

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

METODOLOGIA PARA QUANTIFICAR RICINA EM SEMENTES DE MAMONA
COM O USO DE *Caenorhabditis elegans*

CARLOS ALBERTO RAUER DEMANT

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp - Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Agricultura)

BOTUCATU-SP
Agosto - 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

METODOLOGIA PARA QUANTIFICAR RICINA EM SEMENTES DE MAMONA
COM O USO DE *Caenorhabditis elegans*

CARLOS ALBERTO RAUER DEMANT

Orientador: Prof. Dr. Maurício Dutra Zanotto

Co-orientador: Prof. Dr. Dick Auld

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU - SP
Agosto – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Demant, Carlos Alberto Rauer, 1977-
D371m Metodologia para quantificar ricina em sementes de
mamona com o uso de *Caenohabiditis elegans* / Carlos Alber-
to Rauer Demant. - Botucatu : [s.n.], 2008.
vii, 48 f. : il., tabs.

Tese (Doutorado) -Universidade Estadual Paulista, Fa-
culdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2008
Orientador: Maurício Dutra Zanotto
Co-Orientador: Dick Auld
Inclui bibliografia.

1. Mamona. 2. Ricina. 3. Toxicidade. 4. Caenohabiditis
elegans. I. Zanotto, Maurício Dutra. II. Auld, Dick. III.
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
(Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas.
IV. Título.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Carlos Alberto Rauer Demant, filho de Thomas Alfred Demant Laurentius e Ana Guilhermina Rauer Demant, nasceu na cidade de São Paulo, SP em 08 de agosto de 1977.

Graduado em Agronomia pela UFSCar onde atuou por 4 anos com horticultura orgânica e no último ano fez estágio no Instituto Biológico de Campinas, SP com nematóides.

Tornou-se Mestre em produção vegetal / proteção vegetal pela UNESP – Universidade Estadual Paulista, com dissertação sobre nematóides trabalhando com citrus, café, tomate, alface, seringueira entre outros. Após o mestrado administrou uma fazenda de produção de grãos da Granja Alvorada em Angatuba-SP

Diplomou-se Doutor em produção vegetal / Agricultura pela UNESP – Universidade Estadual Paulista, com tese na área de melhoramento de mamona. Durante o doutorado desenvolveu trabalhos com doenças da mamona com métodos de controle de mofo cinzento e fusariose, assim como busca de fontes de resistência a estas doenças. No seu estágio de doutorado no exterior, fez trabalhos de melhoramento de mamona e desenvolveu um método para quantificar ricina utilizando nematóides e que originou em sua tese.

Desde setembro de 2008 atua como pesquisador associado da Texas Tech University em Lubbock Texas, atuando com melhoramento de mamona e algodão.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: METODOLOGIA PARA QUANTIFICAR RICINA EM SEMENTES DE MAMONA COM O USO DE *Caenorhabditis elegans*

ALUNO: CARLOS ALBERTO RAUER DEMANT

ORIENTADOR: PROF. DR. MAURICIO DUTRA ZANOTTO

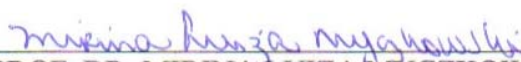
Aprovado pela Comissão Examinadora



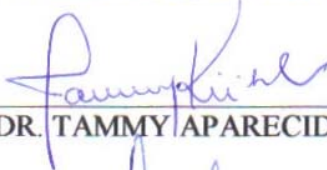
PROF. DR. MAURICIO DUTRA ZANOTTO



PROF. DR. ROGERIO PERES SORATTO



PROF. DR. MIRINA LUIZA MYCZKOWSKI



PROF. DR. TAMMY APARECIDA MANABE KIIHL



PROF. DR. JOSE GERALDO CARVALHO DO AMARAL

Data da Realização: 15 de Agosto de 2008.

DEDICATÓRIA

Á Deus,
à minha esposa Aline Rodrigues de Melo Demant,
à minha mãe Ana Guilhermina Rauer Demant e
ao meu pai Thomas Alfred Demant Laurentius,

DEDICO.

Á meus irmãos Marcos Alexandre Rauer Demant;
Luis Alfredo Rauer Demant,
Olga Maria Rauer Demant e
a minha avó Olga Amália Petersen Rauer

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, em especial:

A **Deus** por ter me capacitado, fortalecido e me concedido à sabedoria para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao Professor Dr. **Mauricio Dutra Zanotto** por seu empenho, apoio, orientação, confiança, amizade e companheirismo.

Ao Professor Dr. **Dick Auld** pela acolhida, pela amizade, apoio, orientação, confiança, amizade e companheirismo.

Ao Professores Dr. **Michael San Francisco**, Dr. **Dominik Casadonte** e Dr. **Edson Luis Furtado** pela amizade, companheirismo, orientação e apoio.

Á minha esposa, **Aline Rodrigues de Melo Demant** companheira fiel que me ajudou tanto no nível pessoal, como também no profissional com algumas atividades laboratoriais.

Á **Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu**, pelo meu curso de mestrado e pela oportunidade da realização do curso de doutorado.

Á **Texas Tech University**, pela oportunidade do intercambio, e por disponibilizar sua estrutura para este estudo.

Á **Minha família**, pelo apoio e compreensão a mim destinados.

Á **Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias**, pela formação profissional.

Á **CAPES**, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, pela bolsa e apoio financeiro concedido.

Aos **Funcionários** da Faculdade de Ciências Agrônômicas pela colaboração e atenção dedicada.

SUMÁRIO

	Página
1 RESUMO.....	01
2 SUMMARY.....	03
3 INTRODUÇÃO.....	05
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	07
4.1 Importância da mamona.....	07
4.2 Toxidez das sementes de mamona.....	08
4.3 Uso de <i>Caenorhabditis elegans</i> como uma alternativa para testar toxicidade.....	10
4.4. Métodos de quantificação de ricina.....	11
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
5.1 A cultura de <i>Caenorhabditis elegans</i>	15
5.2 Coleta da amostra de semente para análise	16
5.3 Procedimentos de extração de ricina.....	17
5.3.1 Procedimentos 1 de extração (Papel filtro).....	17
5.3.2 Procedimentos 2 de extração (Decantação).....	17
5.3.3 Procedimentos 3 de extração (Banho-maria).....	18
5.3.4 Procedimentos 4 de extração (Centrífuga).....	18
5.4 Metodologia de exposição do nematóide a ricina.....	18
5.4.1 Metodologia 1 de exposição (Papel filtro).....	18
5.4.2 Metodologia 2 de exposição. (Petri).....	18
5.4.3 Metodologia de exposição (24 poços).....	19
5.5 Experimentos.....	19
5.5.1 Experimento 1 Teste do procedimento 1 de extração (papel filtro) e metodologia 1 de exposição (papel filtro).....	19
5.5.2 Experimento 2 Teste do procedimento 2 de extração (Decantação) e metodologia 2 de exposição (Petri).....	20
5.5.3 Experimento 3 Teste para avaliar melhor tempo de leitura de nematóides mortos.....	20
5.5.4 Experimento 4 Teste para comparar procedimentos de extração de ricina.....	20
5.5.5 Experimento 5 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 2 de exposição (Petri) com vários genótipos.....	21
5.5.6 Experimento 6 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 3 de exposição (24 poços).....	21
5.5.7 Experimento 7 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 3 de exposição (24 poços) com vários genótipos para determinar o número de nematóides mortos.....	22
5.5.8 Experimento 8 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 3 de exposição (24 poços) com vários genótipos para determinar porcentagem de nematóides mortos.....	22
5.6 Delineamento estatístico.....	23
5.7 Análise dos resultados.....	23
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25

6.1 Experimento 1 Teste do procedimento 1 de extração (papel filtro) e metodologia 1 de exposição (papel filtro).....	25
6.2 Experimento 2 Teste do procedimento 2 de extração (Decantação) e metodologia 2 de exposição (Petri).....	25
6.3 Experimento 3 Teste para avaliar melhor tempo de leitura de nematóides mortos.....	27
6.4 Experimento 4 Teste para comparar procedimentos de extração de ricina.....	29
6.5 Experimento 5 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 2 de exposição (Petri) com vários genótipos.....	32
6.6 Experimento 6 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 3 de exposição (24 poços).....	33
6.7 Experimento 7 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 3 de exposição (24 poços) com vários genótipos para determinar o número de nematóides mortos.....	34
6.8 Experimento 8 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 3 de exposição (24 poços) com vários genótipos para determinar porcentagem de nematóides mortos.....	36
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
8 CONCLUSÕES.....	39
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1 RESUMO

A mamona pode ser utilizada para mais de 700 finalidades diferentes, porém a sua toxidez é o limitante principalmente para o uso restrito da torta originada após a extração do óleo.

Para as análises utilizou-se um organismo com o modo de reação a medicamentos e toxinas semelhante ao ser humano, o nematóide *Caenorhabditis elegans*, o qual tem sido amplamente utilizado pela indústria farmacêutica.

O trabalho teve início com ensaios preliminares os quais se utilizaram culturas de *C. elegans*. Estas foram expostas às toxinas que foram colocadas em pequenas cavidades no meio de cultura, porém, devido à falta de praticidade do método, à difícil leitura e sua degradação pela *E. coli*, passou-se a realizar os testes em placas de 24 poços transparentes contendo apenas água, o nematóide e a toxina. Os resultados mostraram que o teste utilizando placas de 24 poços para exposição do nematóide, e a extração feita através da homogeneização, seguida por banho-maria seguida por centrifugação se mostrou eficiente para medir a ricina sendo semelhantes aos obtidos pelos testes de radioimunodifusão e Elisa, testes bastante específicos, porém de custo mais elevado.

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um bioensaio para quantificar a ricina tóxica da mamona, pois a relação entre as análises realizadas por diferentes métodos de quantificação existentes, nem sempre refletem a toxidez real, podendo ocorrer que sementes analisadas por estes métodos, apresentem menor teor de ricina, embora sejam mais tóxicas do que outras sementes que tenham maior teor de ricina quando analisada pelo mesmo

método. Isto se deve aos métodos empregados que medem além da ricina o RCA Ricinus Communis Aglutimina, um composto menos tóxico do que a ricina pura.

Palavras chaves: Mamona; ricina; *Caenorhabditis elegans*; *Ricinus communis*.

2 SUMMARY

METHODOLOGY TO QUANTIFY RICIN IN CASTOR BEAN SEEDS WITH THE USE OF *CAENORHABDITIS ELEGANS*, Botucatu, 2008. 40 p., Doctorate Thesis in Agronomy – Agriculture, Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Universidade Estadual Paulista.

Author: CARLOS ALBERTO RAUER DEMANT

Advisers: PROF. DR. MAURICIO DUTRA ZANOTTO and PROF. DR. DICK AULD

The castor oil can be used to 700 different products but its toxicity limits mainly the use of the castor bean cake, the product you have after extract the oil.

The present reseach developed a bioassay to quantify the ricin content on castor bean seed because the relationship between the analyses performed by different quantifying methods not always reflect the actual toxicity, witch can occur that seeds analysed by these methods have lower ricin levels although are more toxic than other seeds, because when it test not only the ricin but also the complex ricin + RCA Ricinus Communis Algutimin is measured and the RCA is less toxic than the pure ricin.

That is why it was used an organism that has similarities in the way the human body reacts to drugs and toxin, choosing to use the *Caenorhabditis elegans* that has been used to the pharmaceutical industry.

This assay started with preliminary assays using *C. elegans* colonies that were exposed to the toxins placed in small holes did in the media , but it was hard to read

and the *E. coli* degradation, the method changed to the 24 well plates with water, nematode and the ricin. The results showed the method is efficient to measure ricin and very similar to the radio-immuno-diffusion and the Elisa, very specific tests, but expensive with some operational problems.

Key words: Castor, *Ricinus communis*, ricin content; *Caenorhabditis elegans*.

3 INTRODUÇÃO

A mamona é uma planta muito explorada desde a antiguidade principalmente pelos diferentes usos de seu óleo, podendo ser tanto medicinal como industrial. A semente de mamona possui toxinas hidrossolúveis conhecidas por ricina, que apresentam alta toxidez. Estas toxinas são constituídas por complexos de duas cadeias de ricina e ricinus communis aglutinina (RCA), que atuam paralisando os ribossomos e interrompendo assim a produção de proteínas (OLSNES, 1975).

As sementes desta planta são perigosas ao consumo humano e animal, restringindo assim o seu uso, uma vez que não podem ser utilizados como alimento animal, sem que passem por um processo de desintoxicação prévia, porem nenhum caso foi notificado de animais morrerem ao ingerir folhas e caules (Van Horn, 1952).

A ricina é uma proteína inativadora de ribossomos de organismos eucarióticos, é constituída por duas cadeias de polipeptídeos que são capazes de inativar 1500 ribossomos por minuto, o que interrompe a produção de proteína nas células, matando-as. Outra proteína perigosa presente na semente da mamona é a *Ricinus Communis Aglutinina* (RCA), que é menos tóxica do que a ricina.

A Texas Tech University tem desenvolvido variedades com baixo teor de ricina a fim de reduzir sua toxicidade visando aumentar o seu aproveitamento no mercado Americano. Muitos testes têm sido desenvolvidos com o propósito de quantificar ricina, porém todos são limitados por se tratarem de métodos caros e pouco seguros por não refletirem a real toxidez das plantas.

Para continuar este processo, e possibilitar o desenvolvimento de variedades semelhantes no Brasil é necessário conhecer um método de quantificação destas toxinas, mais barato, simples e seguro.

Em todo mundo os nematóides chamados de vida livre tem sido usados como termômetros ambientais para mostrar o quanto o solo esta sendo preservado ou agredido, ou que concentração de contaminantes está presente. Um deles é o *Caenorhabditis elegans* e que pode ser um ótimo modelo para o teste de toxidez de sementes uma vez que é de fisiologia e genética conhecida, além de ser um organismo com o mesmo tipo de ribossomo existentes nos seres humanos.

Neste estudo objetivou-se desenvolver um bioensaio para quantificar a ricina da mamona, com baixo custo e alto grau de confiabilidade em substituição aos métodos mais onerosos existentes atualmente como da radio-imuno-difusão (SPINKERTON, 1999) e Elisa (LOWERY, 2005), os quais podem apresentar falhas quantitativas consideráveis.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Importância da mamona

Mamona (*Ricinus communis* L.) faz parte da família *Euphorbiaceae* sendo um gênero monotípico, o que significa que é a única espécie do gênero *Ricinus*. A mamona mostra uma taxa de cruzamento de 40%, levando a necessidade de proteção de seus racemos para que haja uma autofecundação uma vez que é considerada uma planta mista, sendo assim de fácil cruzamento e autofecundação. (BELTRÃO, et al., 2001). Ela tem sido cultivada desde 40°S á 52°N, e não tolera temperaturas muito baixas (SAVY FILHO, 1999). Suas sementes podem conter até 50% de óleo de alta qualidade (MOSHKIN, 1986).

Muitos produtos podem ser feitos a partir da mamona, o óleo é seu principal produto econômico e tem sido usado muito nas indústrias, devido à sua alta viscosidade e estabilidade frente a mudanças de temperatura. Este se caracteriza naturalmente como um excelente lubrificante para máquinas de alta rotação, ou que serão submetidas a baixas temperaturas. Ele também apresenta grande capacidade de reação química devido aos altos teores de óleo ricinoléico na sua composição, tornando possível fazer nylon, resinas, tubos de irrigação, aditivos para combustíveis, inseticidas, fungicidas, bactericidas, produtos sintéticos, fluido hidráulico, graxas, próteses em substituição ao silicone, próteses ósseas, cirurgias de mama e de próstata, entre outros. (CARVALHO, 1997; GIBELLI, 2001).

O biodiesel feito a partir da mamona é outro importante produto para economia mundial, sendo uma ótima alternativa para substituir o petróleo, sendo uma fonte de hidrocarbonetos como o petróleo, energia renovável ajudando no combate ao aquecimento global.

A torta de mamona pode ser utilizada como um fertilizante orgânico para café, citrus, cana de açúcar, horticultura e frutas com efeitos nematicidas (SAVY FILHO et al., 1999), mas pode também ser utilizada em ração animal quando passar por processo de desintoxicação (SANTOS et al., 2001). Ela também constitui um ótimo material orgânico a ser usada na recuperação de solos degradados, ajudando na sua estruturação. Não é apenas o óleo e a torta que podem ser utilizados, as suas folhas podem servir de alimento para o gado, ou para o bicho da seda, sua haste além de celulose própria para fabricação de papel, fornece matéria prima para produção de tecidos grosseiros (BANCO DO DESENVOLVIMENTO DO ESTADO DE MINAS GERAIS, citado por AZEVEDO E BELTRÃO 2007). A mamona é a melhor planta para fazer o biodiesel, pois o óleo extraído das sementes desta planta já possui um mercado internacional crescente, garantido por mais de 700 aplicações e é o único óleo vegetal extraído de plantas cultivadas que apresenta alta solubilidade ao álcool. O biodiesel feito a partir de óleos vegetais reduz a emissão de carbono entre 78 á 90% quando comparado com o diesel de petróleo. (AGROANALISIS, 2005).

4.2 Toxidez das sementes de mamona

Há duas principais toxinas encontradas nas sementes de mamona (MOSHKIM, 1986):

Ricina, um poli peptídeo constituído de duas cadeias, tem uma LD₅₀ de 30ppm é um dos compostos mais tóxicos produzidos na natureza. A ricina destrói enzimaticamente os ribossomos de células eucarióticas.

E a *Ricinus communis aglutimina* (RCA), uma cadeia de quatro peptídeos, um pouco menos tóxica que a ricina, mas também é encontrada naturalmente em sementes maduras (KASHIMOV et al, 1989; TREGGAR e ROBERTS, 1992) Este composto causa a aglutinação das células vermelhas de mamíferos. Tanto animais ruminantes como não

ruminantes se contaminam facilmente com baixas quantidades de ricina (ROETHELI et al, 1991).

A ricina é membro da família chamada de toxinas A-B, que são proteínas produzidas por plantas e bactérias e que possuem alta capacidade de penetração nas células humanas tornando-as altamente letais. Devido a sua ação catalítica sobre polipeptídeos (A cadeia A ou Ricina A (RTA)), se liga de maneira covalente via ligação simples de disulfeto, ligando-se aos polipeptídeos da célula (A cadeia B ou RTB) -(LORD et al 1984). RTA desnatura especificamente 28S RNA, e ribossomos contendo RTA - modificando 28S RNA os quais não são mais capazes de sintetizar proteínas levando as células à morte (ENDO et al 1987). Quando inalada a ricina é extremamente tóxica, tendo sido utilizada como arma química em guerras passadas e em bioterrorismo. Quando administrada pelas vias aéreas pode causar edema pulmonar ou inflamações nos alvéolos. A morte ocorre como uma consequência de uma severa falta de oxigenação no sangue, uma vez que ocorre a falência do fluxo alveolar não havendo assim a captura de oxigênio.

Essa proteína globular de 66-kilodalton (kd) sendo 1% a 5% do peso da semente de mamona. O heterodímero tóxico consiste de 32-kd cadeia-A que se liga por ligação de disulfeto a uma cadeia-B de 32-kd. (ROBERTUS et al 1988) A toxina é estocada na matriz da mamona junto com a uma ricinus lecitina de 120.000-d. (YOULE et al 1976). Ambas as cadeias são glicoproteínas contendo grupos de carboidratos chamados de manose, necessitando de que as duas cadeias de 32-kd estejam associadas para que esta seja tóxica.

A toxidez da ricina também varia de acordo com a rota de absorção. Em ratos de laboratório, a dose letal para 50% da população (LD_{50}) e tempo de exposição foram respectivamente 3 a 5 $\mu\text{g/kg}$ e 60 horas por inalação, 5 $\mu\text{g/kg}$ e 90 horas por injeção intravenosa, 22 $\mu\text{g/kg}$ e 100 horas por injeção intraperitoneal, 24 $\mu\text{g/kg}$ e 100 horas por injeção subcutânea, e 20 mg/kg e 85 horas por administração intragástrica. A baixa toxidez quando ingerido via oral reflete a baixa capacidade de absorção desta toxina pelo trato gastrointestinal. A alta toxidez dos outros alvos pode ser relacionada ao fácil acesso das células alvo da população e a ambigüidade de “receptores da toxina” para penetrar o corpo celular. Quando realizados testes de exposição na pele de ratos, nenhuma toxidez foi visualizada. Sendo utilizada uma concentração de 50 μg por local (WANNEMAKER et al 1994).

Os sinais e sintomas clínicos assim como as manifestações patológicas da toxidez da ricina variam com a dose e a rota de exposição. (OLSNES et al, 1982) Estudos com animais verificaram que há uma mudança radical nos sintomas clínicos e mudanças patológicas quando se muda a rota de administração, por exemplo, por inalação resulta em danos ao sistema respiratório e lesões no pulmão podendo levar a um enfisema pulmonar; Por ingestão, causa sinais gastrintestinais e hemorragia gastrointestinal com necrose de rim, fígado e baço; Por e injeção intramuscular causa severas dores musculares localizadas, necrose regional de músculos e linfonodos e um envolvimento moderado dos órgãos viscerais.

A especificidade dos efeitos patológicos de acordo com a rota se dá principalmente devido às propriedades de lecitina da ricina, que causa uma rápida ligação com glicosídeos dos carboidratos da superfície da célula. Sobreviver a leucocitoses parece ser uma luta constante do ser humano, seja a intoxicação via injeção ou ingestão oral. A contagem de leucócitos diante de uma intoxicação de ricina se apresenta de 2 a 5 vezes maior que o normal, características semelhantes aquelas apresentadas por pacientes portadores de câncer.

4.3 Uso de *Caenorhabditis elegans* como uma alternativa para testar toxicidade

Thompson e Pomerai 2005 usaram *C elegans* para testar a toxicidade de diferentes álcoois mostrando diferentes toxicidades. Neste ensaio ele foi usado para obter o ponto eco toxicológico. Harada et al 2007 verificou que é uma boa alternativa para testar metais pesados e a ação da contaminação por detergentes no ambiente. Mas *C elegans* foi testado não apenas como um organismo de sentinela, mas também para verificar a reação humana a protease do *Vibrio cholerae* (VAITKEVICIUSET al 2006) para fungicidas (MARTIJS et al 2006), a interação patógena hospedeira (ABALLAY e AUSUBEL 2002, SCHACHTER 2004, HUFFMAN et al 2004, BRIGNULL et al 2006, DHAKAL et al 2006, VENTURA et al 2006, LU et al 2003). Foi testado ainda para *Salmonella typhimurium* (LABROUSSE et al 2000). E em diferentes toxinas (SATANHILL et al 2006, HUFFMAN et al 2004, POSSANI et al 1981) processo de envelhecimento (SAMARA e TAVERNARAKIS 2003, BRAKEFIELD et al 2005, FABER et al 2006) para nicotina (FENG et al 2006), diferentes drogas (CARROL et al 2003, MATTHEWS e KOPCZYNSKI 2001), para o extrato de *Ginkgo biloba* (KAMPKÖTTER et al 2007) resistência xenobiótica (LINDBLOM et al

2006), doença de Alzheimer (LINK 2006) e agentes poluidores orgânicos (SOCHOVÁ et al 2007).

De acordo com Gnoula et al 2007 5(6)-Carboxyfluoresceína diacetato é um bom indicador de viabilidade do *Caenorhabditis elegans* para o desenvolvimento *in vitro* de ensaio de drogas, visto que após perecerem eles começam a tornar-se fluorescentes, o que torna a avaliação mais fácil e rápida.

Orgonie et al 2002 verificou que os nematóides têm a mesma reação a ricina que os humanos, pois a ingestão de ricina deve ser em maiores doses para se obter o mesmo resultado obtido pela injeção da toxina em doses menores, de modo que algumas estirpes apresentam uma resistência parcial a ricina e Mears et al 2002 fizeram a sequência de RNA e acharam a sequência de absorção da ricina nos ribossomos mitocondriais, e grande semelhança entre a genética de seus ribossomos e do ribossomo humano.

4.4. Métodos de quantificação de ricina

Um ensaio de Radio Imuno Difusão foi adaptado a fim de permitir a seleção dos traços de linhas de mamona para níveis reduzidos de concentração de ricina + RCA (PIKERTON et al, 1999). O ensaio RID usou um anticorpo específico contra a lecitina *Ricinus communis* incorporado em uma fina camada de Agar na qual foi colocado o antígeno contido nos extratos de sementes. Este método tem uma sensibilidade mínima de 1,0 mg de ricina total + RCA/g de semente. O método é relativamente barato, mas requer alguns equipamentos especiais.

De acordo com Lubelli et al 2006, o LOD de IPCR foi mais de 1 milhão de vezes menor que o do ELISA, permitindo se detectar 10 fg/ml de diantina (dianthin) e ricina (ricin). A possibilidade de se detectar ricina no soro humano foi investigada também, e uma sensibilidade similar foi observada (10 fg/ml). O IPCR aparece ser o método mais sensível para a detecção de ricina e outros RIPs.

Aptâmeros rivais a especificidades dos anticorpos tem a força de simplificar os imunoensaios usando eletroforese capilar. Sob condições não equilibradas, a constante da dissociação, K_d , de 134 nM tem sido monitorada entre o RNA aptamero e a cadeia A da ricina.

Com o uso de ensaios de solução livre a detecção de 500 pM (14 ng/mL) ou 7,1 mol de ricina foi demonstrada. A presença de proteínas que interferem esses ensaios como albumina do soro bovino e caseína não evitam a interação em concentração sub-nanomolar. Quando ligado com RNA se A, a ricina ainda pode ser detectada em concentrações de até 1 nM a despeito de severa degradação. Este enfoque oferece um método promissor para a rápida, seletiva e sensível detecção de agentes de guerra biológica. (HAES et al 2006)

Os métodos tradicionais de detecção de ricina estão usando imunoenaios baseados em anticorpos (LIGLER et al, 2003; RUBINA et al, 2005; STINE et al, 2005) e ensaios imunoabsorventes ligados a enzimas (ELISA). (KOJA et al, 1980; LEITH et al, 1988; POLI et al 1994) Conquanto cada técnica seja superior seja em sensibilidade, facilidade de uso, ou tempo requerido e ensaio, um aprimoramento destes métodos se torna necessário. Por exemplo, Kojá reportou um limite de detecção de 4 ng/mL de ricina usando um método ELISA; todavia, o ensaio levou diversas horas e requereu pessoal altamente treinado a fim de ser executado. (KOJA et al 1980) Um imunoensaio tipo sanduíche quando combinado com colóides dourados tem demonstrado uma detecção de ricina dentro de 10 minutos; todavia, a sensibilidade do ensaio sofreu (10 ng/mL de ricina). Ligler tem demonstrado uma detecção de 8 ng/mL de ricina usando um imunosensor baseado em “array” com um tempo de análise de 15-30 min como resultado de significativa intervenção do usuário (LIGLER et al 2003). Pela ausência de um método eficaz de determinação da real toxidez da ricina, e pelas características específicas do *C. elegans*, como exemplo: possui um tipo de ribossomo semelhante ao do ser humano, e pelo seu uso com sucesso na determinação de outras toxinas, levantou-se a hipótese de realizar-se um bioensaio usando *C. elegans* para verificação da toxidez da ricina.

Tabela 1 (LUBELLI et al 2006)

Panorama das técnicas de detecção de ricina

Note. RCA, *Ricinus communis agglutinin*.

Método de detecção do antígeno	Limite da detecção	Ng/ml	Referência
Ricina	Sensores de micro equilíbrio de cristais de quartzo	5000	Stine et al 2005
Ricina	Fluoroimunoensaio	1000	Anderson et al 2002
Ricina	Ensaio de biosensor	320	Kirby et al 2004
Ricina	Dispositivos Lateral Xow	250	Garber et al 2005
Ricina	ELISA	80	Griyths et al 1986
Ricina	Inibidor de lysozoma	80	Gohsh et al 1979
Ricina	Ensaio Imuno cromatográfico	50	Shyu et al 2002
Ricina	Ensaio de biosensor Micro array	10	Delehanty et al 2002
Ricina	Imunoensaio	5	Shyu et al 2002
Ricina	ELISA	5	Garber et al 2005
RCA	Fluoroimunoensaio	1	Wang et al 2005
Ricina	Ensaio de biosensor	0,5	Ligier et al 2003
Ricina	Ensaio com sensores microeletromecanicos	0,4	Yang et al 2003
RCA	Ensaio de biosensor Micro array	0,18	Dill et al 2004
Ricina	Ensaio de biosensor	0,1	Narang et al 1997
Ricina	Immunoassay on gel-based microchips Imunoensaio baseado em micro lascas em base gelatinosa	0,1	Rubina et al 2005
Ricina	ELISA com iluminescencia química	0,1	Poli et al 1994
Ricina	Grupo de proteínas	0,1	Huelseweh et al 2005
Ricina	Ensaio baseado em luciferase	0,001	Zhao et al 2005
Ricina	Spray elétrico MALDI-MS HPLC	<5% do extrato cru	Fedrickson et al 2005
Ricina	Detecção Piezoelétrica	10 g/cristal	Karter et al 1995
Ricina	IPCR	0,00001	Em curso

5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Departamento de Ciências de Plantas e do Solo da Texas Tech University em conjunto com o departamento de Microbiologia da mesma Universidade localizada na cidade de Lubbock, no estado do Texas nos Estados Unidos, no período de maio a dezembro de 2007, no programa de estágio de doutorado no exterior da Faculdade de Ciências Agrônômicas Universidade Estadual Paulista” Julio de Mesquita Filho” (FCA/UNESP) com apoio da CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nivel Superior.

Para o desenvolvimento da metodologia de avaliação do teor de ricina utilizou-se duas estirpes do nematóide *Caenorhabditis elegans* denominadas como AB1 e N2, as quais são amplamente utilizadas em testes farmacêuticos e toxicológicos.

Foram utilizados os seguintes acessos de mamona do banco de germoplasma da USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) para determinar a funcionalidade do processo:

PI25765401 VNIIMK N1651 da Rússia, com 2,4% de ricina;

PI176751 8838 da Turquia, com 5,6% de ricina;

PI170685 Acik Kahverengi da Turquia, com 7,6% de ricina;

PI170684 Kahverengi da Turquia, com 8,1% de ricina;

PI183468 Erari da Índia com 9,2% de ricina;

PI183347 Divela da Índia, com 10,3% de ricina;

PI183076 Erari da Índia, com 10,8% de ricina;

E a variedade Hale dos EUA, com 12,4% de ricina.

As quantidades de Ricina acima citadas foram determinadas pelo método de Radio Imuno Difusão (PINKERTON et al, 1999), e confirmados pelo método de ELISA (LOWERY, 2005).

5.1 A cultura de *Caenorhabditis elegans*

Para a manutenção e multiplicação do *C. elegans* foi utilizada a seguinte metodologia:

Placas de Petri foram preparadas com NGM Agar que contém 3g de NaCl, 2,5g de peptona, 17g de Agar e 975 mL de água destilada.

Elas foram autoclavadas a 120°C durante 45 minutos, deixadas em uma câmara de fluxo para esfriar, e após atingir a temperatura de 55°C, foram acrescentados: 1mL de solução de colesterol (5mg de colesterol /mL de etanol), 1mL de solução de 1 mol de CaCl₂, 1mL de solução de 1 mol de MgSO₄, 25mL de solução de 1 molar K₂ PO₄, pH = 6,0 (a solução de colesterol não precisa ser esterilizada).

Para a multiplicação de *Escherichia coli* OP50, que foi utilizada como alimento de *C. elegans*, foi usado primeiramente o mesmo meio de multiplicação de nematóides, então *E. coli* foi repicada ao meio LB (+ Streptomicina) O/N a 37°C com agitação constante por 24 horas, em seguida 3mL foram centrifugados durante 15 min a 10.000 rpm, retirou-se a água e o resto suspenso em 50µL de M9, derramou-se esta suspensão sobre as placas de Petri com NGM Agar, aguardando-se cerca de 20 minutos para o seu secamento.

Em seguida 1mL de suspensão de *C. elegans* obtidas no Laboratório de Microbiologia sob supervisão do Dr. Michael San Francisco, foi inserido sobre o meio contendo *E. coli*.

5.2 Coleta da amostra de semente para análise

Com auxílio de um bisturi, foi realizado um corte transversal na semente logo abaixo da localização do embrião (Figura 1), retirou-se em seguida a casca.

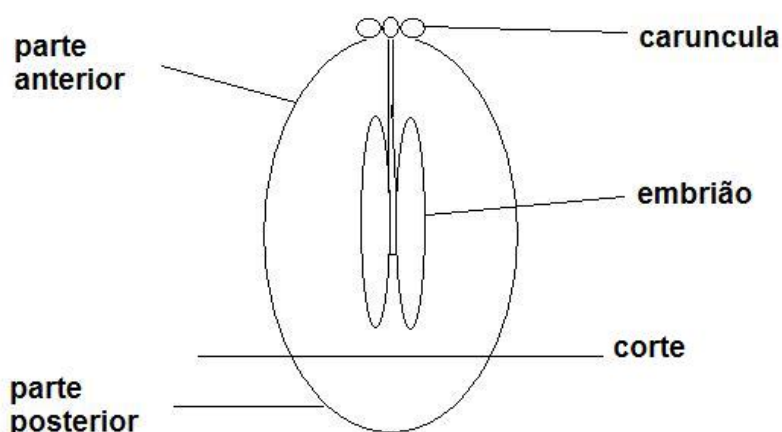


Figura 1. Esquema da semente de mamona mostrando o local onde se realizou o corte para a análise.

A parte anterior (Figura 1) foi semeada em uma bandeja contendo substrato para cultivo de hortaliças, e levada para a casa de vegetação com sistema de irrigação controlado, a fim de preservar e recuperar a planta que estava sendo analisada.

A parte posterior foi colocada num tubo de micro centrífuga de 1,5mL, que foi completado com água destilada e autoclavada até atingir o volume de 1 mL para realizar-se a extração da ricina.

5.3 Procedimentos de extração de ricina

Com auxílio de uma ponta de homogeneizador modelada e uma furadeira, a parte posterior da semente foi processada no tubo de micro centrífuga até obter-se uma solução leitosa.

Foram testados 4 procedimentos diferentes de extração de ricina:

5.3.1 Procedimentos 1 de extração (Papel filtro)

A solução leitosa foi decantada por 5 minutos, posteriormente inseriu-se um disco de papel filtro, o qual foi embebido pela solução por 5 minutos.

5.3.2 Procedimentos 2 de extração (Decantação)

A solução leitosa foi decantada por 5 minutos, e foram retirados 200 μ L da porção mediana (Figura 2).

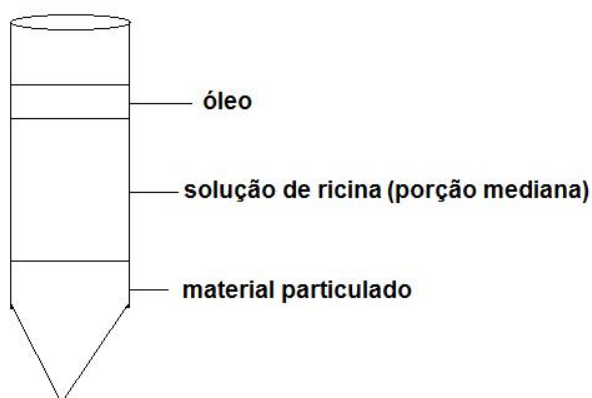


Figura 2. Esquema de um tubo de micro centrífuga com a suspensão resultante do processo da semente ilustrando a região de onde a solução deve ser retirada.

5.3.3 Procedimentos 3 de extração (Banho-maria)

A solução leitosa foi levada a um banho-maria com água a 45°C e agitação regulada 70 rpm por 3 horas, em seguida o material foi decantado por 5 minutos e foi retirada a porção mediana (Figura 2).

5.3.4 Procedimentos 4 de extração (Centrífuga)

A solução leitosa foi levada a um banho-maria com água a 45°C e agitação regulada 70rpm por 3 horas, em seguida a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 5000 rpm, então foi retirada a porção mediana (Figura 2).

5.4 Metodologia de exposição do nematóide a ricina

Foram testadas 3 metodologias de exposição do nematóide a ricina.

5.4.1 Metodologia 1 de exposição (Papel filtro)

Foram utilizados discos de papel filtro obtidos no procedimento 1 de extração como veículo da ricina, os quais foram inseridos em placas de Petri contendo o nematóide a fim de verificar sua reação.

5.4.2 Metodologia 2 de exposição. (Petri)

Com auxílio de um furador de rolhas fez-se uma cavidade de 4mm de diâmetro no meio de cultura das placas de Petri contendo *C. elegans* com *E. coli*. Em seguida uma alíquota de 200µL da solução, resultante da extração (fig.2), foi colocada nessa cavidade, as placas foram levadas para uma estufa com temperatura de 15°C para continuidade do ciclo de vida dos nematóides.

Após 24 horas, retirou-se as placas da estufa para serem analisadas.

5.4.3 Metodologia de exposição (24 poços)

As placas de Petri contendo *C. elegans* e *E. coli* foram lavadas com 1mL de água destilada autoclavada com auxílio de uma piceta, esta água com nematóides foi recolhida em um Becker previamente autoclavado, do mesmo foram retirados 200µL da suspensão de nematóides, o qual foi transferido para um dos poços da placa de 24 poços, e em seguida adicionou-se 200µL da solução de ricina resultante da extração. Este procedimento foi repetido para cada poço utilizado. A placa foi colocada em uma estufa com temperatura a 15°C para manutenção dos nematóides. Após 18 horas, retirou-se as placas da estufa para serem analisadas.

5.5 Experimentos

5.5.1 Experimento 1 Teste do procedimento 1 de extração (papel filtro) e metodologia 1 de exposição (papel filtro)

Realizou-se a extração da ricina pelo procedimento 1 de extração, e os nematóides foram expostos a ricina pela metodologia 1 de exposição. Este tratamento foi aplicado nas duas estirpes do nematóide, N2 e AB1, e a testemunha foi água.

As cultivares utilizadas foram: 4 sementes de VNIIMK N1651, com 2,4% de ricina e 4 sementes de Hale contendo 12,4% de ricina.

Este experimento foi realizado em duas épocas diferentes com 4 repetições cada tratamento.

A avaliação da presença de nematóides mortos foi realizada com auxílio de uma lupa de mesa nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após a exposição dos mesmos à ricina.

5.5.2 Experimento 2 Teste do procedimento 2 de extração (Decantação) e metodologia 2 de exposição (Petri)

Neste experimento, a ricina foi extraída pelo procedimento 2 de extração e o nematóide foi exposto pela metodologia 2 de exposição, foram utilizados os mesmos genótipos e as mesmas estirpes do experimento 1.

Após 24 horas da exposição dos mesmos, contou-se os números de nematóides mortos em torno da cavidade feita no meio de cultura, e ao mesmo tempo foi medido o diâmetro em que pôde constatar a presença de nematóides mortos.

5.5.3 Experimento 3 Teste para avaliar melhor tempo de leitura de nematóides mortos

Para extração de ricina foi utilizado o procedimento 2 de extração e os nematóides foram expostos pela metodologia 2 de exposição. A contagem de nematóides mortos teve início após 12 horas do acréscimo da ricina e foi repetida sistematicamente até 24 horas a fim de determinar qual o melhor intervalo de tempo para contagem de nematóides mortos.

5.5.4 Experimento 4 Teste para comparar procedimentos de extração de ricina

Neste experimento os nematóides foram expostos pela metodologia 2 de exposição, porém foi variado o procedimento de extração da ricina.

Foram utilizados os seguintes tratamentos:

Tratamento 1 utilizou-se o procedimento 2 de extração (decantação);

Tratamento 2 foi utilizado o procedimento 3 de extração (banho-maria);

Tratamento 3 foi utilizado o procedimento 4 de extração (centrífuga).

Os genótipos e as estirpes testadas foram semelhantes aos experimentos anteriores. Foram contados o número de nematóides mortos 18 horas após a sua exposição.

Este experimento foi conduzido em duas épocas diferentes, sendo que o segundo experimento foi instalado poucos dias depois da análise do primeiro.

5.5.5 Experimento 5 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 2 de exposição (Petri) com vários genótipos

Foi utilizado neste experimento o procedimento 4 de extração para a extração e a metodologia 2 de exposição para a exposição do nematóide, utilizou-se as duas estirpes de *C. elegans* e os seguintes genótipos:

VNIIMK N1651 da Rússia, com 2,4% de ricina;
8838 da Turquia, com 5,6% de ricina;
Acik Kahverengi da Turquia, com 7,6% de ricina;
Kahverengi da Turquia, com 8,1% de ricina;
Erari da Índia com 9,2% de ricina;
Divela Índia, com 10,3% de ricina;
Erari Índia, com 10,8% de ricina;
E a variedade Hale dos EUA, com 12,4% de ricina.

Depois de 18 horas da exposição foram contados os nematóides mortos em torno da cavidade do meio de cultura.

5.5.6 Experimento 6 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 3 de exposição (24 poços)

Foi utilizado do procedimento 4 de extração e da metodologia 3 de exposição do nematóide a ricina, os genótipos e as estirpes utilizadas foram os mesmos do experimento 1.

Após 18 horas de exposição foram contados os nematóides vivos e os mortos dentro dos poços com auxílio de uma lupa com aumento de 400 vezes.

Este experimento foi conduzido em duas épocas diferentes, sendo que o segundo experimento foi instalado poucos dias depois da análise do primeiro, para confirmar os resultados do primeiro experimento.

5.5.7 Experimento 7 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 3 de exposição (24 poços) com vários genótipos para determinar o número de nematóides mortos

O procedimento 4 de extração de ricina e a metodologia 3 de exposição do nematóide a ricina foram utilizados.

Contou-se somente os números de nematóides mortos e foram utilizados os mesmos genótipos do experimento 5. Este experimento foi montado duas vezes, na primeira vez utilizou-se uma pipeta para retirar a porção mediana e na segunda uma seringa.

Após 18 horas de exposição contou-se os nematóides vivos e mortos dentro dos poços com auxílio de uma lupa.

5.5.8 Experimento 8 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 3 de exposição (24 poços) com vários genótipos para determinar porcentagem de nematóides mortos

O procedimento 4 de extração de ricina e a metodologia 3 de exposição do nematóide foram utilizados neste experimento e os mesmos genótipos do experimento 7, porém, foram contados os números de nematóides mortos e vivos.

Utilizou-se uma técnica diferente, que constitui em retirar 10 gotas de cada poço, localizar estas gotas em uma lâmina e fazer a contagem em um microscópio a fim de se obter maior precisão, sendo que na primeira repetição foi utilizada uma pipeta para retirar a porção Mediana e na segunda uma seringa.

Após 18 horas de exposição foram contados os nematóides vivos e os mortos dentro dos poços com auxílio de uma lupa.

5.6 Delineamento estatístico

Em todos os experimentos utilizou-se o delineamento inteiramente casualizados em relação à posição dos mesmos na estufa, todos contaram com 4 repetições, sendo cada placa de Petri considerada como uma repetição.

5.7 Análise dos resultados

Todos os resultados foram analisados pelos testes não paramétricos de Kurskal Wallis sendo considerados como diferentes todos os resultados que mostraram 95% ou mais de chance de ser diferentes quando extrapolados para 20000 casos. Além desses testes verificou-se a correlação entre a porcentagem de ricina e os números de nematóides mortos ou porcentagem de nematóides mortos.

Os experimentos estão apresentados abaixo de maneira resumida na Tabela 2.

Tabela 2. Experimentos executados

Exp.	Procedimento de extração	Metodologia de exposição	Tempo de exposição(h)	Característica avaliada	estirpe	% ricina nas sementes
1	1-papel filtro	1-papel filtro	24,48,72	Nem. mortos	N2,AB1	0-2,4-12,4
2	2-decantação	2-Petri	24	Nem. Mortos	N2,AB1	0-2,4-12,4
3	2-decantação	2-Petri	12,14,16,18,20,22,24	Halo de mortos Nem. Mortos	N2,AB1	0-2,4-12,4
4	2-decantação	2-Petri	18	Nem. Mortos	N2,	0-2,4-12,4
	3-banho-maria				AB1	
5	4-centrífuga	2-Petri	18	Nem. Mortos	N2,	0-2,4-5,6-7,6-8,1-9,2-10,3-10,8-12,4
6	4-centrífuga	3-24 poços	18	Nem. Mortos	AB1 N2,	0-2,4-12,4
7	4-centrífuga	3-24 poços	18	% Nem. Mortos Nem. Mortos	AB1 N2,	0-2,4-5,6-7,6-8,1-9,2-10,3-10,8-12,4
8	4-centrífuga	3-24 poços	18	Nem. Mortos	AB1 N2,	0-2,4-5,6-7,6-8,1-9,2-10,3-10,8-12,4
				% Nem. Mortos	AB1	0-2,4-5,6-7,6-8,1-9,2-10,3-10,8-12,4

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Experimento 1 Teste do procedimento 1 de extração (papel filtro) e metodologia 1 de exposição (papel filtro)

Neste experimento não houve constatação de nematóides mortos em torno dos discos de papéis tratados para nenhum dos genótipos e nenhuma das estirpes de *C. elegans* analisadas.

O mesmo ocorreu nas duas épocas em que o experimento foi conduzido desta forma a metodologia utilizada foi considerada ineficiente, mostrando a necessidade de inserir a solução de ricina através de outro procedimento.

6.2 Experimento 2 Teste do procedimento 2 de extração (Decantação) e metodologia 2 de exposição (Petri)

Neste experimento houve diferença no comportamento das duas estirpes, pois ao comparar-se a resposta das estirpes aos genótipos com diferentes quantidades de ricina, verificou-se diferença significativa (Tabela 3).

Tabela 3. Número de nematóides mortos e tamanho do halo observado em torno da cavidade da placa contendo *C. elegans* para o experimento 2 comparados pelo teste de Kurskal Wallis com uma significância de 5%

Nem	Genótipo	%ricina	Época 1		Época 2	
			Nematóides mortos	Diâmetro do halo em mm	Nematóides mortos	Diâmetro do halo em mm
AB1	Hale	12,4	37 a	19,4 b	39a	17,80b
AB1	VNIIMK N1651	2,4	40 a	11,6c	36a	13,40c
AB1	Controle	0	27 a	24,5 ^a	27a	23,00a
N2	Hale	12,4	208 a	14,2 a	229a	15,00a
N2	VNIIMK N1651	2,4	87 b	6 b	88b	7,00b
N2	Controle	0	21 c	0 c	24c	0,00c
Correlação para						
N2.			0,715565	0,945882	0,797841	0,916599

Na estirpe AB1, a testemunha mostrou maior diâmetro de halo de nematóides mortos (24,5mm e 23,0mm) que os tratamentos contendo ricina (11,6mm; 19,4mm; 13,4mm; 17,8mm), isso ocorreu provavelmente por que os nematóides analisados possuem alguma resistência como sugerido por Orgonie et al 2002 ou a *E. coli* usaram a ricina, ou resíduos que tenham sido carregados junto com a mesma, como alimento. Quando analisada o número de nematóides mortos não houve diferença significativa entre eles para estirpe AB1.

Enquanto que a estirpe N2 apresentou diferença significativa, tendo quantidade maior de nematóides mortos (208 e 229) e maior halo (14,2mm e 15mm) na cultivar Hale, o qual apresentou maior quantidade de ricina, o número de nematóides mortos menor (21 e 24) e halo menor (0mm) na testemunha, e para o outro genótipo um número de nematóides mortos (87 e 88) e tamanho do halo (6mm e 7mm) foram intermediários, sendo um indicativo de que esta estirpe é a melhor a ser utilizada para testes de quantificação de ricina.

Quando analisada a correlação entre a porcentagem de ricina e o diâmetro do halo de nematóides mortos verificou-se correlação positiva de 0,95 e 0,92 para estirpe N2 na primeira e na segunda época respectivamente, assim como entre concentração de ricina e o número de nematóides mortos para N2 que foram de 0,72 na primeira época e 0,80 na segunda época do experimento, confirmando assim a aptidão desta estirpe para ser utilizada neste teste.

6.3 Experimento 3 Teste para avaliar melhor tempo de leitura de nematóides mortos

O melhor momento para as análise (Tabela 4) foi a partir das 17 horas após a adição solução, mas devido a variação deste número ao longo do tempo recomenda-se que seja feito pelo menos três medições, pois para AB1 as 16:00 e 16:20 e para N2 as 13:00 e 13:20 foram semelhantes, devido ao exposto foi decidido iniciar as medições após 18 horas da exposição.

Por se considerar tempo suficiente para que a morte dos nematóides possa ser consolidada, porem recomenda-se que sejam feitas ao menos 3 medidas na mesma amostra.

Tabela 4. Dados de Número de nematóides mortos e tamanho do halo observado em torno da cavidade da placa contendo *C. elegans* para o experimento 3, comparados pelo teste de Kurskal Wallis com uma significância de 5%.

Nematóide	Genótipo	% Ricina	Horas após adição de ricina	nem mortos
AB1	Hale	12,4	12:00	35
AB1	VNIIMK N1651	2,4	12:20	16
AB1	Controle	0	12:40	0
N2	Hale	12,4	13:00	28
N2	VNIIMK N1651	2,4	13:20	24
N2	Controle	0	13:40	0
AB1	Hale	12,4	14:00	52
AB1	VNIIMK N1651	2,4	14:20	32
AB1	Controle	0	14:40	0
N2	Hale	12,4	15:00	63
N2	VNIIMK N1651	2,4	15:20	30
N2	Controle	0	15:40	0
AB1	Hale	12,4	16:00	26
AB1	VNIIMK N1651	2,4	16:20	26
AB1	Controle	0	16:40	1
N2	Hale	12,4	17:00	119
N2	VNIIMK N1651	2,4	17:20	73
N2	Controle	0	17:40	0
AB1	Hale	12,4	18:00	35
AB1	VNIIMK N1651	2,4	18:20	25
AB1	Controle	0	18:40	0
N2	Hale	12,4	19:00	55
N2	VNIIMK N1651	2,4	19:20	39
N2	Controle	0	19:40	0
AB1	Hale	12,4	20:00	32
AB1	VNIIMK N1651	2,4	20:20	24
AB1	Controle	0	20:40	1
N2	Hale	12,4	21:00	49
N2	VNIIMK N1651	2,4	21:20	30
N2	Controle	0	21:40	0
AB1	Hale	12,4	22:00	25
AB1	VNIIMK N1651	2,4	22:20	18
AB1	Controle	0	22:40	0
N2	Hale	12,4	23:00	42
N2	VNIIMK N1651	2,4	23:20	27
N2	Controle	0	23:40	0

6.4 Experimento 4 Teste para comparar procedimentos de extração de ricina

Ao se comparar os três procedimentos, numa análise estatística pelo teste de kurskal wallis, pode-se notar uma diferença significativa (Tabela 5).

Tabela 5. Média de mortos de *C. elegans* comparando os 3 métodos de extração utilizados no experimento 4 pelo teste de Kurskal Wallis com uma significância de 5%

	Época 1	Época 2
Tratamentos	Nematóides Mortos	Nematóides Mortos
1	42,1 c	42,1 c
2	1,2 a	1.0a
3	24,9 b	25,1 b
t	0 a	0.0a

Tratamento 1 = procedimento 2 de extração;
 Tratamento 2 = procedimento 3 de extração;
 Tratamento 3 = procedimento 4 de extração.

O tratamento 3 foi desenvolvido para se eliminar o excesso de material particulado e da turbidez apresentada no tratamento 1, que dificultava muito a leitura, pois além de levar nutrientes junto com a suspensão aquosa, o que prejudicava a eficiência e precisão do teste, carrega alta quantidade de material particulado tornando a suspensão turva, portanto difícil de se visualizar os nematóides mortos. . Como esperado ele apresentou diferença estatística significativa quando comparado com a testemunha nas duas épocas analisadas (Tabela 5).

Quando comparados as cultivares dentro das estirpes dentro de cada tratamento foi observada diferença significativa entre os mesmos (Tabela 6).

Tabela 6. Número de nematóides mortos observado em torno da cavidade da placa contendo *C. elegans* para o experimento 4 comparados pelo teste de Kurskal Wallis com significância de 5%

Nematóide	Tratamento	Genótipo	% Ricina	Época 1 Mortos	Época 2 Mortos
AB1	1	hale	12,4	16,2 b	30 a
AB1	1	VNIIMK N1651	2,4	35,2 c	34 a
AB1	T	controle	0	0 a	0 a
AB1	2	hale	12,4	3,25 b	4,75 b
AB1	2	VNIIMK N1651	2,4	0 a	0 a
AB1	T	controle	0	0 a	0 a
AB1	3	hale	12,4	12,4 b	10,2 a
AB1	3	VNIIMK N1651	2,4	23,4 c	15,8 a
AB1	T	controle	0	0 a	0 a
N2	1	hale	12,4	29,6 b	62,4 b
N2	1	VNIIMK N1651	2,4	23,2 b	42 b
N2	T	controle	0	0 a	0 a
N2	2	hale	12,4	1,6 b	0 a
N2	2	VNIIMK N1651	2,4	1,6 b	0 a
N2	T	controle	0	0 a	0 a
N2	3	hale	12,4	48,8 c	48,4 c
N2	3	VNIIMK N1651	2,4	32 b	25,2 b
N2	T	Controle	0	0 a	0 a

Tratamento 1 = procedimento 2 de extração;

Tratamento 2 = procedimento 3 de extração;

Tratamento 3 = procedimento 4 de extração

A estirpe AB1 mostrou novamente dados contraditórios sendo que: para o tratamento 1 não houve diferença significativa, no tratamento 2, apenas Hale apresentou nematóides mortos e no tratamento 3 o genótipo que possui menor quantia de ricina (2,4%) apresentou maior número de nematóides mortos (23,4 e 15,8) que hale que possui 12,4% de ricina (12,4 e 10,2).

Enquanto a estirpe N2 apresentou uma proporcionalidade, sendo que no tratamento 1 e 2 não houve diferença estatística entre os dois genótipos, porém no

tratamento 3 os dois se diferenciaram, confirmando assim ser esta a melhor estirpe para o teste, e a superioridade do tratamento 3 (procedimento 4 de extração).

A correlação entre o número de nematóides mortos e a porcentagem de ricina foi maior no tratamento 3 (0,84 e 0,71) quando comparado com o tratamento 1 (0,78 e 0,66) e 2(0,84 e -0,11) (Tab. 7), tendo a correlação como um bom indicativo de que os dados de porcentagem de ricina são proporcionais ao número de nematóides mortos, nota-se que o tratamento 3 deve ser utilizado, agilizando assim a contagem de nematóides, que se mostra facilitada devido a menor quantidade de impurezas carregadas junto com a solução de ricina, passando assim a adotar este tratamento para os demais experimentos.

Utilizou-se a correlação para AB1 e foi confirmado que esta estirpe é inadequada para o teste.

Tabela 7. Dados de correlação entre porcentagem de ricina e número de nematóides mortos para o experimento 4

Tratamentos		Época 1	Época 2
N2	t1	0,78	0,66
N2	t2	0,84	-0,11
N2	t3	0,84	0,71
AB1	t1	0,19	0,54
AB1	t2	0,90	0,44
AB1	t3	-0,10	0,35

Tratamento 1 = procedimento 2 de extração;
 Tratamento 2 = procedimento 3 de extração;
 Tratamento 3 = procedimento 4 de extração

6.5 Experimento 5 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 2 de exposição (Petri) com vários genótipos

Neste experimento pode-se verificar diferença estatística entre AB1 (5,0) e N2 (22,8) (Tabela 8) mostrando que as estirpes realmente se comportam de maneira diferente, e confirmando a inadequação da estirpe AB1 para detectar teor de ricina tóxica.

Tabela 8. Média de mortos das estirpes de *C. elegans* utilizada no experimento 5 comparados pelo teste de Kurskal Wallis com uma significância de 5%

Nem	Nem.
	Mortos
AB1	5,0 a
N2	22,8 b

Quando analisadas separadamente cada estirpe (Tabela 9), os genótipos não mostraram diferença estatística entre si quando levado em conta os dados referentes a estirpe AB1, mas para estirpe N2 houve diferença estatística entre os genótipos indicando ainda mais que N2 é a estirpe ideal para o teste.

Informação que é confirmada quando analisada a correlação da quantidade de ricina e número de mortos, para AB1 (a correlação é de -0,05) confirmando sua inadequação, e provável resistência a ricina.

A correlação entre ricina e mortos para a estirpe N2 é de 0,80, correlação relativamente alta, principalmente se considerarmos a diferença entre a toxidez e a quantificação química.

Porém esta metodologia ainda se mostrou muito trabalhosa, pois é de grande dificuldade a contagem de nematóides mortos em placas de Petri, o que levou ao início dos testes em placas com 24 poços.

Tabela 9. Dados de número de nematóides mortos em torno da cavidade da placa contendo *C. elegans* para o experimento 5 comparados pelo teste de Kurskal Wallis com uma significância de 5%

Nematóide	Genótipo	% Ricina	Nematóides Mortos
AB1	Controle	0	3,25 a
AB1	VNIIMK N1651	2,4	4,5 a
AB1	8838	5,6	4,5 a
AB1	Acik Kahverengi	7,6	5,0 a
AB1	Kahverengi	8,2	5,12 a
AB1	Erari	9,1	5,5 a
AB1	Divela	10,3	5,75 a
AB1	Erari	10,8	5,75 a
AB1	Hale	12,4	6,0 a
N2	Controle	0	8,0 a
N2	VNIIMK N1651	2,4	16 b
N2	8838	5,6	21,5 c
N2	Acik Kahverengi	7,6	22,5 c, d
N2	Kahverengi	8,2	23,5 c, d, e
N2	Erari	9,1	24,5 d, e, f
N2	Divela	10,3	25,8 f, g
N2	Erari	10,8	26,7 g
N2	Hale	12,4	33,5 h

6.6 Experimento 6 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 3 de exposição (24 poços)

Quando se levou o teste para as placas com 24 poços os dados se confirmaram em relação aos genótipos com diferentes quantidades de ricina na semente, sendo que não houve diferença estatística na porcentagem de mortos na estirpe AB1, confirmando ser inadequada, enquanto que a diferença estatística foi constatada na estirpe N2 estes dados

foram reais para ambas as repetições (Tabela 10), vale ressaltar que não houve diferença estatística entre o número de nematóides mortos para nenhuma estirpe.

Tabela 10. Média de mortos por cavidade da placa de 24 poços contendo *C. elegans* para o experimento 6 comparados pelo teste de Kurskal Wallis com uma significância de 5%

Nem.	genótipo	%	Época 1			Época 2				
			ric	mortos	vivos	total	% de mortos	mortos	vivos	Total
AB1	hale	12,4	8,2 a	129,4 a	137,6 a	5,70 a	11 a	134,8 a	145,8	7,3 a
AB1	VNIIMK	2,4	15,6 a	154,4 a	170 a	9,63 a	10,8 a	147,8 a	158,6	7,0 a
AB1	controle	0	20 a	151 a	171 a	11,25 a	23,8 b	140,4 a	164,2	14,0 b
N2	hale	12,4	24 a	31,6 a	55,6 a	43,54 c	29,6 a	36,8 a	66,4	44,8 c
N2	VNIIMK	2,4	21 a	38,4 a	59,4 a	30,11 b	31,4 a	56,6 a	88,0	34,8 b
N2	controle	0	36,0 a	116,6 b	152,6 b	23,34 a	35,6 a	110,8 b	146,4	21,8 a

Quando analisadas as correlações entre as porcentagem de ricina e porcentagem de mortos na estirpe N2 a correlação foi de 0,72 e 0, 80, mostrando assim sua grande proporcionalidade, já em relação a estirpe AB1 a correlação foi de -0,56 e -0,48. O que levou ao teste com maior número de genótipos e confirmou-se a eficiência do teste.

6.7 Experimento 7 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 3 de exposição (24 poços) com vários genótipos para determinar o número de nematóides mortos

Neste experimento foram utilizados vários genótipos com diferentes quantidades de ricina (Tabela 11), e mais uma vez a estirpe AB1 se mostrou ineficiente, pois a correlação entre porcentagem de ricina e número de nematóides mortos na primeira época foi de 0,25 e na segunda época 0,26.

Para a estirpe N2 no primeiro experimento a mesma correlação foi 0,40 e no segundo experimento foi 0,82, mostrando que a seringa foi mais eficiente, isso se deve ao fato de maior facilidade para retirar a porção mediana sem trazer resíduos da parte superior, que servem de alimento para o nematóide e influenciam no resultado do experimento.

Para verificar a correlação, permanece igual na porcentagem de mortos, montou-se mais dois experimentos.

Tabela 11. Média de mortos por cavidade da placa de 24 poços contendo *C. elegans* para o experimento 7 comparados pelo teste de Kurskal Wallis com uma significância de 5%

Nematóide	genótipo	% ricina	Época 1 mortos	Época 2 Mortos
AB1	Controle	0	2,0 a	2,8 a
AB1	VNIIMK N1651	2,4	3,8 a	2,8 a
AB1	8838	5,6	7,0 a	3,3 a
AB1	Acik Kahverengi	7,6	2,8 a	3,3 a
AB1	Kahverengi	8,1	5,5 a	3,5 a
AB1	Erari	9,2	4,3 a	3,5 a
AB1	Divela	10,3	3,0 a	4,0 a
AB1	Erari	10,8	22,3 a	8,0 a
AB1	Hale	12,4	22,8 a	3,0 a
N2	Controle	0	14,8 a	0,8 a
N2	VNIIMK N1651	2,4	48,8 a b	1,8 a
N2	8838	5,6	43,8 a b	6,8 b
N2	Acik Kahverengi	7,6	155,8 a b	7,8 b c
N2	Kahverengi	8,1	87,0 a b	9,0 b c
N2	Erari	9,2	334,0 b c	11,8 c d
N2	Divela	10,3	214,5 a b	12,8 d
N2	Erari	10,8	294,8 b c	11,3 c d
N2	Hale	12,4	540,0 c	14,3 d

6.8 Experimento 8 Teste do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 3 de exposição (24 poços) com vários genótipos para determinar porcentagem de nematóides mortos

Neste experimento a tendência dos anteriores confirmou-se (Tabela 12), pois a correlação entre teor de ricina e porcentagem de mortos para estirpe N2 foi de 0,78 e 0, 87, e para o AB1 foi de -0,39 e -0, 29, desta forma torna-se evidente que a metodologia 3 é adequada, utilizando a estirpe N2.

Tabela 12. Média dos dados obtidos por cavidade da placa de 24 poços contendo *C. elegans* para o experimento 8 comparados pelo teste de Kurskal Wallis com uma significância de 5%.

Nem.	Época 1					Época 2			
	Ric. %	Mortos	Vivos	Total	% mortos	Mortos	Vivos	Total	% mortos
AB1	0	38,2 a	41,0 a	79,2	48,4 d	38,8 a	43,8 a	82,6	47,4 d
AB1	2,4	49,0 a	132,6 b	181,6	27,6 a,b	51,2 a	134,0 b	185,2	28,1 a,b
AB1	6,5	11,0 a	22,2 a	33,2	32,4 a,b	10,8 a	21,2 a	32,0	33,0 a,b
AB1	8,1	33,2 a	50,6 a	83,8	40,6 c,d	36,6 a	51,8 a	88,4	43,9 c,d
AB1	10,3	23,0 a	44,4 a	67,4	35,6 b,c	27,4 a	50,4 a	77,8	36,6 b,c
AB1	12,4	27,0 a	119,8 b	146,8	21,3 a	43,2 a	140,0 b	183,2	25,5 a
N2	0	39,6 a	96,6 a,b	136,2	29,6 a	36,2 a	106,8 a,b	143,0	25,8 a
N2	2,4	147,2 b	359,2 d	506,4	26,9 a	132,0 b	355,8 d	487,8	26,5 a
N2	6,5	21,0 a	42,4 a	63,4	36,5 a,b	33,2 a	52,2 a	85,4	39,5 b
N2	8,1	124,2 b	147,2bc	271,4	45,5 b,c	105,8 b	138,4 b,c	244,2	43,7 b
N2	10,3	159,6 b	168,2 c	327,8	48,1 c	180,6 c	185,0 b,c	365,6	49,3 b,c
N2	12,4	163,8 b	137,4bc	301,2	54,6 c	190,2 c	162,6 c	352,8	55,5 c

Uma vez que esta metodologia já está comprovada, vale esclarecer que o fato da correlação ser em torno de 0,8 já era esperada, pois todos os métodos utilizados na verdade testaram o complexo ricina-RCA, e como as aglutinas RCA são menos tóxicas do que

a ricina, este teste mede toxidez real das sementes, e não a quantificação química do mesmo, além de ser um método mais barato que os demais, não envolve o uso de anticorpos, que leva a necessidade de cobaias para produção do mesmo, e não necessita de equipamentos caros para sua medição.

Mas há ainda uma alternativa mais rápida e prática para fazer esta medição que se trata de fazer toda metodologia testada e comprovada neste trabalho, porém ao invés de contar manualmente, pode-se adicionar 5(6)-Carboxyfluoresceína diacetato nos poços e realizar a leitura através de um espectrofotômetro de fluorescência (GNOULA et al 2007).

O uso deste equipamento não foi adotado no presente trabalho pela indisponibilidade do mesmo, porém fica aqui proposta a sua utilização.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estirpe AB1 do nematóide *C. elegans* mostrou-se inadequada para este tipo de teste, porém a estirpe N2 do mesmo nematóide se mostrou bastante adequada e eficiente, existindo ainda a possibilidade de que sejam testadas outras estirpes deste nematóide.

O procedimento 1 de extração junto com a metodologia 1 de exposição se mostraram ineficientes

O procedimento 2 de extração se mostrou eficiente em extrair ricina, porém carrega grande quantidade de material particulado e parte do óleo consigo dificultando assim a leitura da placa.

O procedimento 3 de extração mostrou-se ineficiente.

O procedimento 4 de extração de ricina mostrou-se eficiente, além de resultar em uma solução transparente e limpa sendo o procedimento mais adequado para quantificar a ricina tóxica.

A metodologia 2 de exposição do nematóide a ricina mostrou-se eficiente, porém de difícil leitura por se tratar de uma placa de Petri onde os nematóides se encontram todos aglomerados em torno das colônias de *E. coli*.

A metodologia 3 de exposição do nematóide a ricina mostrou-se a mais eficiente por não conter fatores externos como alimentos presentes no meio de cultura, colônias de *E. coli*, etc., que poderiam influenciar nos resultados.

8 CONCLUSÕES

É viável e exeqüível quantificar a ricina tóxica presente na semente de mamona utilizando a estirpe N2 do nematóide *C. elegans* como bioindicador, por meio do procedimento 4 de extração (centrífuga) e metodologia 3 de exposição (24 poços).

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALLAY A; AUSUBEL F. M. *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host-pathogen interactions. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 97-101, Feb 2002.

ANDERSON G. P.; NERURKAR N. L. Improved Xuoroimmunoassays using the dye Alexa Fluor 647 with the RAPTOR, a Weber optic biosensor, **Journal Immunology Methods**, New York, NY, USA, v. 271, p.17-24, 2002.

AZEVEDO, D. M. P. ; BELTRAO, N. E. M. **O agronegócio da mamona no Brasil** 2. ed., Campina Grande: EMBRAPA; 2007.

BELTRÃO, N. E. M. et al. Fitologia. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. (Eds.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília, IDF: EMBRAPA Algodão, 2001. cap. 2, p. 37-61.

BRAKEFIELD P. M.. et al, What are the effects of maternal and pre-adult environments on ageing in humans, and are there lessons from animal **Mechanisms of Ageing and Development**, Baltimore, MD, USA, v. 126, n. 3, p. 431-438, Mar 2005.

BRIGNULL H. R., et al, Modeling polyglutamine pathogenesis in *C. elegans*. **Methods in Enzymology**, Berkeley, CA, USA, v.412, p. 256-282, 2006.

CARROLL P. M. et al, Model systems in drug discovery: chemical genetics meets genomics **Pharmacology & Therapeutics**, Kansas City, KS, USA, v. 99, n. 2, p. 183-220, Aug 2003.

CARVALHO, L. O. Mamona (*Ricinus communis* L.). In: SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. **Manual técnico das culturas**. 2. ed. Campinas, 1997. cap. 11, p. 349-368.

CARTER R. M. et al, Piezoelectric detection of ricin and aynity puri wed goat anti-ricin antibody, **Analytical Letters**, Cork, Ireland, v.28, p.1379–1386, 1995.

DHAKAL, B. K. et al, *Caenorhabditis elegans* as a simple model host for *Vibrio vulnificus* infection, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, NY, USA, v. 346, n. 3, p. 751-757, Aug. 2006

DELEHANTY, J. B.; LIGLER F. S. A microarray immunoassay for simultaneous detection of proteins and bacteria, **Analytical Chemistry**, London, UK, v. 74, p. 5681–5687, 2002.

DILL, K., et al Immunoassays based on electrochemical detection using microelectrode arrays. **Biosensor Bioelectronic**, Cranfield, UK, v, 20, p.736–742., 2004.

ENDO, Y. The. mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosome: the site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. **Journal of Biological Chemistry**, London, UK , v. 262, p. 5908-5912, 1987.

FABER, P W., et al. Glutamine/proline-rich PQE-1 proteins protect *Caenorhabditis elegans* neurons from huntingtin polyglutamine neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Science**, New York, NY, USA, v. 99, n. 26, p.17131-17136.

FENG, Z. et al, A *C. elegans* model of nicotine-dependent behavior: regulation by TRP-family channels. **Experimental gerontology**, Boulder, CO, v. 41, n.10, p. 974-991, Oct.2006.

GARBER, E. A. et al., Feasibility of immunodiagnostic devices for the detection of ricin, amanitin, and T-2 toxin in food, **Journal of Food Protection**, Washington, DC, USA, v. 68, p. 1294–1301, 2005.

GIBELLI, F. Projeto poiuretano de óleo de mamona e seus subprodutos. In: CÂMARA, G. M. S.; CHIAVEGATO, E. J. (Coordn.). **O agro negócio das plantas oleaginosas**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Produção Vegetal, 2001. cap. 10, p. 181-184.

GRIYTHS G. D.; NEWMAN, H.; GEE, D. J., Identification and quantification of ricin toxin in animal tissues using ELISA. **Journal of Forensic Science Society**, London, UK, v. 26, p. 349–358, 1986.

GNOULA, C. M.; GUISSOU, J. D.; PIERRE, D. 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate as an indicator of *Caenorhabditis elegans* viability for the development of an *in vitro* anthelmintic drug assay. **Innocent Talanta**, Bruxelles, Belgique, v.71, n.5, p. 1886-1892, Mar. 2007.

HAES, A. J.; GIORDANO, B. C.; COLLINS, G. E. Aptamer-based detection and quantitative analysis of ricin using affinity probe capillary electrophoresis, **Analytical Chemistry**, Chapel Hill, NC, v. 78, p. 3758-3764, 2006

HARADA, H et al.; Shortened lifespan of nematode *Caenorhabditis elegans* after prolonged exposure to heavy metals and detergents, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.66, n.3, p. 378-383, May 2007.

HUELSEWEH, B.; EHRLICH, R.; MARSCHALL, H. J.; A simple and rapid protein array based method for the simultaneous detection of biowarfare agents, **Proteomics**, Dublin, Ireland, v.6, n.10, p.2972-2981, 2005. In press.

HUFFMAN, D. L. et al. Pore worms: Using *Caenorhabditis elegans* to study how bacterial toxins interact with their target host. **International Journal of Medical Microbiology**, Birmingham, UK, v. 293, n. 7-8, p. 599-607, 2004.

JI, H. F. et al. Molecular recognition of biowarfare agents using micromechanical sensors, **Expert Review of Molecular Diagnostics**, London UK, Diagn. 4, v.4, p. 859-866, 2004.

KAMPKÖTTER, A. et al. The *Ginkgo biloba* extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans* **Pharmacological Research**, Tokyo, Japan, v. 55, n. 2, p. 139-147, Feb. 2007

KIRBY, R. et al. Aptamer-based sensor arrays for the detection and quantitation of proteins. **Analytical Chemistry**, Chapel Hill, NC, v. 76, p. 4066–4075, 2004.

KOJA, N.; SHIBATA, T.; MOCHIDA, K., **Toxicol**, New York, NY, v.18, p. 611-618, 1980.

LABROUSSE, A. et al, *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium* **Current biology**, London, UK, v.10, n. 23, p. 1543-1545, Nov.2000.

LEITH, A. G.; GRIFFITHS, G. D.; GREEN, M. A., **JOURNAL Forensic Science Society**, London, UK, v.28, p. 227-236, 1988.

LIGLER, F. S. et al., Array biosensor for detection of toxins [review], **Analytical and Bioanalytical chemistry**, Heidelberg, Germany, v. 377, p. 469–477, 2003.

LINDBLOM, T. H.; PIERCE, G. J.; SLUDE, A. E.: A *C. elegans* orphan nuclear receptor contributes to xenobiotic resistance. **Current biology**, London, UK, v. 11, n. 11, p. 864-868, Jun. 2001.

LINK, C. D.: *C. elegans* models of age-associated neurodegenerative diseases: Lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology**, Boulder, CO, v. 41, n. 10, p. 1007-1013, Oct.2006.

LUBELLI, C. A. et al. : Detection of ricin and other ribosome-inactivating proteins by an immuno-polymerase chain reaction assay. **Analytical and Bioanalytical chemistry**, Heidelberg, Germany, v. 78, p. 3758-3764, 2006.

LU, C. et al.: Normal retinal development and retinofugal projections in mice lacking the retina-specific variant of actin-binding lim domain protein. **Neuroscience**, Washington, DC, v. 120, n. 1, p. 121-131, Aug.2003.

LORD, J. M.; ROBERTS, L. M. ; ROBERTUS, J. D. Rincin: strusture, mode of action, and some current applications.**FASEB Journal**, Stanford, USA, p. 201-208, 1984.

LOWERY, C. C. **Evaluation and Selection of Castor (*ricinus communis* L.) for reduced levels of toxins**, 2005. Thesis (Doctor in...) – Texas Technology University, Lubbock, Texas, 2005.

MATTHEWS, D. J.; KOPCZYNSKI, J., Using model-system genetics for drug-based target discovery. **Drug Discovery Today**, Bonn, Germany, v. 6, n. 3, p. 141-149, Feb 2001.

MEARS, J. A. et al.; Modeling a minimal ribosome based on comparative sequence analysis. **Journal of Molecular Biology**, London. UK, v. 321, n. 2, p. 215-234, Aug. 2002.

MOSHKIN, V.A. **Castor**, New Delhi, Amerind, 1986.

NARANG, U. et al.; Fiber optic-based biosensor for ricin. **Biosensor Bioelectronic** , London, UK, v. 12, p. 937–945, 1997.

OLSNES, S.; PHIL, A. Toxic lectins and related proteins. In: COHEN, P: VAN HEYNINGEN S. (Eds.). **Molecular action of toxins and viruses**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Biomedical Press, 1982, p. 51-105.

ORGONIE, G. B. et al. Lysosomal and pseudocoelom routing protects *Caenorhabditis elegans* from ricin toxicity. **Nematology**, Vermont, v. 5, n. 3, p. 339-350, 2003

PINKERTON, S. D. et al. Selection for divergent concentrations of ricin and *Ricinus communis* Agglutinin. **CropScience**, Pittsburgh, PA, v. 39, n. 2, p. 353-357, 1999.

POLI, M. A. et al Detection of ricin by colorimetric and chemiluminescence ELISA. **Toxicon**, New York, NY, v. 32, p. 1371–1377, 1994.

ROBERTUS, J. Toxin structure. In: FRANKEL A. (Ed.) **Immunotoxins**, Boston, Mass: Kluver Academic, 1988, p. 11-24.

RUBINA, A.,Y. et al. Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips, **Analitical and Bioanalitical chemistry**, Heidelberg, Germany, v. 340, p. 317–329, 2005.

SAMARA, C.; TAVERNARAKIS, N. Calcium-dependent and aspartyl proteases in neuro degeneration and ageing in *C. elegans*. **Ageing Research Reviews**, Baltimore, VA, v. 2, n. 4, p. 451-471, Oct.2003

SANTOS, R. F. et al. Análise Econômica. In: AZEVEDO, D. M. P. de.; LIMA, E. F. (Eds). **O agro negócio da mamona no Brasil**. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2001. cap. 1, p. 17-35.

SCHACHTER, H. Protein glycosylation lessons from *Caenorhabditis elegans*. **Current Opinion in Structural Biology**, Amsterdam, NL, v. 14, n. 5, p. 607-616, Oct. 2004.

SHYU, H. F. et al. Monoclonal antibodybased enzyme immunoassay for detection of ricin. **Hybrid Hybridomics**, Larchmont, NY, v. 21, p. 69-73, 2002.

SHYU, H. F. et al. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin, **Toxicon**, New York, NY, v. 40, p. 255–258, 2002.

SOCHOVÁ, I.; HOFMAN J.; HOLOUBEK I.. Effects of seven organic pollutants on soil nematode *Caenorhabditis elegans*, **Environment International**, Melbourne, Australia, v. 127, n. 3, p. 621-633, Nov.2006.

STINE, R.; PISHKO, M. V.; SCHENGRUND, C. L. Comparison of glycosphingolipids and antibodies as receptor molecules for ricin detection, **Analitical and Bioanalitical chemistry**, Heidelberg, Germany , v. 77, p. 2882–2888, 2005.

SAVY FILHO, A. et al. Mamona. In: COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL. **Oleaginosas no Estado de São Paulo: análise e diagnóstico**. Campinas, 1999. 39 p. (Documento técnico, 107).

THOMPSON, G.; POMERAI, D.I. **Toxicity of short-chain alcohols to the nematode *Caenorhabditis elegans***: a comparison of endpoints. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, West Sussex, v. 19, n. 2, p. 87-95, 2005.

VAN HORN, D. L. Castor bean production. **Farmers Bulletin**, Washington, DC, n. 2041, p.3, 1952.

VENTURA, N.; REA, S. L.; TESTI, R. Long-lived *C. elegans* mitochondrial mutants as a model for human mitochondrial-associated diseases. **Experimental Gerontology**, England, v.41, n.10, p.974-991, Sep. 2006.

WANG, L. et al. Fluorescent nanometer microspheres as a reporter for sensitive detection of stimulants of biological threats using multiplexed suspension arrays, **Bioconjugate Chemistry**, Washinton, DC, USA, v. 16 p. 194–199, 2005.

WANNEMAKER R. **Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare**, Washinton, DC, USA p. 631-642, 1998

YOULE, R.; HUANG, A. Protein bodies from the endosperm of castor beans, sub fractionation, protein components lectins, and changes during germination. **Plant Physiology**, Waterbury,VT, USA, v.58, p. 703, 1976.

ZHAO, L.; HASLAM, D. B. A quantitative and highly sensitive luciferase based assay for bacterial toxins that inhibit protein synthesis, **Journal of Medical Microbiology**, London, UK, v. 5, 2005