

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

CAROLINA JULIA COSTA SARAIVA

**METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE RICININA EM
AMOSTRAS BIOLÓGICAS NO DIAGNÓSTICO DAS INTOXICAÇÕES POR
*Ricinus communis***

Belo Horizonte

2025

CAROLINA JULIA COSTA SARAIVA

**METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE RICININA EM
AMOSTRAS BIOLÓGICAS NO DIAGNÓSTICO DAS INTOXICAÇÕES POR
*Ricinus communis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Benito Soto-Blanco

Belo Horizonte

2025

S243m Saraiva, Carolina Julia Costa ,1997-
Metodologias analíticas para determinação de ricinina em amostras biológicas no diagnóstico das intoxicações por *Ricinus communis*/Carolina Julia Costa Saraiva.- 2025.
63 f: il.

Orientador: Benito Soto - Blanco
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.
Bibliografia f. 58 a 63.

1. Animais domésticos - Teses - 2. Plantas tóxicas - Teses - 3.Ciência Animal - Teses - I. Soto-Blanco, Benito - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAROLINA JULIA COSTA SARAIVA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **MESTRE** em **CIÊNCIA ANIMAL**, área de concentração **Medicina e Cirurgia Veterinárias**. Defesa da dissertação intitulada: "**Metodologias analíticas para determinação de ricinina em amostras biológicas no diagnóstico das intoxicações por Ricinus communis.**"

Aprovado(a) em 27 de março de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Benito Soto Blanco - Orientador(a)

Dr.(a). Antonio Ultimo de Carvalho

Dr.(a). Ivana Cristina Nunes Gadelha Lelis



Documento assinado eletronicamente por **Benito Soto Blanco, Presidente**, em 28/03/2025, às 10:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Ultimo de Carvalho, Professor do Magistério Superior**, em 28/03/2025, às 17:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ivana Cristina Nunes Gadelha Lelis, Usuária Externa**, em 31/03/2025, às 14:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4071793** e o código CRC **2C8326F2**.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço ao professor Benito pelos ensinamentos, trabalho, correções, paciência e pela companhia de laboratório sempre agradável e bom humor de todos os dias. Sem dúvida essa experiência ao seu lado foi a melhor escolha dos últimos anos. Obrigada pela leveza e por tornar toda tarefa mais empolgante.

Agradeço aos meu pais, pela dedicação de uma vida, pelo cuidado, carinho, incentivo e principalmente por sempre acreditarem em mim. Obrigada por estarem presente em todas as situações.

Agradeço a Kelly, Ciça e Son pela amizade e companheirismo, incentivo, conselhos e por estarem sempre comigo.

À minha querida tia Vilma pelo carinho e cuidado, pelo incentivo e por facilitar momentos em toda minha vida.

À minha psicóloga Thaís, por nunca me abandonar e, pacientemente, insistir em tudo que é essencial para minha evolução. Sem você, Thais, nada disso seria possível.

Ao Diego pela amizade e por nunca desistir de mim e aos colegas desta escola que tive o prazer de compartilhar momentos, principalmente a Maílson, Thais Vann e Bárbara dos Santos, pela amizade, colaboração e bons momentos.

Finalmente, aos professores da Escola de Veterinária da UFMG, que muito contribuíram para meu aprendizado e aperfeiçoamento.

Esta dissertação teve apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio da Chamada CNPq Nº 02/2021 - Apoio à Pesquisa Científica, Tecnológica e de Inovação: Bolsas de Mestrado e Doutorado (Processo: 400843/2021-8) e da Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 18/2021 - Universal (processo 403739/2021-7).

RESUMO

Ricinus communis, conhecida como mamona ou carrapateira, é uma oleaginosa de distribuição mundial e de importante papel nas intoxicações de animais domésticos. Sua toxicidade complexa envolve diferentes tipos de toxinas, como a ricina e a ricinina, que estão presentes em diversas partes vegetais, assim como nos resíduos da produção do óleo de mamona. A manifestação da intoxicação varia de acordo com a quantidade de material ingerida, espécie envolvida, suscetibilidade individual e incluem sintomatologia gastrointestinal, pela ação da ricina, e sintomatologia neurológica, pela ação da ricinina. O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinação dos níveis de ricinina em amostras de urina, fígado e fluido ruminal bovino, para utilização como marcador químico auxiliar no diagnóstico laboratorial de intoxicação por *Ricinus communis*. Foi desenvolvida uma metodologia utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta e outra utilizando cromatografia em camada delgada (CCD) em fluido ruminal. A metodologia por CCD gera resultados qualitativos, mas é de simples implantação e baixo custo. Neste estudo, a detecção de ricinina por CCD apresentou melhor sensibilidade utilizando fluorescência na sua avaliação (0,5 µg) do que após revelação com o reagente de Dragendorff (1,0 µg). Porém, diante das concentrações muito baixas de ricinina nas amostras, esta metodologia pode não ser sensível o suficiente para muitos casos. A metodologia de CLAE desenvolvida neste estudo apresentou limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) da ricinina variando conforme o comprimento de onda utilizado, sendo inferiores quando utilizado 208 nm, seguido por 308 nm e 315 nm. Nas amostras de fígado, o LD foi de 0,375 µg/mL (utilizando comprimento de onda de 218 nm) e 1,25 µg/mL (315 nm) e o LQ foi 1,25 µg/mL (218 nm) e 4,175 µg/mL (315 nm). Para as amostras de fluido ruminal e urina, o LD foi de 0,15 µg/mL (218 nm) e 0,5 µg/mL (315 nm) e o LQ foi de 0,5 µg/mL (218 nm) e 1,67 µg/mL (315 nm). Dessa forma, a detecção de ricinina para confirmação da intoxicação em animais pelo consumo da mamona pode ser feita utilizando a metodologia de extração apresentada neste trabalho e análise por meio de CLAE e detecção por UV-Vis das amostras de fígado, urina e fluido ruminal. Por outro lado, a análise por CCD não é adequada para utilização na confirmação de casos de intoxicações por mamona em fluido ruminal.

Palavras-chave: Plantas tóxicas, intoxicação em animais, ricinina, ricina.

ABSTRACT

Analytical methods for determination of ricinin in biological samples in the diagnosis of *Ricinus communis* poisoning

Ricinus communis, known as castor bean, is an oilseed with worldwide distribution and is important in poisoning domestic animals. Its complex toxicity involves different types of toxins, such as ricin and ricinin, which are present in various plant parts and in residues from castor oil production. The manifestation of poisoning varies according to the amount of material ingested, species involved, and individual susceptibility, including gastrointestinal signs due to the action of ricin and neurological symptoms due to the action of ricinin. The present study aims to develop and validate an analytical methodology for determining ricinin levels in urine, liver, and bovine ruminal fluid samples, for use as an auxiliary chemical marker in diagnosing poisoning by *R. communis*. A methodology was developed using high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection, and another was used using thin-layer chromatography (TLC) in ruminal content. The TLC methodology generates qualitative results but is simple to implement and has a low cost. In this study, the detection of ricinin by TLC showed better sensitivity using fluorescence in its evaluation (0.5 µg) than after development with the Dragendorff reagent (1.0 µg). However, given the samples' very low concentrations of ricinin, this methodology may not be sensitive enough for many cases. The HPLC methodology developed in this study showed the detection limit (LD) and quantification limit (LQ) of ricinin varying according to the wavelength used, being lower when using 208 nm, followed by 308 nm and 315 nm. In liver samples, the LD was 0.375 µg/mL (using a wavelength of 218 nm) and 1.25 µg/mL (315 nm) and the LQ was 1.25 µg/mL (218 nm) and 4.175 µg/mL (315 nm). For rumen fluid and urine samples, the LD was 0.15 µg/mL (218 nm) and 0.5 µg/mL (315 nm) and the LQ was 0.5 µg/mL (218 nm) and 1.67 µg/mL (315 nm). Thus, the detection of ricinin to confirm poisoning in animals due to consumption of castor beans can be done using the extraction methodology presented in this work and analysis by HPLC and UV-Vis detection of liver, urine, and ruminal fluid samples. On the other hand, TLC analysis is unsuitable for confirming cases of poisoning by castor beans in ruminal fluid.

Keywords: Poisonous plants, animal poisoning, ricinin, ricin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Achados patológicos de cães intoxicados por torta de mamona.....	25
Figura 2: Histopatológico de cães intoxicados por torta de mamona.....	26
Figura 3: Achados patológicos de cavalos intoxicados por torta de mamona.....	28
Figura 4: Histopatológico da intoxicação accidental por torta de mamona em equinos.....	29
Figura 5: Sinais clínicos em caprinos intoxicados pela ingestão de folhas de mamona.....	33
Figura 6: Achados patológicos de bovinos intoxicados pela ingestão de sementes, folhas e pericarpos de mamona.....	35
Figura 7: Histopatológico de bovinos intoxicados pela ingestão de sementes, folhas e pericarpos de mamona- Miocárdio.....	36
Figura 8: Histopatológico de bovinos intoxicados pela ingestão de sementes, folhas e pericarpos de mamona- Abomaso.....	36
Figura 9: Achados de necrópsia de ovino intoxicado pela ingestão de sementes, folhas e pericarpos de mamona- Abomaso.....	37
Figura 10: Achados de necrópsia de ovino intoxicado pela ingestão de sementes, folhas e pericarpos de mamona- Coração.....	37
Figura 11: Histopatológico de ovino intoxicado pela ingestão de sementes, folhas e pericarpos de mamona- Miocárdio.....	38
Figura 12: Histopatológico de ovino intoxicado pela ingestão de sementes, folhas e pericarpos de mamona- Rim.....	38
Figura 13: Envenenamento espontâneo por <i>Ricinus communis</i> em cabras.....	39
Figura 14: Histopatológico- fígado de caprinos intoxicados pela ingestão de sementes, folhas e pericarpos de mamona.....	40
Figura 15: Perfil do espectro UV (190-400 nm) da ricinina isolada.....	47
Figura 16: Linearidade da curva padrão com leitura a 218 nm.....	48
Figura 17: Linearidade da curva padrão com leitura a 308 nm.....	49
Figura 18: Linearidade da curva padrão com leitura a 315 nm.....	49
Figura 19: Cromatograma em 3D de amostra de fígado adicionada com 5 µg/ml.....	50
Figura 20: Cromatograma em 3D de amostra de fluido ruminal adicionada com 5 µg/ml.....	52
Figura 21: Cromatograma em 3D de amostra de urina adicionada com 5 µg/ml.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limites de detecção e de quantificação obtidos nos diferentes comprimentos de onda utilizados para leitura.....	50
Tabela 2: Efeito matriz e limites de detecção e de quantificação obtidos para amostras de fígado, de acordo com os diferentes comprimentos de onda utilizados para leitura.....	51
Tabela 3: Recuperação de diferentes concentrações de ricinina adicionadas em amostra branca de fígado, de acordo com os diferentes comprimentos de onda utilizados para leitura.....	51
Tabela 4: Efeito matriz e limites de detecção e de quantificação obtidos para amostras de fluido ruminal, de acordo com os diferentes comprimentos de onda utilizados para leitura.....	53
Tabela 5: Recuperação de diferentes concentrações de ricinina adicionadas em amostra branca de fluido ruminal, de acordo com os diferentes comprimentos de onda utilizados para leitura.....	53
Tabela 6: Efeito matriz e limites de detecção e de quantificação obtidos para amostras de urina, de acordo com os diferentes comprimentos de onda utilizados para leitura.....	55
Tabela 7: Recuperação de diferentes concentrações de ricinina adicionadas em amostra branca de urina, de acordo com os diferentes comprimentos de onda utilizados para leitura.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

PNPB	Programa Nacional de Produção e uso de Biodiesel
RIP2	Ribosome Inactivating Protein type 2
CCD	Cromatografia de camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
HPLC	High performance liquid chromatography
GABA	Ácido γ -aminobutírico subtipo A
h	Hora
min	Minuto
RCA1/ RCA120	<i>Ricinus communis</i> agglutinin
Ric c 1/ Ric c 3	Compostos alérgenos de <i>Ricinus communis</i>
AST	Aspartato Aminotransferase
CPK	Creatinofosfoquinase
GGT	Gama-Glutamiltransferase
SNC	Sistema Nervoso Central
ELISA	Ensaio imunoenzimático
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RPM	Rotações por minuto
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
mAU	Milli-absorbance units (unidades de mili-absorbância)
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
pH	Percentual de hidrogênio
R2	Coeficiente de correlação
TLC	Thin layer chromatography
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
cm	Centímetro
v/v	Volume/volume
g	Grama
g/kg	Gramas por quilo

µg	Micrograma
ml	Mililitro
µg/ml	Micrograma por mililitro
µg/g	Micrograma por grama
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 Toxicidade de <i>Ricinus communis</i>	18
3.1.1 Ricina.....	19
3.1.2 Ricinina.....	20
3.1.3 Aglutinina de <i>Ricinus communis</i>	21
3.1.4 Compostos alérgenos.....	21
3.2 Intoxicação nos animais.....	22
3.2.1 Intoxicação em animais por ingestão de sementes e torta de mamona.....	23
3.2.2 Intoxicação em animais pela ingestão de folhas.....	31
3.2.3 Intoxicação em ruminantes por ingestão de folhas, pericarpos e sementes.....	33
3.3 Diagnóstico da intoxicação em animais.....	40
3.4 Tratamento das intoxicações.....	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 Extração de ricinina nos frutos de mamona para isolamento do padrão	43
4.2- Análises por cromatografia em camada delgada (CCD).....	43
4.3- Análises por cromatografia líquida de alta performance (CLAE).....	44
4.3.1- Preparo das amostras.....	44
4.3.2- Condições cromatográficas.....	45
4.3.3- Validação das técnicas analíticas de cromatografia líquida de alta performance (CLAE).....	45
5 RESULTADOS.....	47
5.1 Extração de ricinina nos frutos de mamona para isolamento do padrão.....	47
5.2 Análises por CCD.....	47
5.3 Análise por CLAE.....	48
5.3.1 Curva padrão.....	48

5.3.2- Utilização de amostras de fígado.....	50
5.3.3- Utilização de amostras de fluido ruminal.....	52
5.3.4 Utilização de amostras de urina.....	54
6 DISCUSSÃO.....	56
7 CONCLUSÃO.....	57
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Planta tóxica de interesse pecuário é aquela que, quando ingerida pelos animais, em condições naturais, causa danos à saúde ou mesmo a morte. Esta deverá ter sua toxicidade comprovada experimentalmente em determinada espécie animal para ser considerada tóxica (Tokarnia et al, 2012). Até o presente momento, foram descritas pelo menos 163 espécies de plantas tóxicas de importância pecuária no Brasil (Riet-Correa et al, 2023).

A presença de plantas tóxicas em áreas de pastagem representa um desafio significativo para a pecuária, exigindo atenção e ações proativas para proteger a saúde dos animais e a viabilidade econômica das propriedades rurais. A criação de animais de produção em pastagens nativas ou cultivadas, especialmente em sistemas extensivos ou semi- extensivos, proporciona um acesso mais amplo aos animais a diversas espécies de plantas, incluindo aquelas que são tóxicas. Essa exposição aumenta o risco de surtos de intoxicações, que têm se tornado uma preocupação crescente na pecuária brasileira (Pessoa et al., 2013).

As intoxicações por plantas podem resultar em perdas econômicas diretas, como queda no desempenho ou óbito, e/ou perdas econômicas indiretas, como custos de tratamento de animais acometidos, controle e prevenção de novos casos de intoxicação (Tokarnia et al., 2012). A intoxicação por plantas está entre as três causas mais comuns de mortes de bovinos adultos no Brasil (de Melo e de Almeida, 2020) e com base em dados obtidos de laboratórios de diagnóstico de diferentes regiões brasileiras, as perdas anuais devido à morte de animais causada por plantas foram estimadas em aproximadamente 1,3 milhão de bovinos, 422.000 ovinos, 58.000 caprinos e 38.500 equinos de uma população de quase 220 milhões de bovinos, 17,6 milhões de ovinos, 9,3 milhões de caprinos e 5,5 milhões de equinos (Riet-Correa et al., 2023). Diante desse cenário, o desenvolvimento de pesquisas voltadas ao estudo das intoxicações por plantas é fundamental. A partir dessas informações, é possível criar estratégias de manejo e controle para minimizar a exposição dos animais a essas espécies, promovendo uma produção animal mais saudável e sustentável.

Ricinus communis, popularmente conhecida como mamona ou carrapateira, é frequentemente citada como causa de intoxicação em animais de produção em todo o Brasil (Riet-Correa et al., 2012; Neto et al., 2013; Chagas et al., 2016; Riet-Correa et al., 2017; Francischini et al., 2018; Reis et al., 2020; Alves et al., 2021; Paim et al., 2023). A intoxicação natural por mamona em animais foi relatada em bovinos (Albuquerque et al., 2014), ovinos

(Bianchi et al., 2018), caprinos (Machado et al., 2022), equinos (Montão et al., 2018) e caninos (Soto-Blanco et al., 2002). Experimentalmente, a toxicidade da mamona já foi comprovada em bovinos (Marin et al., 2018), ovinos e caprinos (Armién et al., 1996; Bezerra e Brito, 1995), suínos (Araújo e da Silva, 2021) e coelhos (Britto e Tokarnia, 1997).

A mamona representa importância toxicológica para humanos e animais por conter uma mistura de substâncias tóxicas, como a ricina, a hemaglutinina de *R. communis* e o alcalóide ricinina. A ricina é uma toxina inativadora do ribossomo tipo II, encontrada nas sementes (Brito et al., 2019). A maioria dos casos de intoxicações por mamona, tanto pela ingestão de forma acidental ou por fome, são causados pela ricina, causando graves perturbações digestivas nos animais (Riet-Correa et al., 2017). As intoxicações também podem ocorrer após a ingestão dos produtos processados, como da torta de mamona (Soto-Blanco et al., 2002; Brito et al., 2019).

A ricinina (1,2-di-hidro-4-metoxi-1-metil-2-oxo-3-piridinocarbonitrila) é uma toxina da classe dos alcalóides piperidínicos de baixa massa molecular (164,2 mol) (Coopman et al., 2009). Todas as partes da mamona contêm ricinina (Franke et al., 2019). O consumo de folhas e pericarpo pode provocar sinais neurológicos agudos, que são atribuídos à ricinina (Bianchi et al., 2018).

O diagnóstico da intoxicação por *R. communis* é baseado na epidemiologia, sinais clínicos, achados patológicos e laboratoriais, sendo rara a confirmação da exposição por meio de testes toxicológicos. Assim, muitos casos de toxicose por mamona podem ser diagnosticados incorretamente ou permanecer não identificados. A dificuldade para a confirmação do diagnóstico de intoxicações naturais por mamona é a falta de metodologia analítica que permita a identificação da toxina nos animais intoxicados, estabelecendo de forma inequívoca que houve o consumo da planta. Essa confirmação da exposição é importante no diagnóstico de toxicose por ricina, já que a ingestão de mamona nem sempre é fatal, as lesões histológicas são inespecíficas e o grau de mastigação pode influenciar a dose efetiva de ricina (Mouser et al., 2007).

A determinação da ricina em amostras de casos suspeitos de intoxicação é complexa e onerosa, devido à baixa concentração e à fragmentação e complexação com proteínas nos tecidos, favorecendo a ocorrência de casos falso-negativos. Por outro lado, a ricinina pode servir como um biomarcador para exposição à ricina (Coopman et al., 2009; Machado et al., 2022). Sua detecção em amostras biológicas coletadas de casos suspeitos de envenenamento confirma a exposição a qualquer parte da planta de mamona. A utilização da ricinina como marcadora da intoxicação já foi realizada em amostras de urina (Johnson et al., 2005; Coopman et al., 2009), sangue e humor vítreo (Coopman et al., 2009) de humanos, conteúdo gástrico de cão

(Mouser et al., 2007) e conteúdo ruminal e fígado de caprinos (Machado et al., 2022). As metodologias analíticas incluíram a cromatografia líquida com detecção por ultravioleta (Machado et al., 2022) e por espectrometria de massas (Johnson et al., 2005; Mouser et al., 2007; Coopman et al., 2009).

Este projeto visa o desenvolvimento de metodologias para detecção da ricinina em amostras de urina, fígado e conteúdo ruminal de bovino, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), adaptando metodologias desenvolvidas para plantas e outras amostras. As técnicas de CLAE propiciam resultados quantitativos. Por outro lado, a cromatografia em camada delgada (CCD), também utilizada neste trabalho para análise do fluido ruminal de bovino, gera resultados qualitativos e é menos sensível, mas é de simples implantação e de menor custo, viabilizando sua implantação em grande número de laboratórios. Estas metodologias poderão ser utilizadas para confirmar ou descartar o consumo de mamona em casos de animais suspeitos da intoxicação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias analíticas para determinação dos níveis de ricinina em amostras de urina, fígado e fluido ruminal bovino, para utilização como marcador químico auxiliar no diagnóstico laboratorial de intoxicação por *Ricinus communis*.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver uma metodologia para identificação de ricinina em fluido ruminal bovino utilizando cromatografia em camada delgada (CCD);
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificação de ricinina em urina, conteúdo ruminal e fígado bovino utilizando cromatografia líquida de alta eficiência- detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD).

3 REVISÃO DE LITERATURA

Ricinus communis, popularmente conhecida como mamona, é um arbusto da família Euphorbiaceae de distribuição mundial, cultivada para produção industrial e como planta ornamental, além de ser invasora de pastagem. Possui fácil cultivo, tolerância à seca e boa adaptação a diferentes tipos de clima e solo (Oliveira et al., 2005).

A mamona é uma planta perene, herbácea ou semi-lenhosa, podendo atingir até 5 metros de altura. As folhas são palmadas, com 5 a 11 lóbulos profundamente incisos, de coloração verde a arroxeados ou verde-avermelhados e com 30 a 75 cm de diâmetro. O caule é de cor verde a roxo-avermelhado e possui entrenós ocos. A inflorescência apresenta coloração amarelo-esverdeadas, que nascem em espigas de até 30 cm de comprimento próximas ao topo dos caules. As flores femininas estão na metade superior da inflorescência e apresentam estigmas vermelhos visíveis. As flores masculinas estão na metade inferior da inflorescência e apresentam anteras amarelas vistosas. Seus frutos são cápsulas espinhosas, com diâmetro variando de 1,27 cm a 2,54 cm, de coloração amarelo-esverdeado, evoluindo para marrom conforme amadurecimento. Cada cápsula possui 3 casas contendo sementes que se assemelham a carrapatos, de superfícies lisas e coloração preta com manchas brancas (Kumar, 2017; Oliveira et al., 2007).

Ricinus communis é cultivada mundialmente em escala industrial para a produção de óleo de rícino, caracterizado pelo alto teor de ácido ricinoleico, que corresponde a aproximadamente 89% do volume do óleo (Chakraborty et al., 2020). A partir das sementes da mamona se extrai o óleo de rícino. Este representa, em média, cerca de 46 a 55% do peso de cada semente. A extração é feita por prensagem mecânica e por meio de solventes como hexano, heptano e éteres de petróleo. O óleo de mamona tem aspecto viscoso, coloração amarelada, não volátil e não secante, não comestível e possui um leve odor característico. Em relação a outros óleos vegetais, tem um bom prazo de validade e não fica rançoso a menos que seja submetido a calor excessivo (Ogunniyi, 2006).

Este óleo é utilizado para produção de biocombustíveis/biodiesel e como matéria-prima de lubrificantes, tintas, revestimentos, produtos cosméticos e para diversos fins médicos, como laxante ou para tratamento de infecções e inflamações (Worbs et al., 2011).

A Índia, China e Brasil produzem aproximadamente um milhão de toneladas de óleo de mamona anualmente para produção de biodiesel (Mutlu et al., 2010). A região Nordeste do Brasil é responsável por 85% da área plantada com a cultura no país e por mais de 78% da produção nacional de bagas (de Oliveira, 2011). O Programa Nacional de Produção e Uso de

Biodiesel (PNPB) inseriu a produção de biodiesel pela mamona, com objetivo de estimular a produção do biodiesel no país de forma sustentável, econômica e social (César et al., 2011).

Dentre os óleos vegetais, o óleo da mamona apresenta um maior destaque, devido à disponibilidade, custo-benefício, biodegradabilidade e facilidade de extração de sementes de mamona, aliado à sua boa cultura e adaptabilidade em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, estudos envolvendo diferentes aplicações desse óleo têm sido desenvolvidos. Dentro das diferentes gamas de aplicações, a conversão em polióis tem ganhado destaque, devido à quantidade de ácidos graxos encontrados em sua estrutura, especialmente o ácido ricinoleico (Gonçalves et al., 2022).

Após a extração do óleo, o subproduto mais abundante é a torta de mamona, que representa cerca de metade do peso da mamona e possui teor de proteína de 34 a 36%. Com a decorticação, o conteúdo proteico do bolo pode ser aumentado ainda mais para 60%, representando uma boa fonte de proteína para animais. Apesar disso, a torta de mamona não ganha destaque como suplemento proteico devido à sua toxicidade, causada principalmente pela proteína altamente tóxica ricina e pelo alcaloide menos tóxico ricinina (Anandan et al., 2005). A ricina é uma proteína solúvel em água e, portanto, não é encontrada no óleo de mamona, sendo assim o óleo de mamona de qualidade industrial foi considerado seguro. Vários métodos, incluindo tratamentos físico, químico e biológico, têm sido empregados para desintoxicar a torta de mamona para uso na alimentação de animais (Worbs et al., 2011), como o uso de autoclave e óxido de cálcio (Borja et al., 2007) e o uso de hidróxido de sódio e óxido de cálcio (Andrade et al., 2019). O aproveitamento econômico e ecológico da torta de mamona se faz através do seu uso como fertilizante ou adubo orgânico e como matéria-prima para a produção de aminoácidos, plásticos (principalmente os biodegradáveis) inseticidas, entre outros produtos (Severino et al., 2012).

3.1 Toxicidade de *Ricinus communis*

A mamona representa importância toxicológica para humanos e animais por conter uma mistura complexa de substâncias tóxicas, como a ricina inativadora do ribossomo tipo II, a hemaglutinina de *R. communis* e o alcaloide ricinina. Compostos como ácidos graxos, flavonoides e saponinas, também encontrados na planta, apresentam efeitos deletérios sobre bactérias, vírus, fungos, invertebrados e outros animais (Brito et al., 2019).

Todas as partes da planta possuem o princípio tóxico ricina, mas as sementes apresentam maior concentração e causam a maioria das intoxicações, tanto pela ingestão de

forma acidental ou por fome, causando graves perturbações digestivas nos animais (Riet-Correa et al., 2017). As folhas também são ricas em ricinina (Franke et al., 2019) e a ingestão de folhas e pericarpo pode provocar sinais neurológicos agudos (Bianchi et al., 2018). As intoxicações também podem ocorrer após a ingestão dos produtos processados, como da torta de mamona (Soto-Blanco et al., 2002; Brito et al., 2019).

Devido a essa toxicidade, *R. communis* é frequentemente citada pelos agricultores como causa de morte, no Brasil, principalmente de bovinos. Na região do semiárido de Pernambuco e da Paraíba, a mamona é citada como importante planta tóxica em diferentes levantamentos epidemiológicos (Riet-Correa et al., 2017).

As propriedades dos constituintes da planta e das sementes são influenciadas pela região geográfica, estação do ano, período de crescimento da planta, momento da colheita dos grãos (teor de umidade) e cultivar de *R. communis* em questão (Audi et al., 2005; Nunez et al., 2017).

3.1.1 Ricina

A ricina é uma das toxinas vegetais mais tóxicas. Purificada, a ricina é um pó branco, solúvel em água e estável em condições ambientes. O aquecimento por 10 minutos a 80 °C ou por 1 hora a 50 °C (pH 7,8) pode levar à sua inativação (Audi et al., 2005), processo importante para detoxificação dos resíduos da produção do óleo de mamona. A cadeia A da ricina também tem sido usada como antígeno de vacina para induzir anticorpos (Moshiri et al., 2016).

A ricina é uma potente toxoalbumina inativadora de ribossomos tipo 2 (RIP2), que afeta principalmente o trato alimentar. A gravidade dos efeitos depende da via de exposição, sendo a inalação mais potente que a ingestão oral (Moshiri et al., 2016).

Apenas uma única molécula da cadeia A da ricina é suficiente para inativar mais de 1.500 ribossomos por minuto e induzir a morte celular (Audi et al., 2005). O conteúdo de ricina pode ser de até 1 a 5% das sementes da mamona (Bradberry et al. 2003). Vem sendo usada como agente de guerra biológica e de assassinato devido à sua facilidade de acesso, relativa facilidade de extração e estabilidade (Moshiri, M. et al 2016).

A toxina ricina é um heterodímero, que compreende uma cadeia A e uma cadeia B, ligadas por uma única ligação dissulfureto. A cadeia A confere toxicidade celular, enquanto a cadeia B é essencial para a ligação celular. A cadeia B liga-se aos hidratos de carbono da superfície celular contendo resíduos terminais de acetil-galactosamina ou galactose. A ricina pode também ligar-se a um número limitado de linhas celulares que possuem receptores para

esse manose, por conter grande resíduos desse carboidrato em sua composição. Dentre elas, estão as células do sistema reticuloendotelial, que são particularmente suscetíveis à toxicidade da ricina (Bradberry et al., 2016).

Após fixação à membrana celular e internalização da toxina via endocitose, a maioria das moléculas de ricina são recicladas de volta à superfície celular ou degradadas nos lisossomos. Uma pequena minoria das moléculas de ricina atinge o complexo de Golgi e é transportada para o retículo endoplasmático. A proteína dissulfeto-isomerase do retículo endoplasmático separa a cadeia A da cadeia B através da quebra da ligação dissulfeto. A cadeia A se insere na membrana do retículo-endoplasmático e escapa dos proteossomos citosólicos, que podem degradá-la, liga-se ao RNA ribossômico 28S na subunidade ribossômica 60S e inibe o alongamento da proteína, inibindo a síntese proteica (Moshiri et al., 2016).

Além da inibição da síntese proteica, outros mecanismos citotóxicos da ricina foram apresentados, como desequilíbrio eletrolítico, danos às membranas celulares ou alterações em sua estrutura e função, a liberação de citocinas como mediadores da inflamação, estresse oxidativo hepático e a indução direta de apoptose (Audi et al., 2005; Nunez et al., 2017).

Embora a função endógena da ricina na da planta permaneça indefinida, especula-se que a sua citotoxicidade possa servir como uma defesa contra herbívoros ou outros organismos prejudiciais à *R. communis* (Worbs et al., 2011).

3.1.2 Ricinina

A ricinina é uma toxina pertencente ao grupo dos alcaloides piperidínicos. É encontrado em pequenas quantidades em todas as partes da planta, incluindo as folhas e o pericarpo. Nas sementes encontramos aproximadamente 0,2% do alcaloide. Esta substância transloca-se na planta dependendo da idade (Audi et al., 2005; Worbs et al., 2011).

A toxicidade da ricinina promove efeitos típicos de estimulação do Sistema Nervoso Central, provocando hiper-reatividade, convulsões clônicas acompanhadas de alterações eletroencefalográficas e subsequente morte em animais de laboratório e bovinos. Esses efeitos não estão bem determinados em humanos. A principal hipótese para o mecanismo de aparecimento dos sinais neurológicos é o aumento da liberação de glutamato e a inibição do receptor pós-sináptico do ácido γ -aminobutírico subtipo A (GABA) no cérebro, sem alterações morfológicas nos tecidos nervosos (Franke et al., 2019; Machado et al., 2022).

O diagnóstico da intoxicação por ricinina é desafiador, devido à baixa mortalidade e à ausência de lesões significativas (Machado et al., 2022). A ricinina não pode ser inativada pelo

tratamento térmico convencional devido à sua resistência a altas temperaturas (ponto de fusão de 200 °C). É estável na urina humana quando aquecida até 90 °C durante 1 h, bem como quando armazenada a 25 °C, 5 °C ou -20 °C durante três semanas (Franke et al., 2019). A mamona é a única fonte natural de ricinina e pode ser co-extraída com a ricina e detectada por cromatografia líquida ou espectrometria de massa em animais intoxicados, representando um biomarcador indireto para rastrear intoxicações causadas por *R. communis* (Darby et al., 2001; Nunez et al., 2017; Franke et al., 2019, Machado et al., 2022).

3.1.3 Aglutinina de *Ricinus communis* I

Nas sementes de *R. communis*, além da ricina, também encontramos a aglutinina de *Ricinus communis* I (RCA I ou RCA120), compreendendo duas subunidades A e B. A homologia entre RCA120 e ricina é superior a 93% entre as cadeias A e 84% entre as cadeias B (Franke et al., 2019). Embora seja altamente homóloga à ricina, ela é categorizada como uma proteína com toxicidade consideravelmente menor. Ao contrário da ricina, a RCA120 não é diretamente citotóxica, mas mostra afinidade pelos enterócitos, levando à aglutinação e hemólise (Audi et al., 2005; Severino et al., 2012). Além disto, não é significativamente absorvida pelo intestino: hemólise clinicamente significativa ocorre somente após administração intravenosa (Audi et al., 2005).

3.1.4 Compostos alérgenos

Sementes e pólen de mamona apresentam proteínas alergênicas pertencentes à classe das albuminas 2S. Os principais alérgenos de *R. communis* são denominados Ric c 1 e Ric c 3. Estes alérgenos são proteínas heterodiméricas, com duas cadeias polipeptídicas unidas por pontes de enxofre. A atividade alergênica destas albuminas 2S é resistente à desnaturação térmica e química, podendo, mesmo após alguns tratamentos de desintoxicação, desencadear alergia por contato bem como por inalação (Machado, 2013). Estes compostos estão associados à urticária, bem como à conjuntivite ou rinite (Bradberry et al., 2003; Severino et al., 2012; Franke et al., 2019).

3.2 Intoxicações em animais

A intoxicação espontânea por *R. communis* é conhecida no homem e em muitas espécies animais, incluindo caninos, aves domésticas e selvagens, suínos, equinos, ovinos, caprinos e bovinos (Marin et al., 2018).

A intoxicação nos animais pode ocorrer após ingestão acidental de partes da planta, assim como na ingestão de ração contaminada com sementes trituradas ou dos resíduos da produção de óleo de mamona (Jayalakshmi et al., 2019). Em geral, a intoxicação por *R. communis* é aguda e os sinais clínicos iniciam-se poucas horas após a ingestão de folhas, pericarpos e sementes (Machado et al., 2022).

A ingestão de folhas e pericarpo causa sinais clínicos nervosos, pela ação da ricinina, enquanto a ingestão de frutos contendo sementes causa gastroenterite grave, pela ação da ricina (Worbs et al., 2011; Albuquerque et al., 2014; Riet-Correa et al., 2017; Brito et al., 2019; Machado et al., 2022).

Em bovinos, as intoxicações espontâneas estão associadas à fome intensa e ocorreram em anos de seca prolongada. No estudo de Machado et al. (2022) sobre um surto de intoxicação em caprinos, o acesso dos animais famintos a um piquete com baixa disponibilidade de forragem e arbustos da planta tóxica foi decisivo para que ocorresse a intoxicação. Apesar disso, em caprinos e ovinos a fome intensa parece não ser a única condição que facilita a intoxicação por folhas de *R. communis*, já que em outros relatos esses animais consumiram a planta mesmo com pasto suficiente, não superlotados e com abastecimento adequado de água, sal mineral e ração comercial (Bianchi et al., 2018; Brito et al., 2019). A presença de folhas murchas no pasto após a poda da planta pode ser um fator que facilita a ingestão e consequente intoxicação. As folhas murchas podem concentrar mais toxinas e podem ser mais palatáveis para os ruminantes. Em caprinos, a intoxicação pela planta não é comum, já que a ingestão de folhas parece ser um evento raro, mas facilitado por resíduos de poda (Brito et al., 2019). Em equinos e caninos a intoxicação ocorre mais frequentemente pela ingestão acidental de torta de mamona ou de adubos contendo resíduos da produção de óleo de mamona (Montão et al., 2018; Hong et al., 2011).

A maioria das sementes consumidas podem passar intacta pelo sistema digestivo, mas a mastigação e a ruminação podem aumentar significativamente a liberação de ricina das sementes, aumentando a morbidade e a mortalidade dessa intoxicação. A dose letal de sementes pode variar de acordo com a idade e sensibilidade do animal, mesmo entre animais da mesma espécie (Aslani et al., 2007; Albuquerque et al., 2014).

Os cavalos são os mais suscetíveis à intoxicação por sementes de mamona (Montão et al., 2018). Os ovinos, bovinos e suínos são intermediários, enquanto as aves são as mais resistentes (Aslani et al., 2007). A dose oral letal de sementes de mamona em cavalos é de 0,1g/kg, para cabras 5,5 g/kg e galinhas 14 g/kg (Montão et al., 2018; Jayalakshmi et al., 2019). A dose de intoxicação de sementes trituradas é de 2 g/kg para bovinos adultos e 0,5 g/kg para bezerros, enquanto doses de 10g/kg de folhas frescas de *R. communis* causam quadro clínico grave e a dose letal de folhas para bovinos adultos é de 20 g/kg (Albuquerque et al., 2014; Brito et al., 2019). Para ovinos, 2,5 g/kg de sementes de mamona são letais e a dose letal de folhas frescas é de 30g/kg (Aslani et al., 2007). Em caprinos, doses de folhas em até 40g/kg causaram apenas sinais clínicos leves e a dose letal de folhas frescas não está estabelecida (Brito et al., 2019; Machado et al., 2022).

Os achados clínicos e patológicos associados à intoxicação por *R. communis* dependem da quantidade de planta consumida e da suscetibilidade da espécie animal envolvida. Da mesma forma, a gravidade das lesões em múltiplos órgãos é dependente da dose. A intoxicação experimental com sementes de *R. communis* por inoculação oral ou intragástrica foi descrita em bovinos, mas descrições detalhadas da patologia desta intoxicação nesta espécie são escassas (Marin et al., 2018).

3.2.1 Intoxicação em animais por ingestão de sementes e torta de mamona

No estudo realizado por Armién et al. em 1996 sobre a intoxicação experimental por sementes de mamona em ovinos, os sinais clínicos mais notáveis incluíram falta de apetite, apatia, cólicas e diarreia, com fezes malcheirosas que variavam de pastosas a líquidas, apresentando muco e/ou fibrina. Observou-se um aumento progressivo da taquicardia e os sinais de desidratação foram evidentes, manifestando-se como pele seca, perda de elasticidade e retração do globo ocular. Na fase final da intoxicação, os animais exibiam uma fraqueza muscular significativa. Durante a necropsia, os principais achados incluíram congestão e inchaço da parede do trato digestivo, desde o abomaso até o cólon proximal. O jejuno estava dilatado e continha uma grande quantidade de líquido verde-claro, com fibrina presente na forma de cilindros, filamentos ou pseudomembranas. O conteúdo do ceco e do cólon proximal apresentava características semelhantes. Nos ovinos que ingeriram as sementes inteiras de *R. communis*, algumas foram encontradas no rúmen. As principais alterações histológicas observadas no intestino delgado incluíam necrose na parte superior da mucosa, acompanhada de congestão nas camadas mucosa, submucosa e serosa.

Em cães intoxicados por adubo orgânico contendo torta de mamona, os principais sinais clínicos encontrados foram vômitos, dor abdominal, calafrios, febre, além de diarreia com sangue e forte odor (Soto-Blanco et al., 2002; Hong et al., 2011). A hematologia revelou hematócrito muito elevado pela desidratação grave e hipotensão, o perfil bioquímico sérico mostrou alta atividade de AST e ALT e altas concentrações séricas de creatinina (Hong et al., 2011).

Na necropsia destes cães, encontra-se congestão e hemorragia acentuadamente graves nas camadas mucosa e subserosa do trato gastrointestinal e mesentério com ascite hemorrágica. O fígado estava discretamente pálido e com algumas petéquias (Hong et al., 2011).

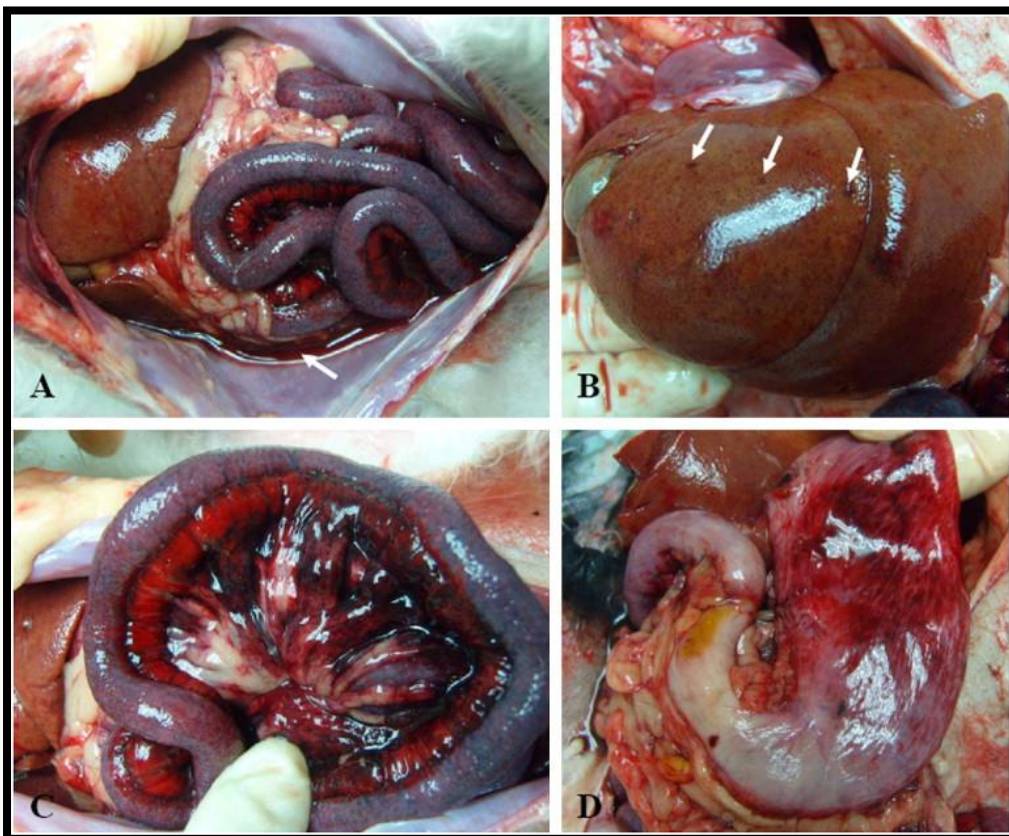


Figura 1: Achados patológicos de cães intoxicados por torta de mamona (Hong et al., 2011):

- A. Ascite hemorrágica (seta) com intestinos inchados.
- B. O fígado está um pouco pálido com algumas petéquias (seta).
- C. e D. Congestão e hemorragia marcadamente graves dos tratos gastrointestinais e mesentério.

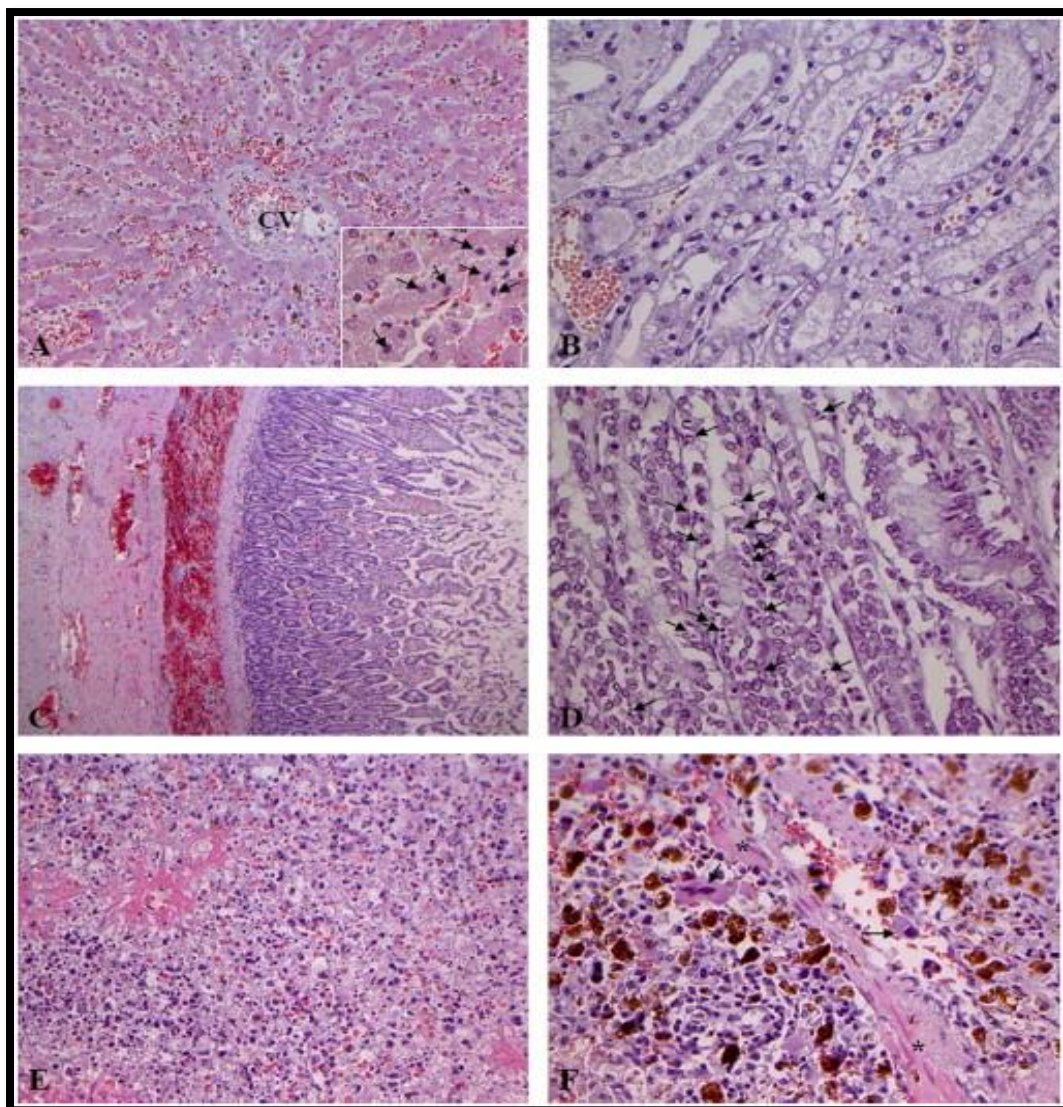


Figura 2: Histopatológico de cães intoxicados pela ingestão de torta de mamona (Hong et al., 2011)

A. Os sinusoides do fígado mostram uma grande dilatação com congestão e infiltração de numerosos macrófagos fagocitadores de hemossiderina. Há degeneração hepatocelular tóxica e necrose com vários núcleos picnóticos (seta no detalhe).

B. Os epitélios tubulares renais mostram necrose e degeneração vacuolar.

C. Congestão acentuada é observada nas camadas submucosa e muscular mais do que na mucosa nos tratos intestinais. Numerosas células epiteliais necróticas são descamadas.

D. Há várias células epiteliais intestinais degeneradas com núcleos cariorréticos (seta).

E. Numerosos núcleos cariorréticos e kariopícnóticos de linfócitos presentes em todos os linfonodos devido à morte celular.

F. Há inúmeras infiltrações de células carregadas de hemossiderina. Megacariócitos (seta) presentes ocasionalmente no baço. H&E. Ampliação original: ×50 (C), ×200 (A), ×400 (inserção de A, B, D–F).

No relato de Montão et al. (2018), equinos foram intoxicados após ingestão acidental de torta de mamona. Todos os animais que ingeriram a torta de mamona apresentaram sinais de intoxicação cerca de 21 horas depois. Os animais começaram a apresentar sinais de cólica abdominal, abdômen distendido, fraqueza, inapetência, depressão, desidratação, anúria, tenesmo e polidipsia, evoluindo para decúbito e óbito em 75% dos animais cometidos. A evolução clínica até o óbito variou de 2 a 4,5 horas e 25% dos animais recuperaram-se em 5 dias.

As principais lesões apresentadas na necropsia destes animais foram encontradas no jejuno e no íleo. A mucosa desses segmentos intestinais estava avermelhada e coberta por material fibroso amarelado. Uma grande quantidade de líquido com sangue foi encontrada no lúmen do intestino delgado e caroços escuros semelhantes a sementes de mamona esmagadas foram encontrados no lúmen do estômago. Outras lesões incluíram erosão na região fúndica do estômago, congestão e hemorragia no córtex adrenal e áreas pálidas no córtex dos rins (Montão et al., 2018).

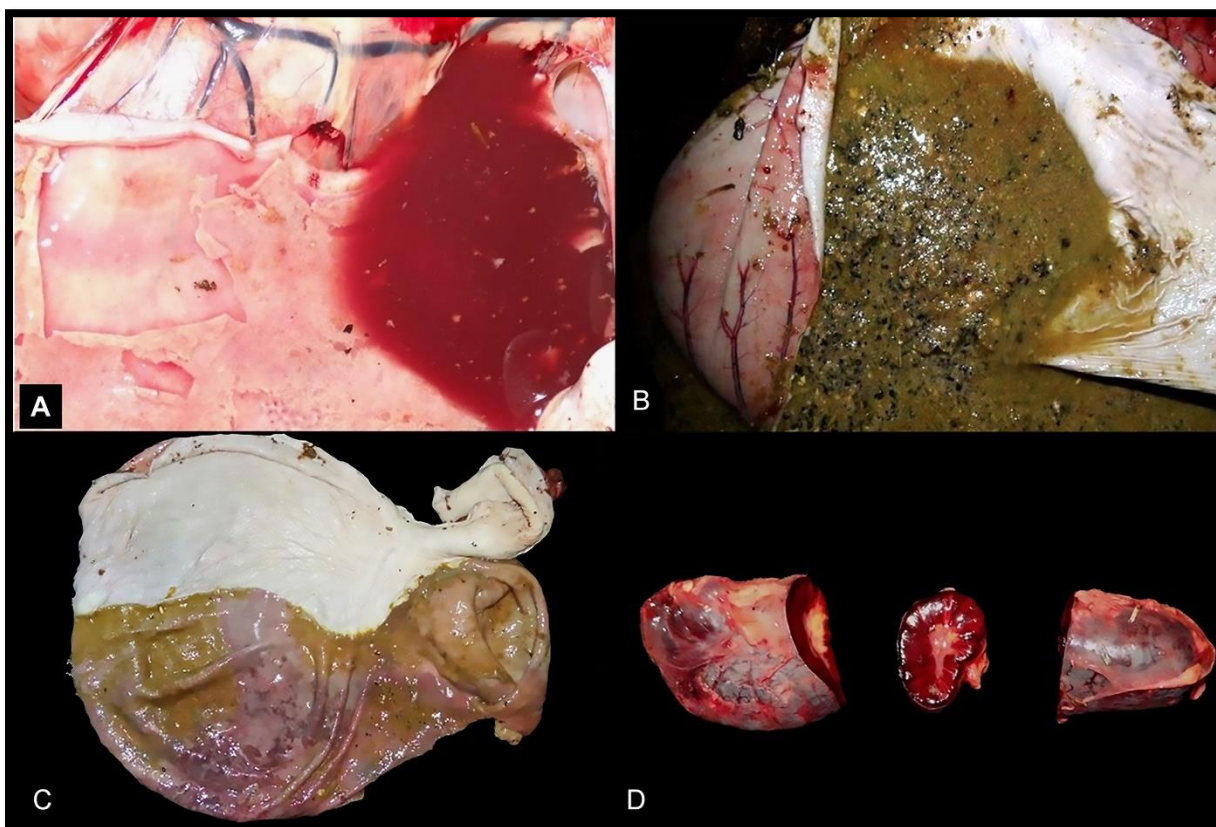


Figura 3: Achados patológicos de cavalos intoxicados por torta de mamona (Montão et al., 2018)

- A. Membranas mucosas do intestino delgado apresentando vermelhidão e cobertas com material fibroso e conteúdo líquido sanguinolento
- B. Conteúdo estomacal contendo restos de sementes de *R. communis*.
- C. Hemorragia na região fúndica do estômago.
- D. Hemorragia no córtex adrenal.

As lesões encontradas na histopatologia destes equinos são semelhantes às observadas em outras espécies intoxicadas, como caninos, bovinos e ovinos, com exceção das lesões encontradas no epitélio tubular renal, uma vez que foi observada congestão nos cavalos, sem degeneração e necrose tubular (Montão et al., 2018).

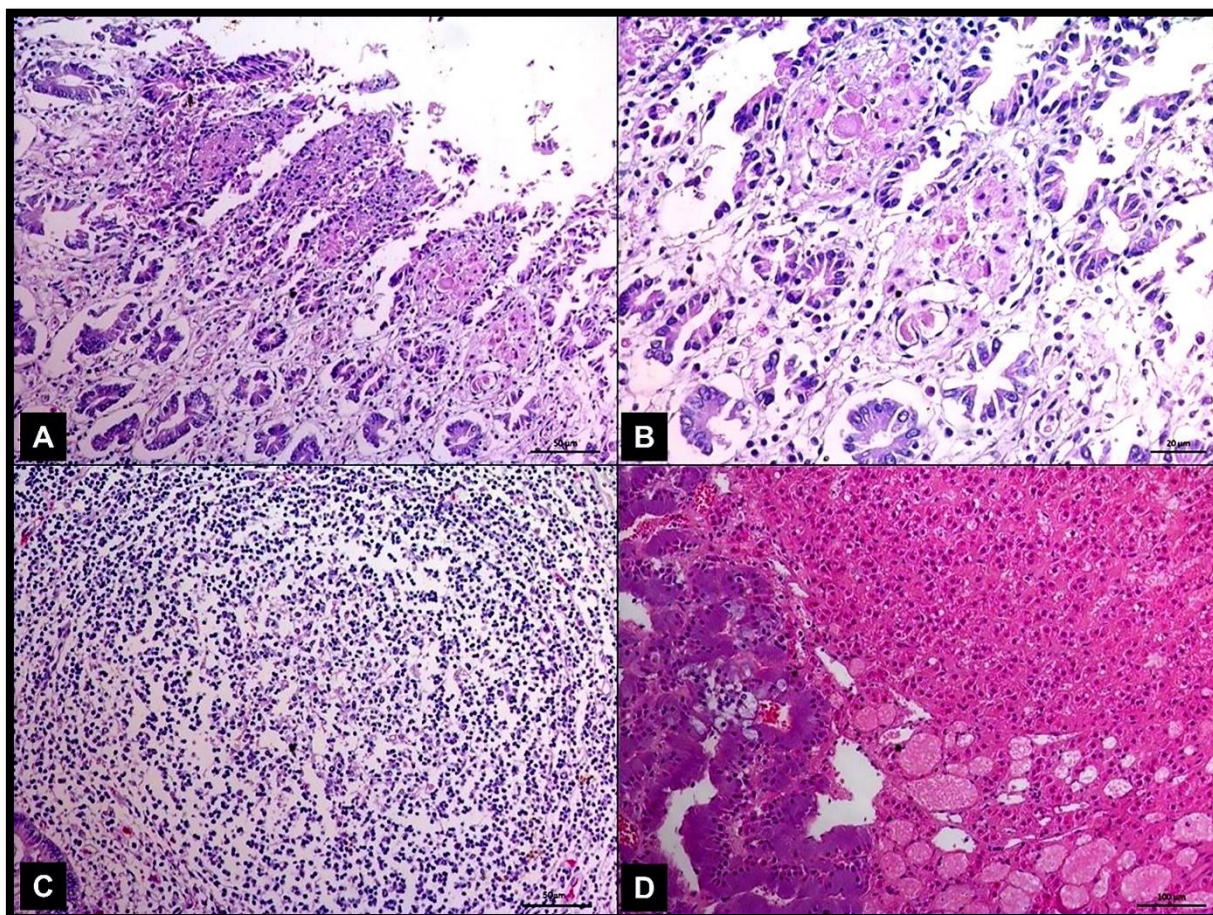


Figura 4: Histopatológico da intoxicação acidental por torta de mamona em equinos (Montão et al., 2018)

- A. Jejunum com necrose e desnudação parcial das vilosidades e deposição de material fibroso eosinofílico na lâmina própria. HE, barra = 50µm.
- B. Jejunum com enterócitos necróticos das vilosidades caracterizados por aumento da eosinofilia citoplasmática e núcleos picnóticos (note contraste com enterócitos sem alterações nas criptas); na lâmina própria das vilosidades há trombos nos capilares e células-tronco mesenquimais com núcleos picnóticos intercalados com material fibroso eosinofílico (necrose das vilosidades). HE, barra = 20µm.
- C. Íleo com discreta rarefação centro-folicular e pequeno número de linfócitos com núcleos picnóticos. HE, barra = 50µm.
- D. Córtex adrenal com camada fasciculada e reticulada, congestão, necrose e hemorragia difusa acentuada. HE, barra = 100µm.

O estudo de Wooldridge (1918) relatou intoxicação em equinos pela ingestão de sementes de *R. communis*. Entre 19 cavalos que receberam uma dieta composta por aveia e feno com sementes de mamona, 16 deles adoeceram, o que representa 84,21%, e três (18,75%) vieram a falecer. Por sua vez, White (1918) documentou casos em equinos de duas propriedades pertencentes ao mesmo dono, onde os cavalos alimentados com uma mistura de milho e sementes de mamona apresentaram uma taxa de morbidade de 100% e uma letalidade de 16,66%. Os primeiros sintomas clínicos surgiram entre 6 e 30 horas após a ingestão das sementes. A progressão da doença até a morte foi de aproximadamente dois dias, segundo Wooldridge, enquanto White observou um tempo de cerca de 24 horas.

Nestes estudos, o sinal clínico mais comum observado foi cólica abdominal e inapetência, seguida de emagrecimento progressivo. Alguns cavalos apresentaram diarreia, eliminando fezes líquidas que, em outros momentos, tinham aparência normal. Já outros cavalos excretaram fezes variando de normais a fezes duras e espessas, cobertas de muco. Em nenhum momento foi observada a presença de sangue nas fezes. As mucosas desses equinos estavam pálidas, com pulso variável, geralmente fraco e quase imperceptível, arritmico e, em alguns casos, intermitente. A maioria dos cavalos tinha um coração agitado, com os batimentos sendo facilmente percebidos na parede do tórax e respiração rápida e superficial, podendo evoluir para decúbito e morte. Os animais que se recuperaram da sintomatologia gastrointestinal, apresentaram agitação e sintomas musculares, como espasmos tetânicos. O coração continuava agitado, e nos casos mais graves, havia tremores visíveis em todo o corpo. Muitos cavalos tinham dificuldade para se mover, com as pernas rígidas e uma postura peculiar, enquanto a maioria mantinha as caudas elevadas e trêmulas. Todos enfrentaram dificuldades para engolir devido ao espasmo dos músculos da garganta, e alguns apresentaram envolvimento dos músculos da mandíbula, com um caso de trismo acentuado que durou cerca de dois dias, até que os músculos começaram a relaxar.

Na necrópsia desses animais, encontraram peritônio aparentemente normal a afetado nos casos de intoxicação mais grave (peritonite), podendo ocorrer congestão e áreas de hemorragias no mesentério. Os estômagos apresentaram gastrite envolvendo a metade pilórica e inflamação estendendo-se até o intestino delgado. A mucosa estava intensamente inflamada, mas não foi observado úlceras na maioria dos animais necropsiados. O conteúdo do cólon era muito líquido, mas sem sinais de alterações inflamatórias na mucosa do cólon de alguns animais, enquanto em casos mais graves de intoxicação, todo o intestino delgado e o intestino grosso até a flexura diafragmática do cólon maior estavam inflamados, a parede do intestino delgado apresentando inchaço e espessamento e a mucosa intensamente congestionada e de

coloração avermelhada. O jejuno foi mais afetado do que o duodeno e o intestino grosso estavam edemaciados e inchados. O ceco e a primeira parte do cólon maior estavam inflamados e com sangramento. O restante do cólon apresentava uma coloração acinzentada. O cólon pequeno continha um pouco de exsudato com manchas de sangue. O ceco e a primeira parte do cólon maior, incluindo a flexura diafragmática, continham um líquido levemente tingido de sangue. Na segunda parte do cólon, o conteúdo era mais firme, enquanto no cólon e reto as fezes eram pequenas e firmes.

Os rins e o baço estavam normais. O fígado apresentou congestão venosa e os pulmões estavam ligeiramente congestionados, contendo pequena quantidade de espuma na traqueia e nos brônquios. O saco pericárdico continha uma quantidade de líquido claro e os ventrículos estavam vazios, mas as aurículas estavam distendidas. O músculo cardíaco estava mais pálido que o normal. Cascas de sementes de mamona foram encontradas no conteúdo do trato alimentar.

3.2.2 Intoxicação em animais pela ingestão de folhas

No estudo realizado por Tokarnia et al. em 1975, foram conduzidos experimentos utilizando folhas verdes recém-colhidas de talos esbranquiçados e arroxeados, além de folhas dessecadas de *Ricinus communis*., provenientes do Estado do Rio de Janeiro. Essas folhas foram administradas por via oral a 25 bovinos jovens desmamados, com variações nas quantidades e nas épocas do ano. Adicionalmente, no Estado do Ceará, foram realizados experimentos com 12 bovinos, utilizando folhas verdes recém-colhidas e folhas murchas aquecidas, que foram deixadas expostas ao sol por uma hora. Os resultados mostraram que não havia diferença na toxicidade entre as folhas de talos esbranquiçados e arroxeados de *R. communis*, nem entre as folhas do Rio de Janeiro e do Ceará, tampouco entre as folhas murchas quentes e as verdes recém-colhidas. A administração de 20 g/kg das folhas resultou na morte de 8 dos 12 bovinos; por outro lado, doses entre 10 e 12,9 g/kg, dadas a 11 bovinos, resultaram na morte de apenas um animal, que ingeriu 10 g/kg. A planta não apresentou efeito cumulativo, mas indicou um leve desenvolvimento de tolerância à ingestão. As folhas dessecadas, coletadas até 19 semanas antes da administração e armazenadas em temperatura ambiente, perderam cerca de 50% de sua toxicidade. Os principais sintomas de intoxicação nos bovinos expostos às folhas de mamona, em todos os experimentos, foram neuromusculares, incluindo desequilíbrio ao caminhar, necessidade de se deitar após breves caminhadas, dificuldades ao se deitar, tremores musculares, produção excessiva de saliva, movimentos de mastigação sem

objetivo e eructação excessiva, além de recuperação ou morte rápidas. Os primeiros sinais surgiram entre 3 a 6 horas após a ingestão. Nos casos em que os bovinos sobreviveram, os sintomas persistiram por 2 a 10 horas, com um tempo máximo de 13 horas entre a ingestão da planta e a recuperação. Nos casos fatais, os sintomas de intoxicação duraram entre 2 a 15 horas; o intervalo entre a ingestão e a morte variou de 5 a 20 horas. As análises histopatológicas nos 11 bovinos que vieram a óbito apresentaram desde leve até acentuada degeneração hidrópico-vacuolar no fígado.

Em caprinos intoxicados pela ingestão de folhas de mamona observa-se quadro clínico neurológico agudo, caracterizado pela diminuição da atividade locomotora, grave ataxia, depressão, incoordenação, marcha cambaleante. Também manifestam desidratação, congestão dos vasos episclerais, taquicardia, dispneia, sialorreia, depressão, movimentos mastigatórios constantes, desvio lateral de cabeça e pescoço (Brito et al., 2019).

As alterações hematológicas também foram discretas e consistiram em hemoconcentração, valores ligeiramente aumentados de proteína plasmática total e leucocitose com neutrofilia. Não foram identificadas alterações no fibrinogênio plasmático ou nos níveis séricos de ureia, creatinina ou bilirrubina e nas atividades séricas de aspartato aminotransferase (AST), creatinofosfoquinase (CPK), gama- glutamiltransferase (GGT) (Brito et al., 2019).

Macroscopicamente, as lesões são inespecíficas e consistem em áreas focais de edema pulmonar, hemorragias petequiais epicárdicas e aumento do volume e congestão do fígado. A região cortical dos rins apresenta coloração variando de pálida a amarelado. O conteúdo do rúmen, retículo e omaso estava seco e continha folhas da planta. Histologicamente, havia vacuolização citoplasmática e necrose de hepatócitos. No SNC houve principalmente congestão dos vasos sanguíneos das leptomeninges (Brito et al., 2019).



Figura 5: Sinais clínicos em caprinos intoxicados pela ingestão de folhas de mamona (Brito et al., 2019):

A e B. Desidratação, congestão dos vasos episclerais, taquicardia, dispneia, diminuição da atividade locomotora livre até ataxia grave (quando em pé os caprinos permaneceram com os membros cruzados);

C e D. Sialorreia, depressão, movimentos constantes de mastigação, desvio lateral da cabeça e pescoço, incoordenação, andar cambaleante, posturas anormais e distensão abdominal leve.

3.2.3 Intoxicação em ruminantes por ingestão de folhas, pericarpos e sementes

Os sinais clínicos em bovinos que consumiram folhas, pericarpos e sementes de mamona desenvolvem-se em 6-24 horas após ingestão e incluem diarreia aquosa profusa evoluindo para diarreia com sangue, fraqueza, apatia, dor abdominal, marcha trêmula e instável, câibras, sialorreia, desidratação, hipotermia, estase ruminal e decúbito. Em casos

menos frequentes tem-se congestão da conjuntiva, aumento da frequência cardíaca (130 batimentos/min), dispneia, estertores, convulsões, leves tremores musculares, incoordenação com movimentos pendulares da cabeça, vocalização, decúbito lateral, coma e morte em 48-72 horas. A duração destes sinais varia de 1,5 a 5,5 dias nos animais que se recuperam (Albuquerque et al., 2014).

As alterações hematológicas destes bovinos foram discretas e consistem em anemia normocítica normocrômica, leucocitose com neutrofilia e valores ligeiramente aumentados de proteína plasmática total. Nenhuma alteração foi observada no fibrinogênio plasmático, nos níveis séricos de ureia, creatinina ou bilirrubina e nas atividades séricas de CPK, AST e GGT (Albuquerque et al., 2014).

À necropsia, os achados incluem hemopericárdio, hemotórax, edema pulmonar, petéquias ou hemorragia no epicárdio e endocárdio, equimoses nos músculos papilares e sufusões nos músculos intercostais. Na cavidade abdominal também é possível observar hemorragias em serosas abdominais, baço, pré-estômagos, mucosa do abomaso, intestino delgado e intestino grosso e edema difuso da mucosa ruminal. Conteúdo ruminal mais fluido e com grande quantidade de sementes e outras partes vegetais de *R. communis*. Parênquima hepático contendo áreas circulares, esbranquiçadas e distribuídas focalmente (Albuquerque et al., 2014).

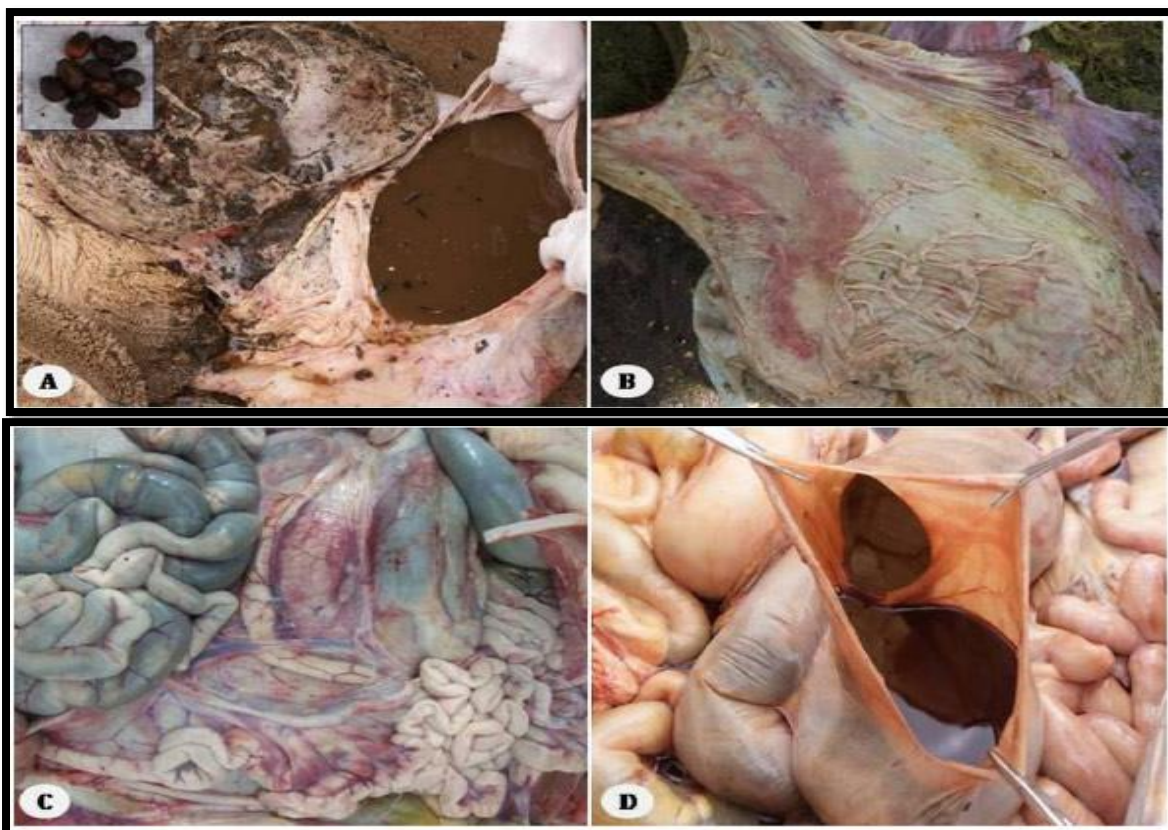


Figura 6: Achados patológicos de bovinos intoxicados pela ingestão de sementes, folhas e pericarpos de mamona (Albuquerque et al., 2014):

- A. O conteúdo do rúmen, retículo e omaso estava seco e continha sementes da planta.
- B. O conteúdo do abomaso era extremamente fluido, e sua mucosa estava vermelha com pregas inchadas.
- C. Hemorragias estavam presentes no mesentério e serosa do abomaso e intestinos delgados e grosso.

As principais lesões microscópicas são edema e infiltrado de células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares em abomaso, mucosa e submucosa do intestino delgado, hemorragia entre as fibras musculares cardíacas, necrose coagulativa multifocal com infiltrado de células mononucleares no miocárdio e núcleos picnóticos e cariorréticos no endotélio do sistema nervoso central, hepático, capilares ruminais, intestinais, glomerulares e alveolares e em células linfoides de diversos órgãos (Albuquerque et al., 2014).

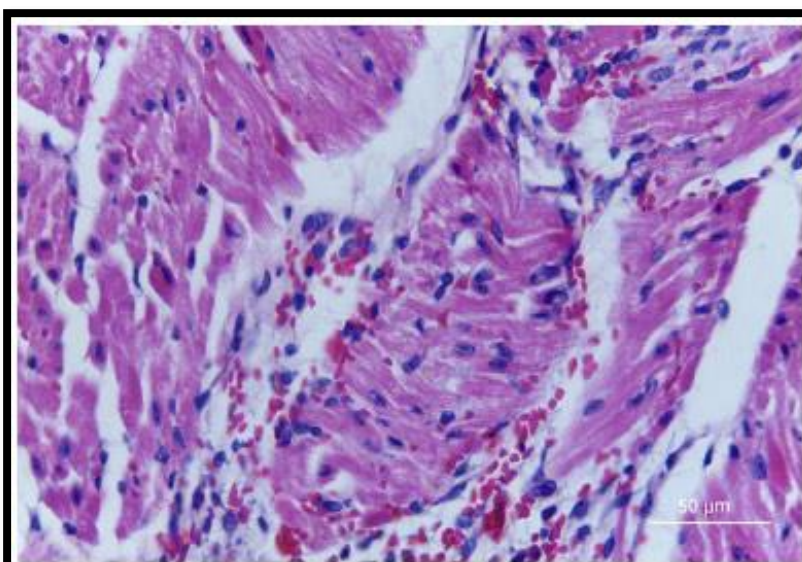


Figura 7: Histopatológico de bovinos intoxicados pela ingestão de sementes, folhas e pericarpos de mamona (Albuquerque et al., 2014): Miocárdio com necrose coagulativa multifocal com infiltração mononuclear de células e diferentes graus de hemorragia entre as fibras musculares cardíacas

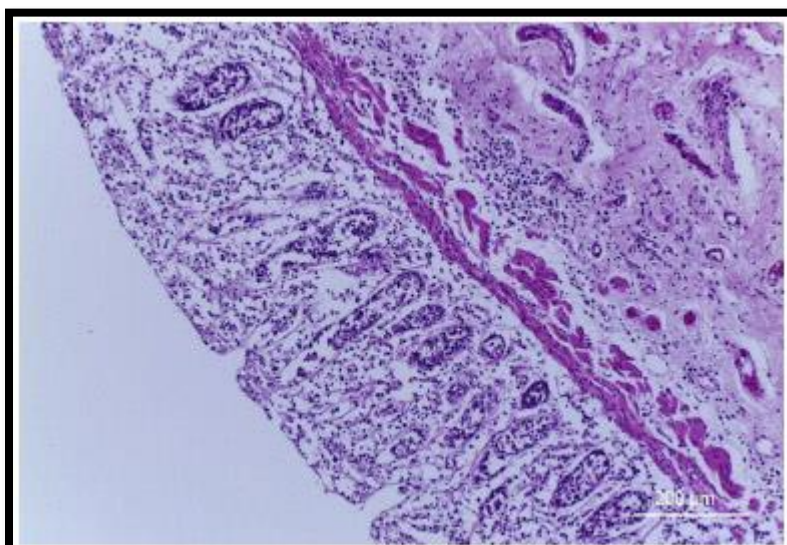


Figura 8: Histopatológico de bovinos intoxicados por sementes, folhas e pericarpos de mamona (Albuquerque et al., 2014): Abomasos e a mucosa do intestino delgado com infiltração inflamatória leve de células mononucleares e polimorfonucleares e edema submucoso

Em ovinos intoxicados por diferentes partes vegetativas de *R. communis*, os sinais clínicos incluíram fraqueza, salivação, diarreia aquosa profusa, desidratação, midríase, ranger de dentes, hipotermia e decúbito. Os achados hematológicos e bioquímicos mais significativos

foram hematócritos elevados, alta concentração sérica de ureia nitrogenada, creatinina e fósforo e alta atividade sérica de creatina quinase e AST. O aumento sérico de creatina-quinase pode estar relacionado às lesões cardíacas (Aslani et al., 2007).

À necropsia destes ovinos, observam-se extensa hiperemia de submucosa e hemorragia no abomaso e em todas as partes dos intestinos delgado e grosso (gastroenterite grave), infartos triangulares na mucosa do abomaso, enterite fibrinosa e o descolamento do epitélio do íleo, omasos impactados, hemorragias no epicárdio e no endocárdio.



Figura 9: Achados de necrópsia de ovino intoxicado pela ingestão de sementes, folhas e pericarpos de mamona (Aslani et al., 2007): Hiperemia submucosa e hemorragia com infarto triangular (área amarela) no abomaso de uma ovelha intoxicada por mamona.



Figura 10: Achados de necrópsia de ovino intoxicado pela ingestão de sementes, folhas e pericarpos de mamona (Aslani et al., 2007): Diferentes graus de hemorragia subepicárdica.

Os achados histopatológicos são degeneração e necrose hepatocelular, necrose centro lobular e congestão, necrose coagulativa e hemorragia em abomaso associadas a infiltração de células inflamatórias mononucleares, enterite ulcerativa e fibrinosa nos intestinos. Hemorragia subepicárdica e subendocárdica e congestão, hemorragia e necrose do miocárdio. Necrose

tubular, hiperemia e hemorragia na região medular dos rins e congestão pulmonar (Aslani et al., 2007).

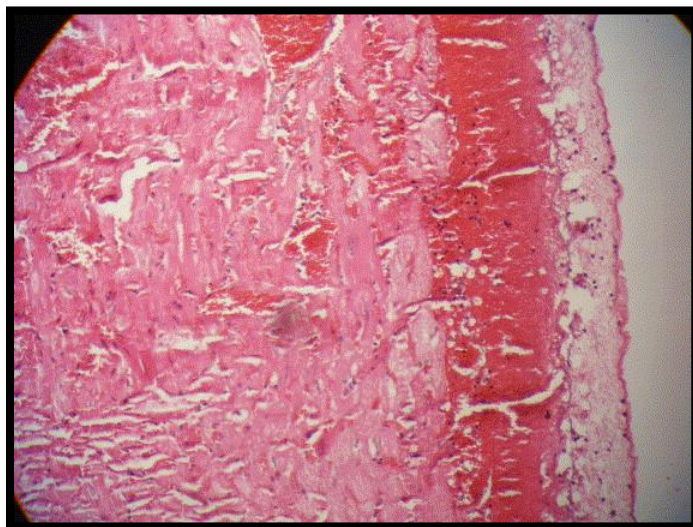


Figura 11: Histopatológico de ovino intoxicado pela ingestão de sementes, folhas e pericarpos de mamona (Aslani et al., 2007): Hemorragia subepicárdica e miocárdica extensa, e degeneração e necrose do miocárdio. Hematoxilina e eosina 320×.

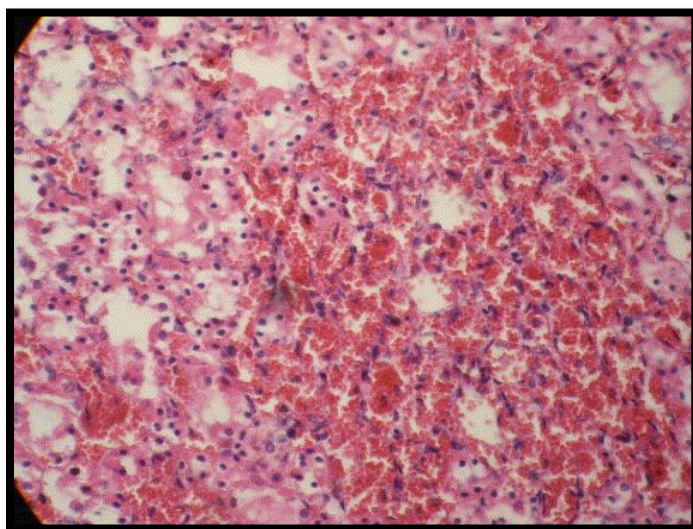


Figura 12: Histopatológico de ovino intoxicado por sementes, folhas e pericarpos de mamona (Aslani et al., 2007): Hemorragia, hiperemia e necrose tubular em secção renal de uma ovelha intoxicada por mamona. Hematoxilina e eosina 640×.

O líquido ruminal de bovinos e ovinos recuperados da intoxicação por ingestão de sementes e folhas de mamona não apresentou alterações de aparência. Foi relatada acidose ruminal, diminuição da atividade do azul de metileno e diminuição da densidade e motilidade da microfauna ruminal (Aslani et al., 2007; Albuquerque et al., 2014).

Em caprinos intoxicados concomitantemente por folhas, caules e sementes de *R. communis*, os principais sinais clínicos observados consistem em gastroenterite, incoordenação, andar em círculos, ataxia, depressão, vocalização, inchaço, decúbito esternal e morte (Machado et al., 2022).

Os achados macroscópicos revelam mucosas do estômago anterior e do intestino delgado difusamente vermelhas. Folhas parcialmente digeridas, caules e sementes também

foram observadas no conteúdo ruminal. No fígado observou-se padrão lobular aumentado, além de congestão pulmonar e edema moderado. Os achados microscópicos incluem vacuolização citoplasmática e necrose de hepatócitos; glóbulos eosinofílicos no citoplasma dos hepatócitos, no espaço de Disse e sinusóides; tumefação de hepatócitos com edema mitocondrial e degeneração; inchaço epitelial, necrose e infiltrado neutrofílico na mucosa dos estômagos anteriores; congestão e edema da submucosa no abomaso e duodeno; depleção de glicogênio e ribossomos do retículo endoplasmático rugoso; agregação da cromatina nuclear e auto-fagossomos; edema alveolar e congestão (Machado et al., 2022).



Figura 13: Envenenamento espontâneo por *Ricinus communis* em cabras (Machado et al., 2022)

- A. Evidência do consumo com o caule lenhoso exposto devido ao consumo do córtex. Detalhe: Planta intacta para comparação.
- B. Rúmen: Folhas de *Ricinus communis* no conteúdo ruminal.
- C. Fígado: Padrão lobular difuso realçado.
- D. Rúmen: Inchaço e necrose de células epiteliais e infiltrado neutrofílico leve. H&E, objetiva 40×.

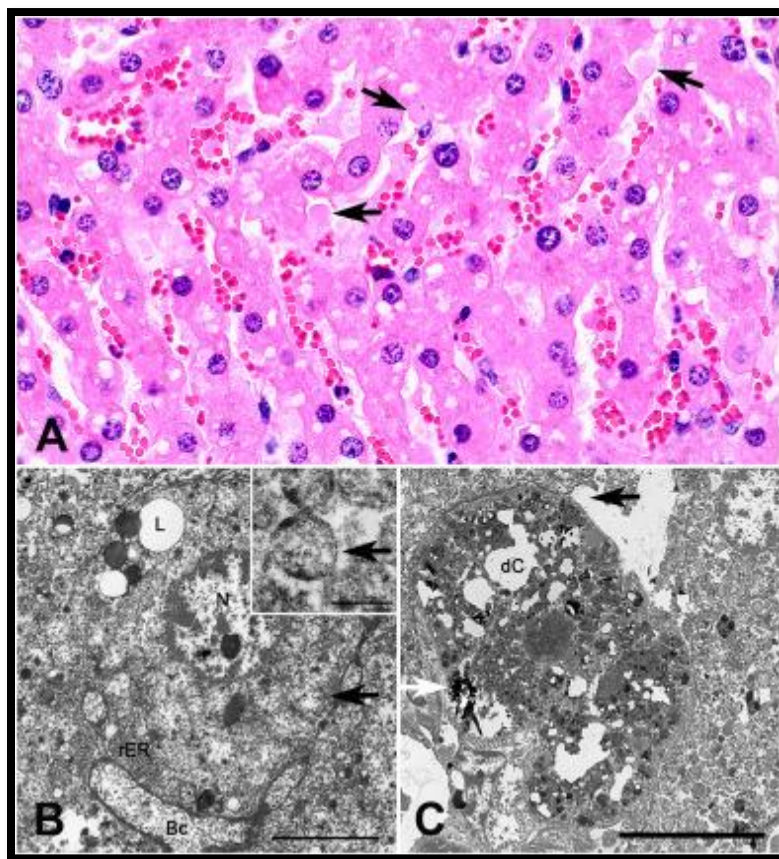


Figura 14: Histopatológico- fígado de caprinos intoxicados pela ingestão de sementes, folhas e pericarpos de mamona (Machado et al., 2022):

- A. Vacuolização hepatocelular difusa e glóbulos eosinofílicos (setas) no espaço de Disse, sinusoides em expansão . H&E, objetiva 40×.
- B. Hepatócito inchado com depleção do glicogênio e mitocôndrias inchadas (seta preta).
- rER = retículo endoplasmático rugoso
 - L = gotículas lipídicas
 - N = núcleo
 - Bc = canalículo biliar. Barra = 5 µm.

Detalhe: mitocôndrias inchadas com cristalização e matriz granular cinza a elétron-densa (seta preta). Microscopia Eletrônica de Transmissão . Barra = 1 µm.

- C. Hepatócitos necróticos com mineralização focal (seta branca), destacando-se do cordão hepático (seta preta), cisterna distendida (dC). Microscopia Eletrônica de Transmissão. Barra = 10 µm.

3.3 Diagnóstico da intoxicação em animais

O diagnóstico de intoxicação por *Ricinus communis* é baseado nos sinais clínicos, achados da necropsia, achados histológicos, histórico de consumo da planta e dados epidemiológicos. Raramente esse diagnóstico é baseado na confirmação por meio de testes toxicológicos. Assim, muitos casos de intoxicação por mamona podem deixar de ser diagnosticados, permanecendo não identificados (Mouser et al., 2007; Worbs et al., 2011; Albuquerque et al., 2014; Machado et al., 2022).

A detecção de ricina no sangue ou fluidos corporais pelo radioimunoensaio e ensaio imunoenzimático (ELISA) já foi descrita. Porém, estes testes não são adequados para testar conteúdos gastrointestinais, além da ricina ser rapidamente transformada antes da excreção, podendo passar despercebida em amostras, como sangue ou urina. O desenvolvimento de um método para detectar um biomarcador de exposição à mamona, a ricinina, permite a detecção rápida, altamente específica e sensível desse alcaloide, já que a mamona é a única fonte natural de ricinina. Sendo assim, a detecção de ricinina por cromatografia líquida em animais intoxicados tem sido considerada um marcador indireto para o diagnóstico de intoxicação por ricina (Johnson et al., 2005; Mouser et al., 2007; Machado et al., 2022).

A detecção de ricinina em amostras biológicas coletadas de casos suspeitos de intoxicação confirma a exposição a qualquer parte da mamona (Darby et al., 2001; Johnson et al., 2005; Machado et al., 2022). A detecção de ricinina por cromatografia líquida já é utilizado em análises toxicológicas de material humano, porém o seu uso no diagnóstico veterinário ainda é pouco utilizado.

A cromatografia é uma técnica científica que foi documentada há pouco mais de cem anos e se baseia na movimentação de componentes de uma mistura entre duas fases: a fase estacionária, que retém os elementos, e a fase móvel, que transporta a mistura. Essa técnica pode ser utilizada para purificar substâncias, detectar compostos ou ajudar na separação de elementos indesejados. As principais categorias de técnicas cromatográficas incluem cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência e, mais recentemente, a cromatografia líquida de ultra-eficiência (Maldaner e Jardim, 2009). Esses métodos podem ser aplicados isoladamente ou em combinação, dependendo dos componentes que precisam ser separados ou identificados.

A cromatografia tem sido desenvolvida e aplicada em várias áreas da ciência, como a farmacêutica e a médica. Graças à sua alta precisão e confiabilidade, a cromatografia é amplamente empregada na detecção ou separação de substâncias presentes em pequenas quantidades em misturas. Na medicina, por exemplo, é muito utilizada na toxicologia, tanto para monitorar o uso de medicamentos quanto na ciência forense, ajudando a quantificar drogas ilícitas e a resolver crimes. Na medicina veterinária, as técnicas cromatográficas também são valiosas para diagnosticar doenças e estudar a farmacocinética, com um foco especial na toxicologia. O estudo toxicológico envolve a identificação de substâncias, seja após uma intoxicação ou em pesquisas experimentais, garantindo que a dosagem do princípio ativo esteja correta. Além disso, um aspecto importante do uso da cromatografia na medicina veterinária é a detecção de resíduos de medicamentos em produtos de origem animal, já que esses resíduos podem ser prejudiciais ao consumidor e comprometer a credibilidade da cadeia produtiva (Lanças, 2023).

A CLAE é um método adequado para separação de espécies iônicas e macromoléculas, que utiliza alta pressão para empurrar a amostra e solventes que dissolvem a amostra sem que qualquer interação química ocorra entre ambas (fase móvel), através de uma coluna confeccionada de material inerte (fase estacionária). Requer a utilização de equipamentos específicos, com o uso de bombas, colunas que suportam altas pressões necessárias para eluição da fase móvel, detector e registrador. Vários detectores, como UV e fluorescência, podem ser usados com CLAE, permitindo a detecção de uma ampla gama de analitos. É especialmente

útil para análise de pesticidas, micotoxinas e medicamentos veterinários em amostras de alimentos (Sundarraaj et al., 2024).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica que se destaca por sua simplicidade, rapidez e custo acessível, sendo a escolha predominante para o monitoramento de reações orgânicas. É um tipo de cromatografia de adsorção que utiliza uma fase estacionária (sílica gel ou alumina) e uma fase móvel (tipicamente constituída por um solvente). A separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária e fase móvel, que resulta em diferentes velocidades de migração e tempo de retenção. O material da amostra é aplicado a esta fase estacionária com propriedades adsorventes. O material a ser processado na CCD é dissolvido em um solvente volátil. Em seguida, a solução é aplicada a 0,5 cm da base inferior da placa usando um tubo capilar com uma extremidade cortada. Após a execução do material na placa, a placa deve ser seca e os reveladores devem ser usados para ler o resultado (Araújo et al., 2024).

3.4 Tratamento das intoxicações

Atualmente, não há antídotos específicos disponíveis contra intoxicações por ricina. Já existem na literatura estudos direcionados a produção de anticorpos policlonais anti-ricina com resultados promissores, mas que necessitam mais estudos clínicos para sua implantação (Furtado et al., 2011). Dessa forma, os tratamentos focam em terapia de suporte, como fluidos intravenosos para manutenção do volume sanguíneo e administração de carvão ativado associado a um catártico (para evitar a absorção de toxinas e acelerar a eliminação da toxina do corpo). Manutenção do fluxo urinário alcalino com bicarbonato de sódio promove a excreção renal da toxina (Jayalakshmi et al., 2019). A profilaxia consiste na erradicação da planta ou em manter os animais afastados de áreas onde há propagação severa da planta (Albuquerque et al., 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extração de Ricinina nos frutos de mamona para isolamento do padrão

Para o desenvolvimento das metodologias analíticas, a ricinina foi isolada e purificada. A metodologia utilizada está baseada nas descritas por Waller e Negi (1958) e Saravana Kumar et al. (2022). A confirmação da identidade da ricinina isolada foi obtida por CCD e por análise por CLAE com identificação do perfil obtido por espectro UV, comparando com informações da literatura. A determinação da pureza da ricinina isolada foi determinada por CLAE, comparando com padrão puro comercial (Sigma-Aldrich).

Utilizou-se 33,15g de frutos de mamona secos em temperatura ambiente por 7 dias. Após a fragmentação dos frutos, foram adicionados 500 ml de metanol e mantidos em temperatura ambiente por 24 horas, com agitação manual a cada 8 horas, aproximadamente. Após este período, a mistura foi filtrada para separação da porção líquida, e o resíduo sólido foi extraído novamente com metanol por 24 horas. Os filtrados obtidos foram juntados e o solvente foi removido em evaporador rotativo a 40°C para obtenção do extrato seco.

Para a solubilização do extrato seco, adicionou-se 100 ml de água destilada acidificada com ácido acético 1%, seguido de banho sonicator por 2 minutos e filtragem em filtro de papel qualitativo MN-617, 110 mm de diâmetro. Ao filtrado resultante, acrescentou-se hidróxido de amônio para basificar a solução (pH igual a 9-10).

Em um filtro de decantação, a mistura foi fracionada exaustivamente com clorofórmio, utilizando 50 ml em cada partição. Posteriormente, foi filtrada em cloreto de sódio para retirar as moléculas de água remanescentes. O extrato foi deixado em sistema de fluxo de ar contínuo por 24 horas para evaporar o solvente ainda presente na amostra extraída.

Após a secagem do solvente, o extrato seco foi solubilizado na menor quantidade possível de metanol e refrigerado a -20°C por 24 horas para precipitação da ricinina. Em seguida, retirou-se a fração líquida com auxílio de uma pipeta, seguindo de evaporação em sistema de fluxo de ar contínuo até a secagem completa.

4.2- Análises por cromatografia em camada delgada (CCD)

A análise por CCD foi realizada utilizando placas de sílica gel 60 e fase móvel clorofórmio:metanol (90:10). Para a identificação da ricinina, foi feita a leitura com lâmpada de fluorescência a 254 nm e revelação química com o reagente de Dragendorff. A determinação

do limite de detecção foi feita com diferentes quantidades de ricinina, variando de 0,1 µg a 5,0 µg.

4.3- Análises por cromatografia líquida de alta performance (CLAE)

4.3.1- Preparo das amostras

As amostras biológicas utilizadas foram urina, fígado e conteúdo ruminal de bovino adulto. Amostras brancas (sem ricinina) foram fortificadas com padrão de ricinina nas concentrações de 1, 2, 10 µg/ml para amostras de plasma sanguíneo e 5, 10, 50 µg/ml para urina, fígado e conteúdo ruminal.

Para o desenvolvimento do procedimento de extração realizado nas amostras de fígado, fluido ruminal e urina, foram comparadas diferentes modificações de técnicas analíticas, incluído *clean-up* com cartuchos C8 após extração com acetato de etila (Machado et al., 2022) ou clorofórmio (Teixeira et al., 2024) e modificações da metodologia QuEChERS (Brandhonneur et al., 2015; Śniegocki et al., 2019; Torquetti et al., 2022). A metodologia QuEChERS foi a que apresentou melhor recuperação e resolução dos cromatogramas, sendo desenvolvida aqui modificações para melhorar sua eficácia.

Em cada matriz, foram testadas 24 amostras separadas em 4 grupos: amostras em branco para ricinina; amostras enriquecidas com ricinina em 5 µg/ml; amostras enriquecidas com ricinina em 10 µg/ml; amostras enriquecidas com ricinina em 50 µg/ml.

Cada amostra contendo 1g de fígado triturado misturado a 2,5 mL de acetonitrila, foi submetida à homogeneização em agitador vórtex por 1 minuto. Em seguida, 0,5 mL de solução de acetato de amônio 5 molar e pH 7,8, foi adicionado à amostra, seguido de homogeneização, banho sonicator por 15 minutos e centrifugação a 4500 RPM, por 10 min. A solução sobrenadante foi coletada e uma alíquota de 0,7 mL de cada extrato foi adicionada a um novo tubo de centrífuga com 150 mg de sulfato de magnésio, 50 mg de C18 e 50 mg de PSA, seguido de homogeneização em agitador vórtex por 1 minuto e centrifugação por 10 min a 2000 RPM. Após a centrifugação, o sobrenadante foi injetado em sistema CLAE para teste.

Para extração em fluido ruminal, em cada amostra contendo 2 ml de fluido ruminal foi acrescentado 2 ml de acetonitrila. Após homogeneização em vórtex, foi acrescentado 0,8 g de sulfato de magnésio e 0,2g de acetato de sódio. Em seguida, estas foram submetidas a homogeneização, banho sonicator por 15 minutos e centrifugação a 4500 RPM por 10 minutos. A solução sobrenadante foi coletada e uma alíquota de 1 mL de cada extrato foi adicionada a

um novo tubo de centrifuga com 150 mg de sulfato de magnésio, 25 mg de C18 e 25 mg de PSA, seguido de homogeneização em agitador vórtex por 1 minuto e centrifugação por 10 min a 2000 RPM. Após a centrifugação, o sobrenadante foi injetado no sistema CLAE para teste. A mesma técnica de extração em fluido ruminal, foi realizada nas amostras de urina.

4.3.2- Condições cromatográficas

A análise da ricinina foi realizada em sistema CLAE (LC-20A Prominence, Shimadzu, Kyoto, Japão) utilizando coluna com fase estacionária C-8 (Zorbax Eclipse Plus-C8, 4,6 × 150 mm, 5 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Para determinação da melhor fase móvel, foram testadas previamente diversas combinações de acetonitrila e metanol, em diferentes fluxos. A partir desta definição prévia, foi empregada como fase móvel acetonitrila:água (90:10 v:v), fluxo de 1,0 ml/min e tempo de corrida cromatográfica de 20 minutos. O detector foi programado para leitura da ricinina em 218, 308 e 315 nm, para poder comparar os resultados obtidos nos diferentes comprimentos de onda. A identificação da ricinina foi realizada comparando o tempo de retenção do padrão da ricinina com a amostra, com confirmação pelo espectro UV (190-400 nm).

4.3.3- Validação das técnicas analíticas de cromatografia líquida de alta performance (CLAE)

Para a validação da técnica analítica de CLAE, foram determinadas a seletividade, a linearidade, os limites de detecção e quantificação, e a recuperação (Codex Alimentarius, 2017; EC, 2019; Passagli et al., 2023). A avaliação da seletividade foi realizada comparando os cromatogramas oriundos da análise das amostras brancas com aqueles dos padrões de ricinina, e depois foi feita a mistura do padrão às amostras brancas. A linearidade foi determinada por meio da comparação da altura dos picos cromatográficos com a concentração do padrão. Para construção da curva analítica, foram usadas as concentrações e as alturas dos picos cromatográficos, e feita a regressão linear. A curva analítica foi elaborada com o padrão em concentrações variando de 0,05 a 500 µg/mL. O limite de detecção foi determinado por meio da relação sinal:ruído de 3:1. A determinação do limite de quantificação foi feita pela relação sinal:ruído de 10:1, em amostras replicadas.

A recuperação foi calculada em porcentagem comparando os valores obtidos pela adição da 5, 10 e 50 µg/ml de ricinina em seis repetições para cada tipo de amostra, que foi processada pelos métodos de extração desenvolvidos, comparando com os valores obtidos com

os padrões de ricinina dissolvidos em acetonitrila. Para a determinação do efeito matriz, extratos de amostras brancas foram adicionados com 100 µg/ml e comparados com o padrão dissolvido em acetonitrila; esta análise foi realizada em triplicata.

5 RESULTADOS

5.1 Extração de ricinina nos frutos de mamona para isolamento do padrão

O tempo de retenção e o perfil do espectro UV (190-400 nm) da ricinina isolada (Fig. 1) foram similares aos obtidos com o padrão comercial. O rendimento foi de 28,1 mg de ricinina, com pureza de 91,7% pureza de acordo com as áreas dos picos cromatográficos a 190 nm.

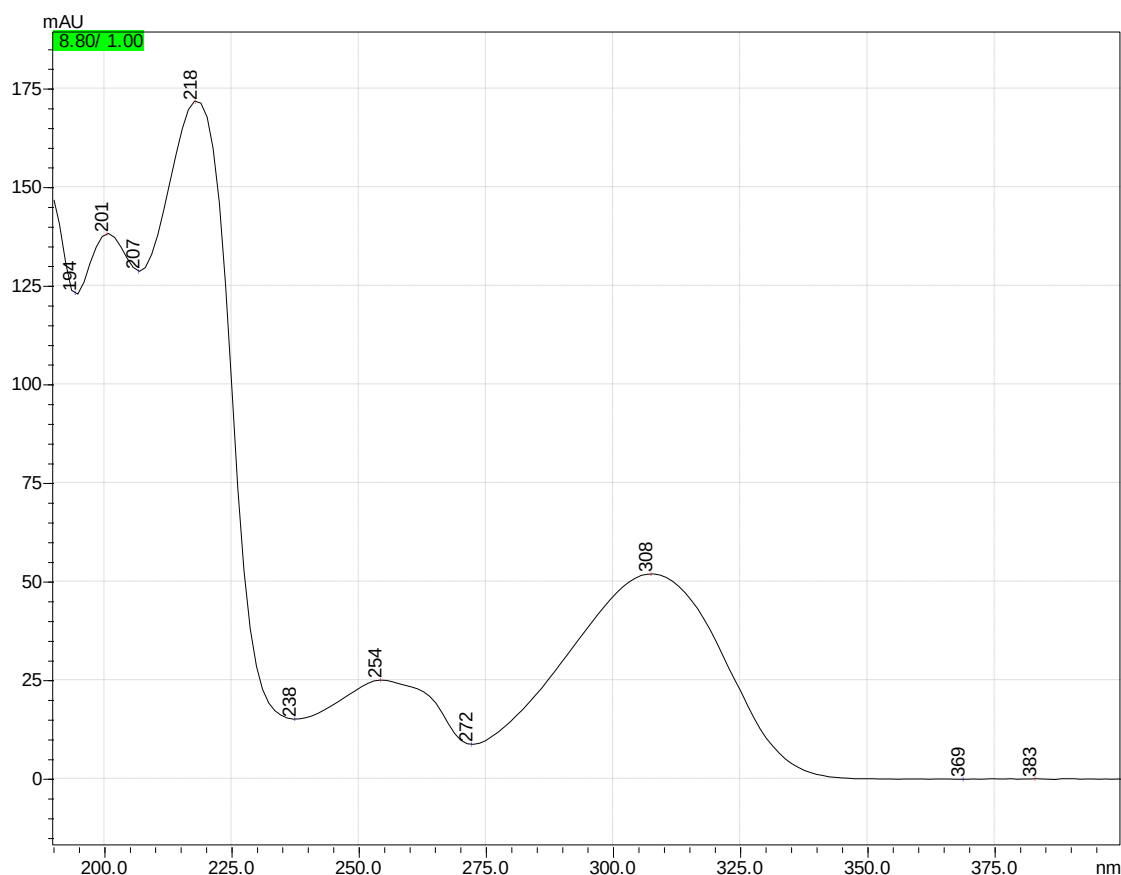


Figura 15: Perfil do espectro UV (190-400 nm) da ricinina isolada.

5.2- Análises por CCD

A análise por CCD foi realizada utilizando placas de sílica gel 60 e fase móvel clorofórmio:metanol (90:10). O limite de detecção da ricinina foi 0,5 µg com leitura por fluorescência a 254 nm, e 1,0 µg com leitura visual após revelação com o reagente de Dragendorff.

5.3- Análises por CLAE

5.3.1- Curva padrão

A curva padrão de ricinina apresentou linearidade com R^2 próximo a 1 nas leituras a 218 nm (Fig. 2), 308 nm (Fig. 3) e 315 nm (Fig. 4). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) variaram segundo o comprimento de onda utilizado para a leitura (Tabela 1), sendo menores com leitura a 218 nm (LD = 0,1 $\mu\text{g/ml}$ e LQ = 0,5 $\mu\text{g/ml}$), intermediários a 308 nm (LD = 0,25 $\mu\text{g/ml}$ e LQ = 1,25 $\mu\text{g/ml}$) e maiores a 315 nm (LD = 0,5 $\mu\text{g/ml}$ e LQ = 2,5 $\mu\text{g/ml}$).

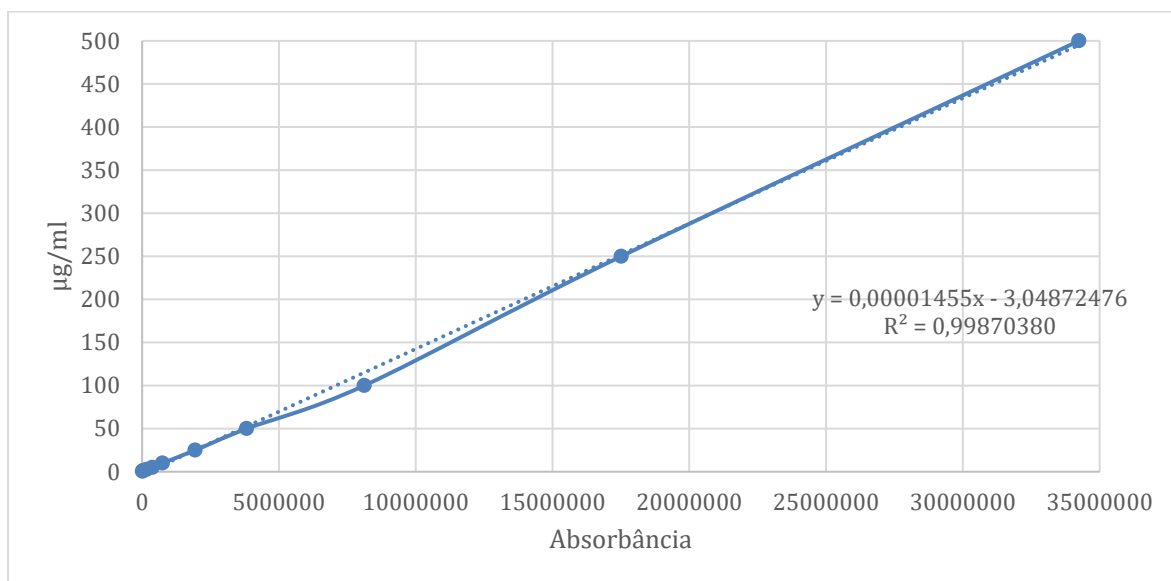


Figura 16: Linearidade da curva padrão com leitura a 218 nm.

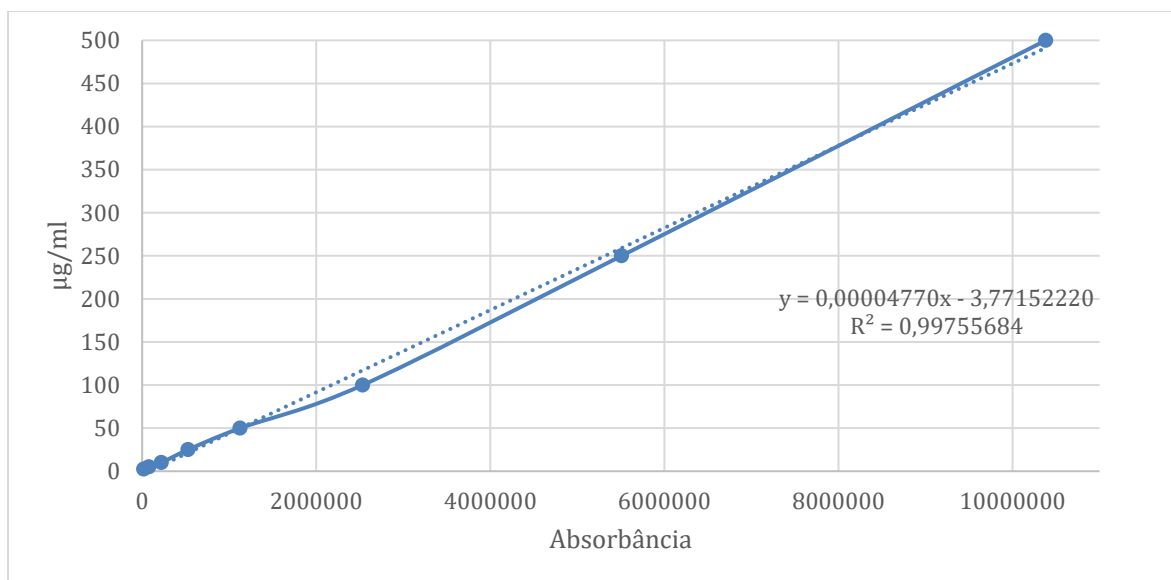


Figura 17: Linearidade da curva padrão com leitura a 308 nm.

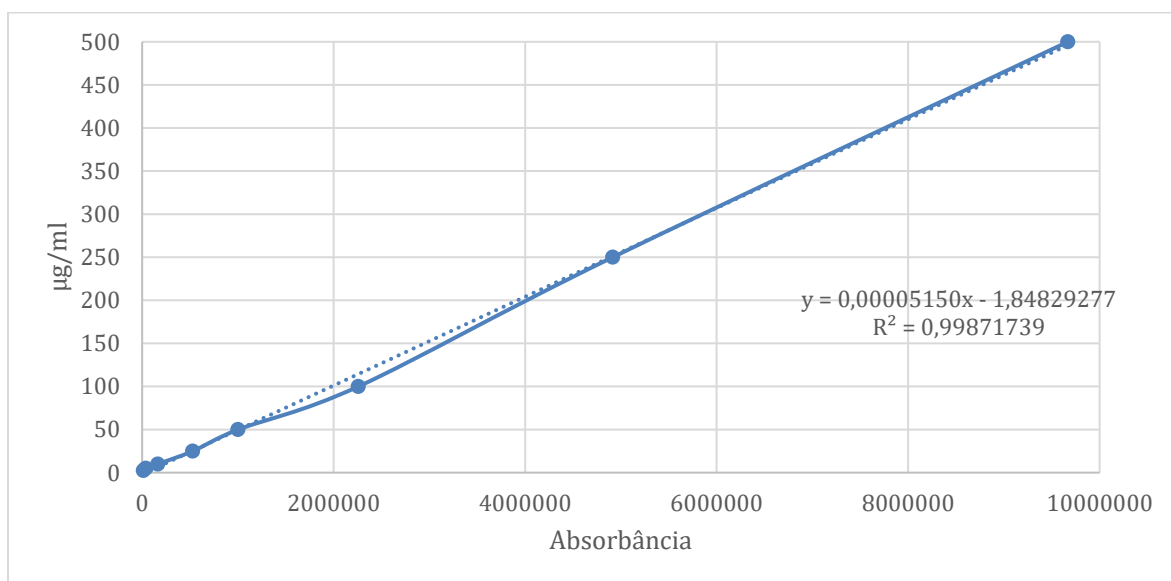


Figura 18: Linearidade da curva padrão com leitura a 315 nm.

Tabela 1. Limites de detecção e de quantificação obtidos nos diferentes comprimentos de onda utilizados para a leitura.

Parâmetro	Comprimento de Onda		
	218 nm	308 nm	315 nm
Limite de detecção (µg/ml)	0,15	0,375	0,5
Limite de quantificação (µg/ml)	0,50	1,25	1,67

5.3.2- Utilização de amostras de fígado

A figura 19 apresenta o cromatograma em 3D de amostra de fígado adicionada com 5 µg/ml. Os valores do efeito matriz e dos limites de detecção e de quantificação obtidos para amostras de fígado estão apresentados na Tabela 2, e os valores de recuperação de diferentes concentrações de ricinina estão apresentados na Tabela 3. Todos estes resultados mostram que a metodologia apresentou eficácia aceitável para a determinação da ricinina em amostras de fígado.

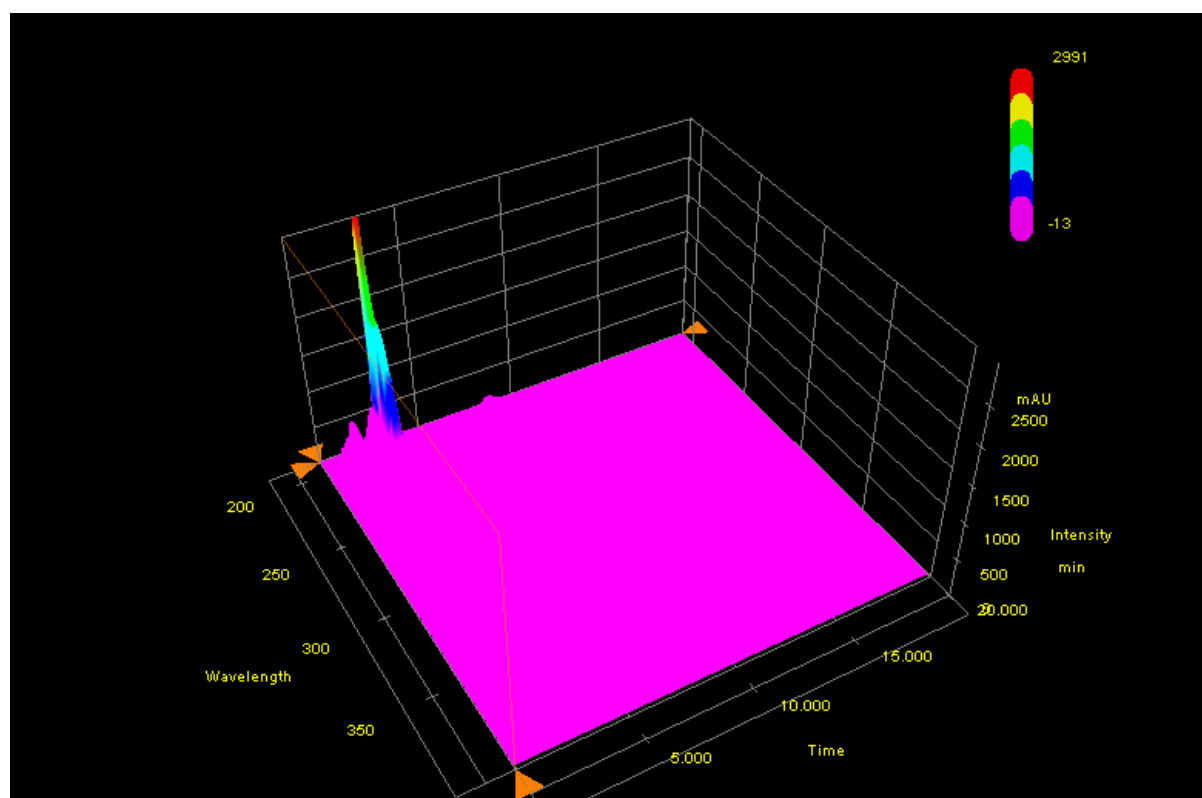


Figura 19: Cromatograma em 3D de amostra de fígado adicionada com 5 µg/ml.

Tabela 2. Efeito matriz e limites de detecção e de quantificação obtidos para amostras de fígado, de acordo com os diferentes comprimentos de onda utilizados para a leitura.

Parâmetro	Comprimento de Onda		
	218 nm	308 nm	315 nm
Efeito matriz (%)	94,0 ± 6,80	92,1 ± 5,55	94,1 ± 6,97
Limite de detecção (µg/ml)	0,375	0,9375	1,25
Limite de quantificação (µg/ml)	1,25	3,125	4,175

Tabela 3. Recuperação de diferentes concentrações de ricinina adicionadas em amostra branca de fígado, de acordo com os diferentes comprimentos de onda utilizados para a leitura.

Parâmetro	Concentração		
	5 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml
218 nm			
Recuperação (%)	74,0	71,4	71,0
Desvio-padrão	2,68	4,50	8,69
Desvio-padrão relativo (%)	3,63	6,29	12,25
308 nm			
Recuperação (%)	74,4	71,1	69,3
Desvio-padrão	5,84	3,16	4,56
Desvio-padrão relativo (%)	7,85	4,45	6,58
315 nm			
Recuperação (%)	74,2	72,7	74,1
Desvio-padrão	6,92	2,70	7,81
Desvio-padrão relativo (%)	9,33	3,72	10,53

5.3.3- Utilização de amostras de fluido ruminal

A figura 20 apresenta o cromatograma em 3D de amostra de fluido ruminal adicionada com 5 µg/ml. Os valores do efeito matriz e dos limites de detecção e de quantificação obtidos para amostras de fluido ruminal estão apresentados na Tabela 4, e os valores de recuperação de diferentes concentrações de ricinina estão apresentados na Tabela 5. Todos estes resultados mostram que a metodologia apresentou eficácia aceitável para a determinação da ricinina em amostras de fluido ruminal.

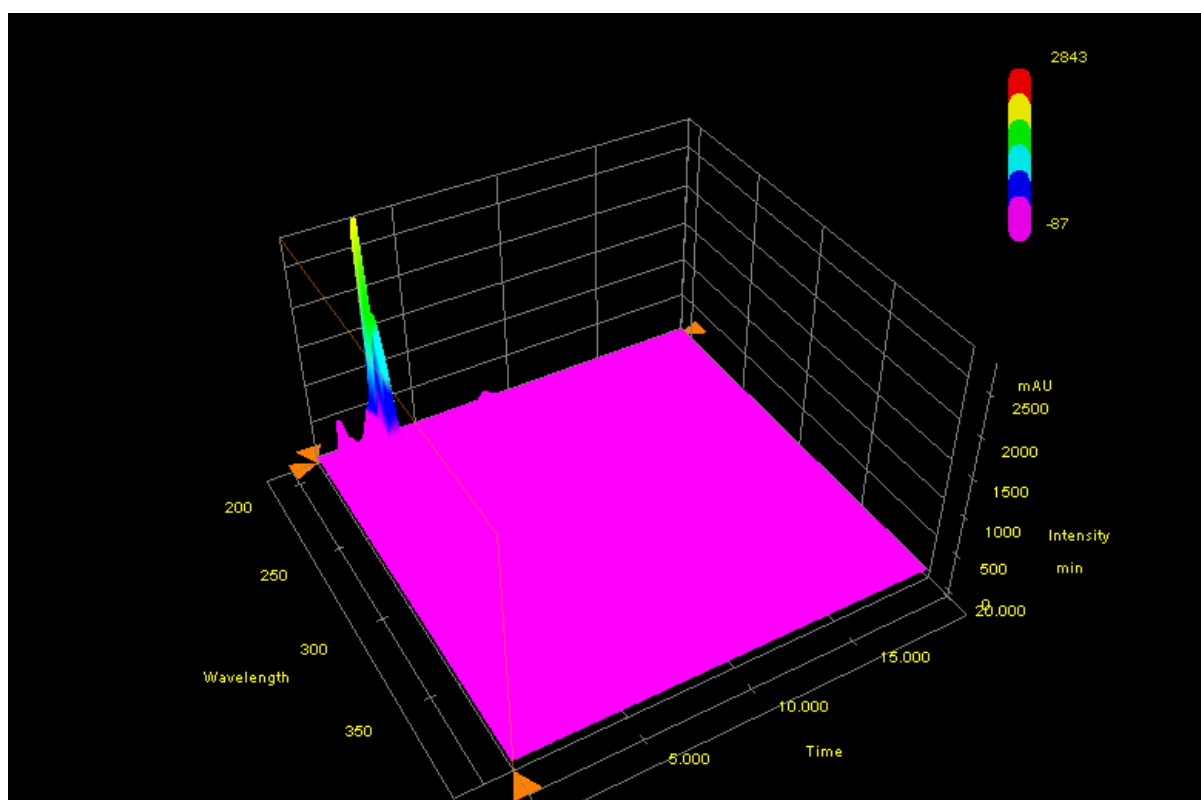


Figura 20: Cromatograma em 3D de amostra de fluido ruminal adicionada com 5 µg/ml.

Tabela 4. Efeito matriz e limites de detecção e de quantificação obtidos para amostras de fluido ruminal, de acordo com os diferentes comprimentos de onda utilizados para a leitura.

Parâmetro	Comprimento de Onda		
	218 nm	308 nm	315 nm
Efeito matriz (%)	94,0 ± 6,80	97,6 ± 1,28	100,4 ± 1,18
Limite de detecção (µg/ml)	0,15	0,375	0,5
Limite de quantificação (µg/ml)	0,50	1,25	1,67

Tabela 5. Recuperação de diferentes concentrações de ricinina adicionadas em amostra branca de fluido ruminal, de acordo com os diferentes comprimentos de onda utilizados para a leitura.

Parâmetro	Concentração		
	5 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml
218 nm			
Recuperação (%)	90,9	94,7	98,3
Desvio-padrão	4,53	3,47	2,67
Desvio-padrão relativo (%)	4,98	3,66	2,71
308 nm			
Recuperação (%)	95,7	104,7	94,7
Desvio-padrão	6,37	1,67	1,77
Desvio-padrão relativo (%)	6,66	1,59	1,87
315 nm			
Recuperação (%)	92,8	103,4	101,9
Desvio-padrão	8,02	1,77	1,83
Desvio-padrão relativo (%)	8,64	1,71	1,80

5.3.4- Utilização de amostras de urina

A figura 21 apresenta o cromatograma em 3D de amostra de urina adicionada com 5 $\mu\text{g/ml}$. Os valores do efeito matriz e dos limites de detecção e de quantificação obtidos para amostras de urina estão apresentados na Tabela 6, e os valores de recuperação de diferentes concentrações de ricinina estão apresentados na Tabela 7. Todos estes resultados mostram que a metodologia apresentou eficácia aceitável para a determinação da ricinina em amostras de urina.

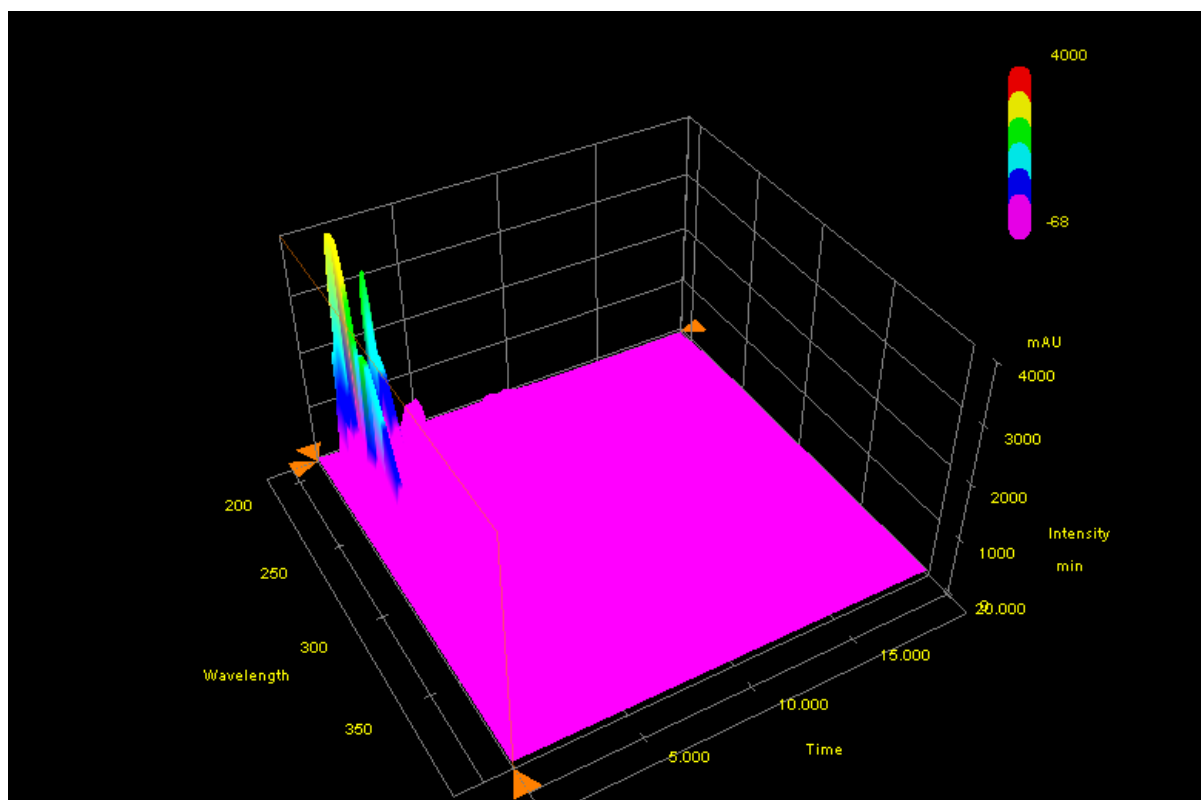


Figura 21: Cromatograma em 3D de amostra de urina adicionada com 5 $\mu\text{g/ml}$.

Tabela 6. Efeito matriz e limites de detecção e de quantificação obtidos para amostras de urina, de acordo com os diferentes comprimentos de onda utilizados para a leitura.

Parâmetro	Comprimento de Onda		
	218 nm	308 nm	315 nm
Efeito matriz (%)	105,4 ± 0,52	98,6 ± 0,57	98,5 ± 0,58
Limite de detecção (µg/ml)	0,15	0,375	0,5
Limite de quantificação (µg/ml)	0,50	1,25	1,67

Tabela 7. Recuperação de diferentes concentrações de ricinina adicionadas em amostra branca de urina, de acordo com os diferentes comprimentos de onda utilizados para a leitura.

Parâmetro	Concentração		
	5 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml
218 nm			
Recuperação (%)	80,2	80,0	72,8
Desvio-padrão	15,46	4,47	5,38
Desvio-padrão relativo (%)	19,28	5,58	7,39
308 nm			
Recuperação (%)	87,4	91,7	88,9
Desvio-padrão	4,86	7,72	4,95
Desvio-padrão relativo (%)	5,56	8,43	5,57
315 nm			
Recuperação (%)	88,0	91,3	88,8
Desvio-padrão	6,31	7,72	4,91
Desvio-padrão relativo (%)	7,17	8,45	5,53

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram desenvolvidas metodologias analíticas para a determinação de ricinina em amostras animais, para serem utilizadas para confirmação da exposição à mamona em casos suspeitos de intoxicação.

A detecção da ricina em amostras de casos suspeitos de intoxicação é bastante difícil (Worbs et al., 2011), por causa do elevado peso molecular, da baixa concentração desta toxina, por parte dela apresentar separação das cadeias A e B, e pela cadeia A poder estar complexada moléculas ribossomais. Assim, a ricinina pode ser utilizada como biomarcador da exposição à mamona. De fato, a detecção deste alcaloide foi realizada em amostras de conteúdo gástrico de um cão intoxicado por sementes de mamona (Mouser et al., 2007), de conteúdo digestório, fígado e rins de dois cães intoxicados por torta de mamona utilizada como adubo (Roels et al., 2010), e de fígado e conteúdo gástrico de caprinos que consumiram folhas e sementes da mamona (Machado et al., 2022). Também foi utilizada em casos humanos, em amostras de urina (Johnson et al., 2005; Coopman et al., 2009), sangue e humor vítreo (Coopman et al., 2009).

A detecção da ricinina na maioria dos trabalhos anteriores foi realizada utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (Johnson et al., 2005; Mouser et al., 2007; Coopman et al., 2009; Roels et al., 2010). A espectrometria de massas é uma metodologia bastante sensível e específica para análises toxicológicas (Lanças et al., 2023; Passagli et al., 2023), mas apresenta elevados custos para implantação, utilização e manutenção, limitando seu uso na rotina de diagnóstico das intoxicações animais. Assim, neste estudo foram desenvolvidas metodologias analíticas de menores custos que possam ser utilizadas na rotina da toxicologia veterinária.

Inicialmente foi realizada a obtenção de padrão de ricinina, para reduzir os custos com a utilização do padrão comercial. A metodologia utilizada foi capaz de isolar a ricinina em quantidade e pureza adequadas para as análises. Um cuidado que deve ser tomado com o padrão purificado da ricinina é o armazenamento a -20°C , pois a ricinina facilmente apresenta conversão em N-demetilricinina e O-demetilricinina (Skurský et al., 1969; Ovenden et al., 2010), gerando divisão do pico cromatográfico.

Uma etapa do presente estudo foi avaliar a sensibilidade da técnica de CCD para identificar a presença de ricinina nas amostras. As análises por CCD são metodologias de fácil implantação e baixo custo, favorecendo sua utilização em grande número de laboratórios, mas seus resultados não são qualitativos e apresentam menor sensibilidade do que metodologias de cromatografia líquida ou gasosa (Passagli et al., 2023). A análise da ricinina por CCD apresentou melhor sensibilidade mediante avaliação por fluorescência (0,5 μg) do que após revelação com o reagente de Dragendorff (1,0 μg). No entanto, como as amostras de animais devem apresentar concentrações muito baixas de ricinina, esta metodologia pode não ser sensível o suficiente para muitos casos. Por exemplo, em caprinos intoxicados por mamona, foram encontradas concentrações de 10,1 e 10,9 $\mu\text{g/g}$ no fígado (Machado et al., 2022), que pela metodologia de extração aqui apresentada resultaria em extrato contendo cerca de 3 $\mu\text{g/ml}$. Como a detecção por CCD é de 0,5 μg , teriam de ser aplicados na placa cerca de 170 μl da amostra, o que é inviável. Assim, a análise por CCD não é adequada para utilização na confirmação de casos de intoxicações por mamona.

O presente trabalho desenvolveu metodologias analíticas utilizando CLAE com detecção por ultravioleta para diagnóstico das intoxicações por mamona em animais. As amostras utilizadas foram fígado, fluido ruminal e urina. Para um método analítico, a recuperação média é considerada adequada se estiver no intervalo de 70% a 120%, e a variação (desvio-padrão relativo) for inferior a 20% (EC, 2019; Passagli et al., 2023). Assim, as avaliações por CLAE aqui descritas podem ser consideradas adequadas.

Os comprimentos de onda utilizados foram 208 e 308 nm, que são lambdas máximos observados no perfil UV da molécula, e 315 nm. Trabalhos anteriores utilizaram os comprimentos de 309 (Coopman et al., 2009) e 315 nm (Machado et al., 2022), mas ainda não se sabia qual o melhor comprimento de onda para estas análises. Os limites de detecção e quantificação da ricinina foram inferiores quando utilizado 208 nm (0,1 e 0,5 µg/ml, respectivamente), seguido por 308 nm (0,375 e 1,25 µg/ml) e 315 nm (0,5 e 1,67 µg/ml). No entanto, as diferenças entre estes valores não são muito grandes. Os comprimentos de onda 308 e 315 nm possuem a vantagem de apresentar menores números de outros picos no cromatograma, facilitando as análises. A resolução da metodologia em qualquer comprimento de onda é adequada para a análise de amostras animais em casos de intoxicação. De fato, em caprinos intoxicados por mamona, as concentrações de ricinina encontradas foram 10,1 e 10,9 µg/g no fígado e 21,1 e 25,1 µg/g no fluido ruminal (Machado et al., 2022).

7 CONCLUSÃO:

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a determinação da ricinina para confirmação da intoxicação em animais pode ser feita utilizando amostras de fígado, fluido ruminal e urina extraídas por modificação da metodologia QuEChERS e análise por meio de CLAE. Por outro lado, a análise por CCD não é adequada para utilização na confirmação de casos de intoxicações por mamona.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALBUQUERQUE, S.S.C.; ROCHA, B.P.; ALBUQUERQUE, R.F. et al. Spontaneous poisoning by *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) in cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.34, p.827-83, 2014.

ANANDAN, S.; KUMAR, G.A.; GHOSH, J.; RAMACHANDRA, K.S. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. *Animal Feed Science and Technology*, v.120, n.1-2, p.159-168, 2005.

ANDRADE, I.R.A.; CÂNDIDO, M.J.D.; POMPEU, R.C.F.F. et al. Inactivation of lectins from castor cake by alternative chemical compounds. *Toxicon*, v.160, p.47-54, 2019.

ARAÚJO, D. S.; SANTOS, A. DA S.; TOSTES, R. A.; MIGUEL, M. P.; MENEZES, L. B. Application of legal veterinary medicine: Main toxic agents versus real cases of intentional intoxication in domestic animals analyzed in criminal expertise in central Brazil. *Forensic science international. Animals and Environments*, v.5, n.100087, art.100087, 2024.

ARAÚJO, R.A.; NEIVA, J.N.M.; ROGÉRIO, M.C.P. et al. Destoxificação e perfil nutricional da torta de mamona destoxificada por diferentes soluções alcalinas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.72, p.1947-1958, 2020.

ARMÍÉN, A.G.; D'ANGELIS, F.H. de F.; TOKARNIA, C.H. Envenenamento experimental de ovelhas com sementes de *Ricinus communis*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.4, p.99-106, 1996.

ASLANI, M.R.; MALEKI, M.O.H.S.E.N.; MOHRI, M. et al. Castor bean (*Ricinus communis*) toxicosis in a sheep flock. *Toxicon*, v.49, n.3, p.400-406, 2007.

AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, M. et al. Ricin poisoning: a comprehensive review. *Journal of the American Medical Association*, v.294, n.18, p.2342-2351, 2005.

BEZERRA, M.J.G.; BRITO, M.F. Intoxicação experimental pelas folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) em ovinos e caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.15, p.27-34, 1995.

BIANCHI, M.V.; VARGAS, T.P.; LEITE FILHO, R.V. et al. Intoxicação espontânea por *Ricinus communis* em ovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.46, p.294, 2018.

BORJA, M.S.; OLIVEIRA, R.L.; SILVA, T.M. et al. Effectiveness of calcium oxide and autoclaving for the detoxification of castor seed meal in finishing diets for lambs. *Animal Feed Science and Technology*, v.231, p.76-88, 2017.

BRADBERRY, S. Ricin and abrin. *Medicine*, v.44, n.2, p.109-110, 2016.

BRADBERRY, S.M.; DICKERS, K.J.; RICE, P. et al. Ricin poisoning. *Toxicological Reviews*, v.22, p.65-70, 2003.

BRANDHONNEUR, N.; DE SOUSA MENDES, M.; LEPVRIER, E.; FLEJOU ESSEIVA, E.; CHEVANNE, F.; LE CORRE, P. A micro-QuEChERS method coupled to GC-MS for the quantification of pesticides in specific maternal and fetal tissues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.104, p.90-96, 2015.

BRITO, L.B.; RIET-CORREA, F.; ALMEIDA, V.M. et al. Spontaneous poisoning by *Ricinus communis* leaves (Euphorbiaceae) in goats. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.39, p.123-128, 2019.

BRITO, M.F.; TOKARNIA, C.H. Intoxicação experimental pelas sementes trituradas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) em coelhos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.17, n.1, p.1-7, 1997.

CÉSAR, A.S.; BATALHA, M.O. Análise dos direcionadores de competitividade sobre a cadeia produtiva de biodiesel: o caso da mamona. *Production*, v.21, p.484-497, 2011.

CHAKRABORT, I.; CHATTERJEE, K. Polymers and composites derived from castor oil as sustainable materials and degradable biomaterials: current status and emerging trends. *Biomacromolecules*, v.21, n.12, p.4639-4662, 2020.

CODEX ALIMENTARIUS. Guidelines on Performance Criteria for Methods of Analysis for the Determination of Pesticide Residues in Food and Feed. CXG90-2017. Roma: Food and Agriculture Organization - FAO, 2017. 13p.

COOPMAN, V.; DE LEEUW, M.; CORDONNIER, J.; JACOBS, W. Suicidal death after injection of a castor bean extract (*Ricinus communis* L.). *Forensic Science International*, v.189, n.1-3, p.e13-20, 2009.

COSTA, A.M.D.; SOUZA, D.P.M.; CAVALCANTE, T.V.; ARAÚJO, V.L.; RAMOS, A.T.; MARUO, V.M. Plantas tóxicas de interesse pecuário em região de ecotono Amazônia e cerrado. Parte II: Araguaína, Norte do Tocantins. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.5, n.3, p.317-324, 2011.

DARBY, S.M.; MILLER, M.L.; ALLEN, R.O. Forensic determination of ricin and the alkaloid marker ricinine from castor bean extracts. *Journal of Forensic Sciences*, v.46, n.5, p.1033-1042, 2001.

DE MELO, L.; DE ALMEIDA, D.J. Relatos do efeito cumulativo de substâncias tóxicas em bovinos. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, v.3, n.2, p.592-601, 2020.

DE OLIVEIRA, E.M. Avaliação do teor de óleo e peso em sementes de mamona utilizando diversos acessos. *Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia*, v.8, n.1, p.205-211, 2011.

EC - European Commission. Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed. SANTE/12682/2019. Bruxelas: DG SANTE, 2019. 46p.

FRANKE, H.; SCHOLL, R.; AIGNER, A. Ricin and Ricinus communis in pharmacology and toxicology-from ancient use and “Papyrus Ebers” to modern perspectives and “poisonous plant of the year 2018”. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v.392, p.1181-1208, 2019.

FURTADO, R.F.; GUEDES, M.I.F.; ALVES, C.R. et al. Produção de anticorpos policlonais anti-ricina. *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, p.124-130, 2011.

GARLAND, T.; BAILEY, E.M. Toxins of concern to animals and people. *Revue Scientifique et Technique Office International of Epizootics*, v. 25, p.341-351, 2006.

GERALDO NETO, S.A.G.; SAKAMOTO, S.M.; SOTO-BLANCO, B. Inquérito epidemiológico sobre plantas tóxicas das mesorregiões Central e Oeste do Rio Grande do Norte. *Ciência Rural*, v.43, n.7, p.1281-1287, 2013.

GONÇALVES, C.A.V.; OLORIS, S.C.S.; SOTO-BLANCO, B. Avaliação da capacidade da ricina inativada pelo calor para prevenção da intoxicação pela mamona (*Ricinus communis*). *Acta Veterinaria Brasilica*, v.3, p.84-87, 2009.

GONÇALVES, H.P.C.; PEREIRA, C.D.S.S.; CARVALHO, J.T.; DA SILVA, H.S.T. Estudo da conversão do óleo de mamona (*Ricinus communis* L) em polímeros: uma revisão. *Revista Eletrônica Teccen*, v.15, n.1, p.30-37, 2022.

HONG, I.H.; KWON, T.E.; LEE, S.K. et al. Fetal death of dogs after the ingestion of a soil conditioner. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v.63, n.1-2, p.113-117, 2011

JAYALAKSHMI, K.; SELVARAJ, P.; ARULKUMAR, T. et al. Accidental Ricinus communis oil cake intoxication in a dairy cow. *Journal of Livestock Research*, v.9, n.4, p.238-242, 2019.

JOHNSON, R.C.; LEMIRE, S.W.; WOOLFITT, A.R. et al. Quantification of ricinine in rat and human urine: a biomarker for ricin exposure. *Journal of Analytical Toxicology*, v.29, p.149-155, 2005.

KUMAR, M. A review on phytochemical constituents and pharmacological activities of Ricinus communis L. *Plant. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, v.9, p.466-472, 2017.

LANÇAS, F.M. *Análise de Resíduos e Contaminantes em Alimentos de Origem Animal*. Campinas: Átomo, 2023. 393p.

MACHADO, M.; QUEIROZ, C.R.; WILSON, T.M. et al. Neurological and gastrointestinal manifestations of spontaneous poisoning by Ricinus communis in goats. *Toxicon*, v.214, p.74-77, 2022.

MACHADO, O.L.T. Métodos para detecção de toxinas e alérgenos de mamona e de pinhão-manso. *Agroenergia em Revista*, v.6, n.2, p.24-27, 2013.

MARIN, R.E.; SCHILD, C.; GARCIA, J. et al. Pathology of cattle experimentally intoxicated with ground *Ricinus communis* seeds. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v.11, n.3, p.86-91, 2018.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química nova*, v. 32, n. 1, p. 212–222, 2009.

MARIN, R.E.; SCHILD, C.; GARCIA, J.; CANTON, G.J.; MICHELOUD, J.; MORRELL, E.L.; UZAL, F.A. Pathology of cattle experimentally intoxicated with ground *Ricinus communis* seeds. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v.11, n.3, p.86-91, 2018.

MONTÃO, D.P.; ARAÚJO, B.T.; SANTOS, T.F. et al. Accidental poisoning by castor bean (*Ricinus communis*) cake in horses. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.38, p.1923-1928, 2018.

MOSHIRI, M.; HAMID, F.; ETEMAD, L. Ricin toxicity: clinical and molecular aspects. *Reports of biochemistry & molecular biology*, v.4, n.2, p.60, 2016.

MOUSER, P.; FILIGENZI, M.S.; PUSCHNER, B. et al. Fatal ricin toxicosis in a puppy confirmed by liquid chromatography/mass spectrometry when using ricinine as a marker. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.19, n.2, p 216-220, 2007.

MUTLU, H.; MEIER, M.A.R. Castor oil as a renewable resource for the chemical industry. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.112, n.1, p.10-30, 2010.

NUNEZ, O.F.L.; PIZON, A.F.; TAMAMA, K. Ricin poisoning after oral ingestion of castor beans: a case report and review of the literature and laboratory testing. *The Journal of emergency medicine*, v.53, n.5, p.67-71, 2017.

OGUNNIYI, D.S. Castor oil: a vital industrial raw material. *Bioresource technology*, v.97, n.9, p.1086-1091, 2006.

OLIVEIRA, I.P.; SANTOS, K.J.G.; BELTRÃO, N.E.M. et al. Potenciais da mamona (*Ricinus communis*) na região Centro-oeste brasileira. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos*, v.1, p.104-130, 2005.

OLIVEIRA, R.B.; GIMENEZ, V.M.M.; GODOY, S.A.P. Intoxicações com a família Euphorbiaceae. *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, n.S1, p.69-71, 2007.

OVENDEN S.P.B.; GORDON, B.R.; BAGAS, C.K.; MUIR, B.; ROCHFORT, S.; BOURNE, D.J. A study of the metabolome of *Ricinus communis* for forensic applications. *Australian Journal of Chemistry*, v.63, n.1, p.8-21, 2010.

PAIM, R.; FERREIRA, P.L.G.; SOARES, D.M.; ROCHA, T.F.G.; RIBEIRO, A.L.; BARROS, N.; SANTOS, F.C.; FERREIRA, H.D.; GOMES-KLEIN, V.L.; SOTO-BLANCO, B.; OLIVEIRA-FILHO, J.P.; CUNHA, P.H.J.; RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.; COOK, D.; FIORAVANTI, M.C.S.; BOTELHO, A.F.M. Toxic plants from the perspective of a “Quilombola” community in the Cerrado region of Brazil. *Toxicon*, v.224, art.107028, 2023.

PASSAGLI, M.; MARINHO, P.A.; LORDEIRO, R.A. Validação de métodos analíticos. In: PASSAGLI, M. (Ed.). Toxicologia Forense - Teoria e Prática. 6ª ed. Campinas: Millenium, 2023. p.555-571.

PESSOA, C.R.M.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.33, p.752-758, 2013.

REIS, S.D.S.; SANTOS, M.C.; MACÊDO, J.T.S.A.; PEDROSO, P.M. O. Plantas tóxicas para animais produção da região Sudoeste da Bahia. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v.14, n.2, p.269–280, 2020.

RIET-CORRÊA, F.; FIORAVANTI, M.C.S.; MEDEIROS, R.M.T. A pecuária brasileira e as plantas tóxicas. Revista UFG, v.13, n.13, p.83-91, 2012.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.; PFISTER, J.A.; MENDONÇA, F.S. Toxic plants affecting the nervous system of ruminants and horses in Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.37, p.1357-1368, 2017.

RIET-CORREA, F.; MACHADO, M.; MICHELOUD, J.F. Plants causing poisoning outbreaks of livestock in South America: a review. Toxicon: X, v.17, art.100150, 2023.

ROELS, S.; COOPMAN, V.; VANHAELEN, P.; CORDONNIER, J. Lethal ricin intoxication in two adult dogs: toxicologic and histopathologic findings. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v.22, n.3, p.466-468, 2010.

SARAVANA KUMAR, P.; LI, Y.; HE, M.; YUVARAJ, P.; BALAKRISHNA, K.; IGNACIMUTHU, S. Rapid isolation of ricinine, a pyridone alkaloid from *Ricinus communis* (L.) with antifungal properties. Journal of Biologically Active Products from Nature, v.12, n.1, p.33-41, 2022.

SEVERINO, L.S.; AULD, D.L.; BALDANZI, M. et al. Review on the challenges for increased production of castor. Agronomy Journal, v.104, p.853-880, 2012.

SILVA FILHO, G.B.; CHAVES, H.A.S.; BRAGA, T.C.; LEMOS, B.O.; ALMEIDA, V.A.; SOUZA, F.A.L.; EVÊNCIO-NETO, J.; MENDONÇA, F.S. Intoxicação espontânea pelas folhas de *Ricinus communis* em caprinos no Agreste de Pernambuco. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.36, sup.2, p.206-207, 2016.

SKURSKÝ, L.; BURLESON, D.; WALLER, G.R. Interconversion of ricinine and n-demethylricinine in senescent and green castor plant leaves. Journal of Biological Chemistry, v.244, n.12, p.3238-3242, 1969.

ŚNIEGOCKI, T.; SELL, B.; POSYNIK, A. The usefulness of MS3 to confirm poisoning on the example of dog poisoning with strychnine. *Molecules*, v.24, n.20, art.3765, 2019.

SOTO-BLANCO, B.; SINHORINI, I.L.; GORNIK, S.L.; SCHUMACHER-HENRIQUE, B. Ricinus communis cake poisoning in a dog. *Veterinary and Human Toxicology*, v.44, n.3, p.155-156, 2002.

SUNDARRAJ, A. A.; MAURYA, S. P.; BINORKAR, S. V. Integration of Physiochemical Characterization Techniques in Toxicological Screening of Emerging Contaminants in Food and Environment. *Tuijin Jishu/Journal of Propulsion Technology*, v.45, n.2, p. 3488–3499, 2024.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. Intoxicação experimental em bovinos pelas folhas de Ricinus communis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 10, n. 8, p. 1-7, 1975.

TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V.; BARBOSA, J.D.; BRITO, M.F.; DÖBEREINER, J. *Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção*. 2a ed. Helianthus, Rio de Janeiro, 2012. 586p.

TORQUETTI, C.G.; D'AURIOL-SOUZA, M.M.; ANDRÉ, L.C.; GUIMARÃES, A.T.B.; SOTO-BLANCO, B. Miniaturized QuEChERS extraction method for the detection of multi-residue pesticides in bat muscle tissue. *Scientific Reports*, v.12, n.1, art.7164, 2022.

WALLER, G.R.; NEGI, S.S. Isolation of ricin, ricinine, and the allergenic fraction from castor seed pomace from two different sources. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v.35, p.409-412, 1958.

WHITE, M. E. Poisoning of horses with castor seeds. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, v. 31, p. 98-100, 1918.

WOOLDRIDGE, G. H. Castor seed (*Ricinus communis*) poisoning in horses. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, v. 31, p. 94-98, 1918.

WORBS, S.; KÖHLER, K.; PAULY, D. et al. Ricinus communis intoxications in human and veterinary medicine—a summary of real cases. *Toxins*, v.3, n.10, p.1332-1372, 2011.