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 651, n. 2, p. 216–221, 2011b. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2010.11.026>

LIU, X. *et al.* A highly sensitive method for determination of guanine, adenine and epinephrine using poly-melamine film modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 675, p. 47–53, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.04.026>

LULKA, M. F. *et al.* Molecular imprinting of ricin and its A and B chains to organic silanes: fluorescence detection. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 101–105, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(00\)00129-6](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(00)00129-6)

MANIKANDAN, R.; DEEPA, P. N.; NARAYANAN, S. S. Simultaneous electrochemical determination of adenine and guanine using poly 2-naphthol orange film–modified electrode. **Ionics**, [s. l.], 2019. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11581-019-03279-9>

MCGRATH, S. C. *et al.* Detection and quantification of ricin in beverages using isotope. [s. l.], p. 2897–2905, 2011.

MEI, Q. *et al.* Ricin detection by biological signal amplification in a well-in-a-well device. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 78, n. 22, p. 7659–7664, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac0610006>

MELCHIOR, W. B.; TOLLESON, W. H. A functional quantitative polymerase chain reaction assay for ricin, Shiga toxin, and related ribosome-inactivating proteins. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 396, n. 2, p. 204–211, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.09.024>

MEN, J. *et al.* Detection of residual toxin in tissues of ricin-poisoned mice by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoprecipitation. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 401, n. 2, p. 211–216, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.02.033>

MEYER, B. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, [s. l.], v. 45, n. 05, p. 31–34, 1982. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>

MIRCESKI, V. *et al.* Square-wave voltammetry: a review on the recent progress. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 2411–2422, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1002/elan.201300369>

MOLAEI, H. *et al.* A combined computational/experimental study on HSA binding of two water-soluble Schiff base ligands derived from pyridine derivative and ethylenediamine. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 641–648, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1436091>

MOSHIRI, M.; HAMID, F.; ETEMAD, L. Ricin toxicity: clinical and molecular aspects. **Reports of biochemistry & molecular biology**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 60–65, 2016. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27536698> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4986263>

MUBOFU, E. B. Castor oil as a potential renewable resource for the production of functional materials. **Sustainable Chemical Processes**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–12, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0055-8>

NAGATSUKA, T. *et al.* Localized surface plasmon resonance detection of biological toxins using cell surface oligosaccharides on glyco chips. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 4173–4180, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1021/am4002937>

NARANG, U. *et al.* Fiber optic-based biosensor for ricin. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 12, n. 9–10, p. 937–945, 1997. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(97\)00027-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(97)00027-4)

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5 ed. New York: [s. n.], 2008.

NGO, N. T. *et al.* Effects of ricin extracted from seeds of the castor bean (*ricinus communis*) on cytotoxicity and tumorigenesis of melanoma cells. **Biomedical Research and Therapy**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 633–644, 2016. Available at: <https://doi.org/10.7603/s40730-016-0023-7>

NIKITAS, P. *et al.* Multilinear gradient elution optimization in reversed-phase liquid chromatography based on logarithmic retention models: Application to separation of a set of purines, pyrimidines and nucleosides. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1218, n. 33, p. 5658–5663, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.084>

NIU, X. *et al.* Electrochemical behaviors and simultaneous determination of guanine and adenine based on graphene–ionic liquid–chitosan composite film modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 80, p. 346–353, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.07.041>

OLIVEIRA-BRETT, A. M. *et al.* Voltammetric determination of all DNA nucleotides. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 332, n. 2, p. 321–329, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.06.021>

OSARUMWENSE, P. O.; USIFOH, M. O. O. Synthesis and anti-Inflammatory activity of 4 ( 3H ) - quinazolinone and Its 2-methyl and 2-phenyl-4 ( 3H ) - Quinazolinone Derivatives. **IOSR J Appl Chem**, v. 11, p. 12-15, 2018. Available at: <https://doi.org/10.9790/5736-1104011215>

PACHECO, W. F. *et al.* Voltammetry: a brief review about concepts. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013. Available at: <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130040>

PAULY, D. *et al.* Real-time cytotoxicity assay for rapid and sensitive detection of ricin from complex matrices. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 4, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035360>

PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 673–675, 1996a. Available at: <https://doi.org/10.1002/elan.1140080713>

PERIYAKARUPPAN, A. *et al.* Detection of ricin using a carbon nanofiber based biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 428–433, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.061>

PINTO, M. F.; MARTINS, P. M. In search of lost time constants and of non-Michaelis–Menten parameters. **Perspectives in Science**, [s. l.], v. 9, p. 8–16, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2016.03.024>

POLI, M. A. *et al.* Detection of ricin by colorimetric and chemiluminescence ELISA. **Toxicon**, [s. l.], v. 32, n. 11, p. 1371–1377, 1994. Available at: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90409-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90409-X)

POLITO, L. *et al.* Ricin: an ancient story for a timeless plant toxin. **Toxins**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1–16, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins11060324>

PRADHAN, S. *et al.* Nanosized iron telluride for simultaneous nanomolar voltammetric determination of dopamine, uric acid, guanine and adenine. **New Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 43, n. 26, p. 10590–10600, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1039/c9nj02329a>

PRUET, J. M. *et al.* 7-Substituted pterins provide a new direction for ricin A chain inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 46, n. 9, p. 3608–3615, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.05.025>

RAMAKRISHNAN, S.; EAGLE, M. R.; HOUSTON, L. L. Radioimmunoassay of ricin A- and B-chains applied to samples of ricin A-chain prepared by chromatofocusing and by DEAE Bio-Gel A. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 719, n. 2, p. 341–348, 1982. Available at: [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(82\)90108-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(82)90108-8)

RASHIDIPOUR, S.; NAEEMINEJAD, S.; CHAMANI, J. Study of the interaction between DNP and DIDS with human hemoglobin as binary and ternary systems: spectroscopic and molecular modeling investigation. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 57–77, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1009946>

RIBEIRO, W. F. *et al.* Electrochemical study of ricin at glassy carbon electrode. [s. l.], **Analyst**, v. 138, n. 16, p. 4565–4573, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1039/c3an00227f>

RIBEIRO, W. F.; COSTA, J. E.; LOURENC, A. S. Adsorptive stripping voltammetric determination of trace level ricin in castor seeds using a boron-doped diamond electrode. [s. l.]: **Electroanalysis**, v. 29, n. 7, p. 1783–1793, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1002/elan.201700100>

RISS, T. L. *et al.* Cell viability assays. **Assay Guidance Manual**, [s. l.], n. Md, p. 1–25, 2004. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>

RODAY, S.; SCHRAMM, V. L. **COMPOUNDS AND METHODS FOR DETECTING**

**RICIN AND USES THEREOF.** WO2008105796A2. Concessão: 2008.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 3096–3102, 1981. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>

RUAN, C. *et al.* A Magnetoelastic ricin immunosensor. **Sensor Letters**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 138–144, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1166/sl.2004.041>

RUDOLPH, M. J. *et al.* Structural analysis of single domain antibodies bound to a second neutralizing hot spot on ricin toxin's enzymatic subunit. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 292, n. 3, p. 872–883, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.758102>

RUTENBER, E.; ROBERTUS, J. D. Structure of ricin B-chain at 2.5 Å resolution. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 260–269, 1991. Available at: <https://doi.org/10.1002/prot.340100310>

SAITO, R. *et al.* Peptide-conjugated pterins as inhibitors of Ricin Toxin A. **J Med Chem**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

SAITO, R. *et al.* Peptide-conjugated pterins as inhibitors of ricin toxin A. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 320–329, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1021/jm3016393>

SEHGAL, P. *et al.* Purification, characterization and toxicity profile of ricin isoforms from castor beans. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 48, n. 11, p. 3171–3176, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.015>

SHARIFIFAR, F.; ASSADIPOUR, A.; MOSHAFI, M. Bioassay screening of the essential oil and various extracts of nigella sativa L. seeds using brine shrimp toxicity assay. **Herbal Medicines**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1–6, 2017. Available at: <https://doi.org/10.22087/HMJ.V1I2.578>

SHIA, W. W.; BAILEY, R. C. Single domain antibodies for the detection of ricin using silicon photonic microring resonator arrays. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 805–810, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac3030416>

SHYU, H.-F. *et al.* Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detection of ricin. **Hybridoma and Hybridomics**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 69–73, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1089/15368590252917665>

SHYU, R.-H. *et al.* Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin. **Toxicon**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 255–258, 2002. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00193-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00193-3)

SIMMONS, B. M.; RUSSELL, J. H. A single affinity column step method for the purification of ricin toxin from castor beans (*Ricinus communis*). **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 146, n. 1, p. 206–210, 1985. Available at:

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90417-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90417-8)

SIMONOVA, M. A. *et al.* Development of xMAP assay for detection of six protein toxins. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 84, n. 15, p. 6326–6330, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac301525q>

SINHA, S.; SINGH, J. Classification, causes, control measures and acts of bioterrorism. **International journal of applied biology and pharmaceutical technology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 342–355, 2016.

SMALLSHAW, J. E.; RICHARDSON, J. A.; VITETTA, E. S. RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, protects mice against ricin delivered by gavage or aerosol. **Vaccine**, [s. l.], v. 25, n. 42, p. 7459–7469, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.08.018>

SMITH, D. L.; ELVING, P. J. Analytical Utilization of the Polarographic and Voltammetric Behavior of Purines and Pyrimidines. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. 930–936, 1962. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac60188a017>

STECHMANN, B. *et al.* Inhibition of retrograde transport protects mice from lethal ricin challenge. **Cell**, [s. l.], v. 141, n. 2, p. 231–242, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.043>

STURM, M. B.; SCHRAMM, V. L. Detecting Ricin: Sensitive Luminescent Assay for Ricin A-Chain Ribosome Depurination Kinetics. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 81, n. 8, p. 2847–2853, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac8026433>

TAN, Q. Q. *et al.* Comparative analysis of depurination catalyzed by ricin A-chain on synthetic 32mer and 25mer oligoribonucleotides mimicking the sarcin/ricin domain of the rat 28S rRNA and E. coli 23S rRNA. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 139, n. 2, p. 156–162, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.005>

TANG, L. *et al.* Kinetic mechanism and enantioselectivity of halohydrin dehalogenase from agrobacterium radiobacter. **Biochemistry**, [s. l.], v. 42, n. 18, p. 5378–5386, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi0273361>

TOKARSKY, E. J. *et al.* Pre-steady-state kinetic investigation of bypass of a bulky guanine lesion by human Y-family DNA polymerases. **DNA Repair**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 20–28, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.08.002>

TRNKOVA, L. *et al.* Study of Copper and Purine-Copper Complexes on Modified Carbon Electrodes by Cyclic and Elimination Voltammetry. **Sensors**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 429–444, 2008. Available at: <https://doi.org/10.3390/s8010429>

TUMER, N. E. Introduction to the Toxins Special Issue “Ricin Toxins”. **Toxins**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 13, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins12010013>

TUMER, N. E.; LI, X.-P. Interaction of Ricin and Shiga Toxins with Ribosomes. *In*: **RICIN AND SHIGA TOXINS**. 1 ed. Berlin: Springer, 2011. v. 37, p. 1–18. Available at: [https://doi.org/10.1007/82\\_2011\\_174](https://doi.org/10.1007/82_2011_174)

VALEUR, B. **Molecular fluorescence: principles and applications**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH, 2012.

VAN DE WEERT, M.; STELLA, L. Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 998, n. 1–3, p. 144–150, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2011.05.023>

VANCE, D. J.; MANTIS, N. J. Progress and challenges associated with the development of ricin toxin subunit vaccines. **Expert review of vaccines**, [s. l.], v. 176, n. 1, p. 139–148, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

VEKSHIN, I. L. Separation of the tyrosine and tryptophan components of fluorescence using synchronous scanning method]. **Biofizika**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 1176–1179, 1996. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/9044614>

VINCENZI, F.; VARANI, K.; BOREA, P. A. Binding thermodynamic characteristics of adenosine receptor ligands. **Receptors**, [s. l.], v. 34, p. 199–215, 2018. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-90808-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-90808-3_8)

WAHOME, P. G. *et al.* Identification of small-molecule inhibitors of ricin and shiga toxin using a cell-based high-throughput screen. **Toxicon**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 313–323, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.016>

WANG, H.-S.; JU, H.-X.; CHEN, H.-Y. Simultaneous determination of guanine and adenine in DNA using an electrochemically pretreated glassy carbon electrode. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 461, n. 2, p. 243–250, 2002a. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00297-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00297-0)

WANG, H.-S.; JU, H.-X.; CHEN, H.-Y. Simultaneous determination of guanine and adenine in DNA using an electrochemically pretreated glassy carbon electrode. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 461, n. 2, p. 243–250, 2002b. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00297-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00297-0)

WANG, H. X. *et al.* Design, synthesis, antiproliferative and antibacterial evaluation of quinazolinone derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 203–214, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00044-018-2276-8>

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. 2 ed. New York: Wiley-VCH, 2000. ISSN 1098-6596. v. 53 Available at: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

WANG, P.; REN, J. Separation of purine and pyrimidine bases by capillary electrophoresis using  $\beta$ -cyclodextrin as an additive. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 277–283, 2004. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00502-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00502-8)

WEINGART, O. G. *et al.* A bioanalytical platform for simultaneous detection and

quantification of Biological Toxins. **Sensors**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 2324–2339, 2012. Available at: <https://doi.org/10.3390/s120202324>

WOODWARD, J. Enzyme technology. **Biochemical Education**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 106, 1990. Available at: [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(90\)90200-8](https://doi.org/10.1016/0307-4412(90)90200-8)

XIAO, X. *et al.* Exonuclease III-assisted graphene oxide amplified fluorescence anisotropy strategy for ricin detection. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 85, p. 822–827, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.091>

YAN, X. *et al.* Structure-based identification of a ricin inhibitor. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 266, n. 5, p. 1043–1049, 1997. Available at: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0865>

YANG, F. Q. *et al.* Determination of nucleosides and nucleobases in different species of Cordyceps by capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 307–314, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.04.027>

YAO, T.; WASA, T.; MUSHA, S. Linear-sweep voltammetry and the simultaneous determination of purine bases and their nucleosides in the glassy carbon electrode. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, [s. l.], v. 50, n. 11, p. 2917–2920, 1977. Available at: <https://doi.org/10.1246/bcsj.50.2917>

YIN, H. *et al.* Electrochemical oxidation behavior of guanine and adenine on graphene–Nafion composite film modified glassy carbon electrode and the simultaneous determination. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 45, n. 10, p. 1707–1712, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.004>

YU, H. Detection of biological threat agents by immunomagnetic microsphere-based solid phase fluorogenic- and electro-chemiluminescence. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 14, n. 10–11, p. 829–840, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(99\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(99)00068-8)

YUN, S.-L.; SUELTER, C. H. A simple method for calculating  $K_m$  and  $V$  from a single enzyme reaction progress curve. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology**, [s. l.], v. 480, n. 1, p. 1–13, 1977. Available at: [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(77\)90315-1](https://doi.org/10.1016/0005-2744(77)90315-1)

ZAMBONI, M. *et al.* High-pressure-liquid-chromatographic and fluorimetric methods for the determination of adenine released from ribosomes by ricin and gelonin. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 259, n. 3, p. 639–643, 1989a. Available at: <https://doi.org/10.1042/bj2590639>

ZHANG, J. *et al.* Electrochemical detection of adenine and guanine using a three-dimensional WS<sub>2</sub> nanosheet/graphite microfiber hybrid electrode. **Electrochemistry Communications**, [s. l.], v. 99, p. 75–80, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.01.007>

ZHANG, S. *et al.* Simultaneous voltammetric determination of guanine and adenine

using MnO<sub>2</sub> nanosheets and ionic liquid-functionalized graphene combined with a permeation-selective polydopamine membrane. **Microchimica Acta**, [s. l.], v. 186, n. 7, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3577-4>

ZHUANG, J. *et al.* Silica coating magnetic nanoparticle-based silver enhancement immunoassay for rapid electrical detection of ricin toxin. **Toxicon**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 145–152, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.015>

## ANEXO A – PARECER TÉCNICO N° 01/2015



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



## Comissão Permanente de Prevenção e Controle de Riscos Ambientais – UNIFAL-MG

COORDENADOR: Alexssandro Ramos da Cruz

**Membros:** Adriano Francisco Barbosa  
Clério Sabino da Silva  
José Antônio Ramos

*PARECER TÉCNICO N° 01/2015.*  
*24 de abril de 2015*

***ASSUNTO:***

*Pesquisa envolvendo o manuseio da ticina*

*Análise dos procedimentos relacionados à biossegurança.*

## ANEXO B – CR Nº28378 (RELAÇÃO DE PRODUTOS CONTROLADOS)



**MINISTÉRIO DA DEFESA  
EXÉRCITO BRASILEIRO  
COMANDO MILITAR DO LESTE  
4ª REGIÃO MILITAR  
(4º DISTRITO MILITAR / 1891)  
REGIÃO DAS MINAS DO OURO**

ANEXO AO CERTIFICADO DE REGISTRO nº 28378 - nº SIGMA 28378 - SFPC 4º RM  
PROPRIETÁRIO: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

### RELAÇÃO DE PRODUTOS CONTROLADOS

Nº ORD.	GRUPO	DESCRIÇÃO DO PRODUTO	QTD MAX	UND. MDD	ATIVIDADE
0080	PGQ	ÁCIDO FLUORÍDRICO (FLUORETO DE HIDROGÊNIO)	20	L	AQUISIÇÃO (COMPRA)
0080	PGQ	ÁCIDO FLUORÍDRICO (FLUORETO DE HIDROGÊNIO)	20	L	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)
0080	PGQ	ÁCIDO FLUORÍDRICO (FLUORETO DE HIDROGÊNIO)	20	L	DISTRIBUIÇÃO
0080	PGQ	ÁCIDO FLUORÍDRICO (FLUORETO DE HIDROGÊNIO)	20	L	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL
0110	QM	ÁCIDO PERCLÓRICO	40	L	AQUISIÇÃO (COMPRA)
0110	QM	ÁCIDO PERCLÓRICO	40	L	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)
0110	QM	ÁCIDO PERCLÓRICO	40	L	DISTRIBUIÇÃO
0110	QM	ÁCIDO PERCLÓRICO	40	L	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL
0130	EX	ÁCIDO PÍCRICO (TRINITROFENOL)	20	KG	AQUISIÇÃO (COMPRA)
0130	EX	ÁCIDO PÍCRICO (TRINITROFENOL)	20	KG	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)
0130	EX	ÁCIDO PÍCRICO (TRINITROFENOL)	20	KG	DISTRIBUIÇÃO
0130	EX	ÁCIDO PÍCRICO (TRINITROFENOL)	20	KG	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL
0190	QM	ALUMÍNIO EM PÓ E SUAS LIGAS	15	KG	AQUISIÇÃO (COMPRA)
0190	QM	ALUMÍNIO EM PÓ E SUAS LIGAS	15	KG	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)
0190	QM	ALUMÍNIO EM PÓ E SUAS LIGAS	15	KG	DISTRIBUIÇÃO
0190	QM	ALUMÍNIO EM PÓ E SUAS LIGAS	15	KG	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL
0200	GQ	AMINOFENOL	10	KG	AQUISIÇÃO (COMPRA)
0200	GQ	AMINOFENOL	10	KG	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)
0200	GQ	AMINOFENOL	10	KG	DISTRIBUIÇÃO
0200	GQ	AMINOFENOL	10	KG	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL
0390	QM	AZIDA DE SÓDIO	10	KG	AQUISIÇÃO (COMPRA)
0390	QM	AZIDA DE SÓDIO	10	KG	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)
0390	QM	AZIDA DE SÓDIO	10	KG	DISTRIBUIÇÃO
0390	QM	AZIDA DE SÓDIO	10	KG	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL
0430	PGQ	BIFLUORETO DE AMÔNIO (HIDROGENO FLUORETO DE AMÔNIO)	20	KG	AQUISIÇÃO (COMPRA)
0430	PGQ	BIFLUORETO DE AMÔNIO (HIDROGENO FLUORETO DE AMÔNIO)	20	KG	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)
0430	PGQ	BIFLUORETO DE AMÔNIO (HIDROGENO FLUORETO DE AMÔNIO)	20	KG	DISTRIBUIÇÃO
0430	PGQ	BIFLUORETO DE AMÔNIO (HIDROGENO FLUORETO DE AMÔNIO)	20	KG	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL
0440	PGQ	BIFLUORETO DE POTÁSSIO (HIDROGENO FLUORETO DE POTÁSSIO)	10	KG	AQUISIÇÃO (COMPRA)
0440	PGQ	BIFLUORETO DE POTÁSSIO (HIDROGENO FLUORETO DE POTÁSSIO)	10	KG	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)
0440	PGQ	BIFLUORETO DE POTÁSSIO (HIDROGENO FLUORETO DE POTÁSSIO)	10	KG	DISTRIBUIÇÃO
0440	PGQ	BIFLUORETO DE POTÁSSIO (HIDROGENO FLUORETO DE POTÁSSIO)	10	KG	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL
0450	PGQ	BIFLUORETO DE SÓDIO (HIDROGENO FLUORETO DE SÓDIO)	10	KG	AQUISIÇÃO (COMPRA)
0450	PGQ	BIFLUORETO DE SÓDIO (HIDROGENO FLUORETO DE SÓDIO)	10	KG	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)

## CONTINUAÇÃO DA RELAÇÃO DE PRODUTOS CONTROLADOS DO CR n° 28378 - n° SIGMA 28378 - Página 2

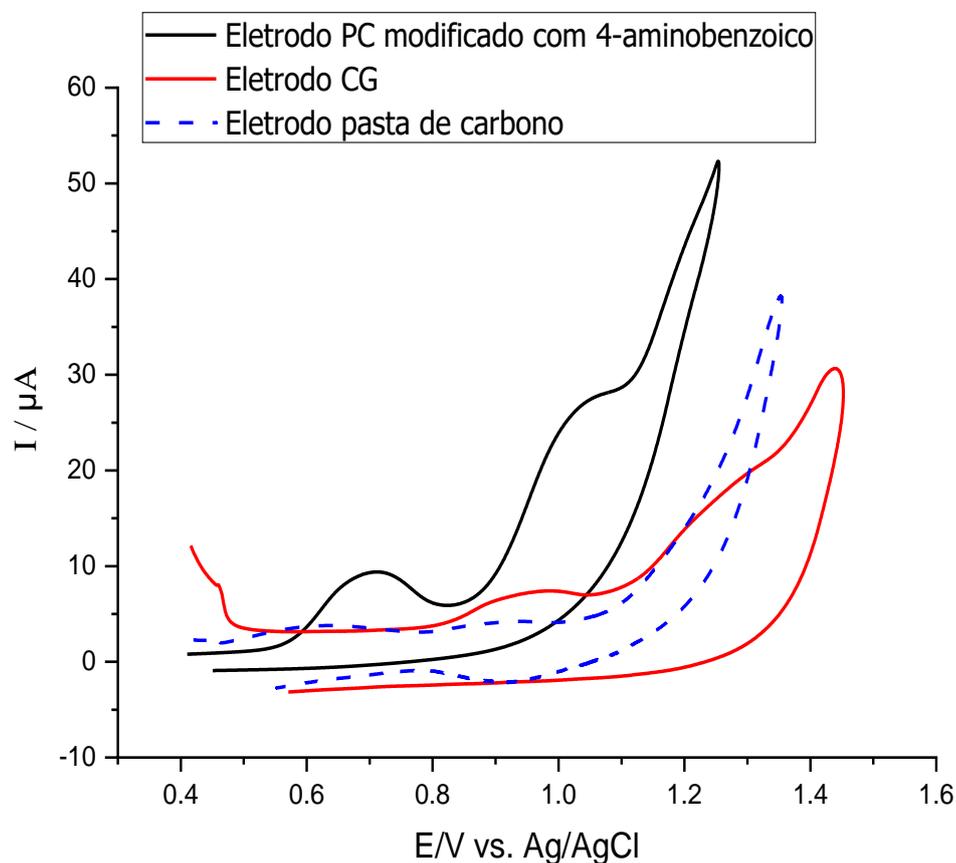
Nº ORD.	GRUPO	DESCRIÇÃO DO PRODUTO	QTD MAX	UND. MDD	ATIVIDADE
2580	EX	METAIS PULVERIZADOS, MISTURADOS A PERCLORATOS, CLORATOS OU CROMATOS	10	KG	DISTRIBUIÇÃO
2580	EX	METAIS PULVERIZADOS, MISTURADOS A PERCLORATOS, CLORATOS OU CROMATOS	10	KG	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL
2830	QM	NITRATO DE AMÔNIO	20	KG	AQUISIÇÃO (COMPRA)
2830	QM	NITRATO DE AMÔNIO	20	KG	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)
2830	QM	NITRATO DE AMÔNIO	20	KG	DISTRIBUIÇÃO
2830	QM	NITRATO DE AMÔNIO	20	KG	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL
2850	EX	NITRATO DE MERCÚRIO	10	KG	AQUISIÇÃO (COMPRA)
2850	EX	NITRATO DE MERCÚRIO	10	KG	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)
2850	EX	NITRATO DE MERCÚRIO	10	KG	DISTRIBUIÇÃO
2850	EX	NITRATO DE MERCÚRIO	10	KG	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL
2870	QM	NITRATO DE POTÁSSIO	40	KG	AQUISIÇÃO (COMPRA)
2870	QM	NITRATO DE POTÁSSIO	40	KG	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)
2870	QM	NITRATO DE POTÁSSIO	40	KG	DISTRIBUIÇÃO
2870	QM	NITRATO DE POTÁSSIO	40	KG	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL
2990	PGQ	OXICLORETO DE FÓSFORO	20	KG	AQUISIÇÃO (COMPRA)
2990	PGQ	OXICLORETO DE FÓSFORO	20	KG	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)
2990	PGQ	OXICLORETO DE FÓSFORO	20	KG	DISTRIBUIÇÃO
2990	PGQ	OXICLORETO DE FÓSFORO	20	KG	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL
3390	GQ	RICINA	1	KG	AQUISIÇÃO (COMPRA)
3390	GQ	RICINA	1	KG	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)
3390	GQ	RICINA	1	KG	DISTRIBUIÇÃO
3390	GQ	RICINA	1	KG	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL
3480	PGQ	SULFETOS DE SÓDIO	40	KG	AQUISIÇÃO (COMPRA)
3480	PGQ	SULFETOS DE SÓDIO	40	KG	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)
3480	PGQ	SULFETOS DE SÓDIO	40	KG	DISTRIBUIÇÃO
3480	PGQ	SULFETOS DE SÓDIO	40	KG	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL
3670	PGQ	TRJETANOLAMINA (TRI(2-HIDROXIETIL) AMINA)	40	L	AQUISIÇÃO (COMPRA)
3670	PGQ	TRJETANOLAMINA (TRI(2-HIDROXIETIL) AMINA)	40	L	ARMAZENAMENTO (DEPOSITO)
3670	PGQ	TRJETANOLAMINA (TRI(2-HIDROXIETIL) AMINA)	40	L	DISTRIBUIÇÃO
3670	PGQ	TRJETANOLAMINA (TRI(2-HIDROXIETIL) AMINA)	40	L	UTILIZAÇÃO LABORATORIAL

Belo Horizonte - MG, 13 de julho de 2016

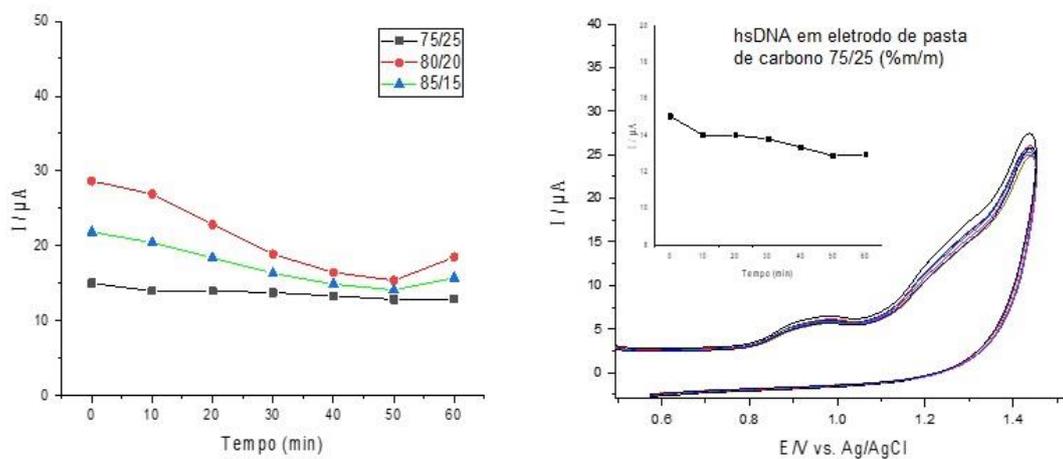
  
 CLAUDIO SENISSE FILHO - Cel  
 Rsp p/ Chefia do SFPC da 4ª RM

### ANEXO C – MATERIAL SUPLEMENTAR

M.S. Fig. 1 - Teste de eletrodos de trabalho em hsDNA (Eletrodo pasta de carbono, carbono vítreo (CG) e Eletrodo pasta de carbono modificado com 4-amino benzóico) em tampão acetato de sódio 50 mmol.L-1 (pH 4,6)



M.S. Fig. 2 - Teste das combinações de proporções em massa 85/15, 80/20 e 75/25 (%m/m) de grafite e óleo mineral para medidas em hsDNA



M.S. Fig. 3 - Ensaio do efeito acumulativo de adenina na superfície do eletrodo de pasta de carbono

