

PURIFICAÇÃO DE RICINA A PARTIR DE SATURAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO*

Mayrla Rocha Lima¹, Vitor Paulo Andrade da Silva¹, Roselayne Ferro Furtado², Carlúcio Roberto Alves¹,
Maria Izabel Florindo Guedes¹, Rosa Amália Fireman Dutra³

¹Universidade Estadual do Ceará, lia_lima2004@ig.com.br, vitorvolt@hotmail.com, alvescr@yahoo.com, florinf@terra.com.br, ²Embrapa Agroindústria Tropical, roselayne@cnpat.embrapa.br, ³Universidade Estadual de Pernambuco, rfiremandutra@yahoo.com.br

RESUMO – A torta de mamona é bastante nutritiva, porém é observada a presença de ricina, uma das mais potentes fitotoxinas. Existem diferentes estudos envolvendo a purificação dessa proteína, no entanto, os métodos de purificação de ricina empregados, geralmente, são laboriosos e de alto custo. Neste trabalho estudou-se um método de purificação de ricina, após processo de extração de proteínas utilizando precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, em cinco intervalos de saturação: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-90%, a fim de se observar em qual destes ocorre a precipitação isolada de ricina e avaliar a quantidade da proteína precipitada. Após a extração das proteínas e precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, as amostras foram submetidas ao método de Bradford e eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante. Segundo o método de Bradford verificou-se que 20g de torta apresentou 87,894mg de proteína. Verificou-se que em todos os intervalos de saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, houve precipitação de ricina e outra (s) proteína(s). Os percentuais de precipitação de proteína nos intervalos de: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-90% foram 2,48%, 38,31%, 47,55%, 11,21%, 0,45%, respectivamente. Assim, conclui-se que não foi possível isolar a ricina adotando o método de purificação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e que a maior quantidade de proteína precipitada correspondeu ao intervalo de 40-60% de saturação.

Palavras-chaves: ricina, torta de mamona, sulfato de amônio, purificação.

INTRODUÇÃO

A precipitação de proteínas com sulfato de amônio é conhecida por ser útil na concentração de soluções diluídas de proteína e no fracionamento de mistura de proteínas.

O mecanismo de precipitação de proteínas com sais decorre de um aumento da força iônica do sistema. Quando pequenas quantidades de sal são adicionadas à solução contendo proteínas, ocorre uma interação destas com as cargas provenientes da dissociação do sal e diminuição da interação inter-proteínas, aumentando a solubilidade no meio aquoso. Porém, em condições de elevada força iônica, decorrente da adição de grandes quantidades de sal, verifica-se um efeito oposto. As moléculas de água, interagem mais fortemente com os íons provenientes da dissociação do sal, promovendo desta forma, a desidratação das proteínas. Durante esse processo, a interação inter-proteínas se torna mais forte, diminuindo a solubilidade das mesmas em meio aquoso e, conseqüentemente, a ocorrência de precipitação das proteínas. Esse processo é também conhecido por "salting-out".

A precipitação de proteínas pelo gradativo aumento da concentração de sais é um processo muito importante para a separação de misturas complexas de proteínas, uma vez que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada proteína. O sulfato de amônio tem sido o sal



mais comumente utilizado nos ensaios de precipitação de proteína por algumas de suas características como a alta solubilidade, baixo custo e baixa toxicidade.

A torta de mamona possui grande quantidade de proteínas, fato que tem incentivado o destino da mesma para ração. No entanto, quando o interesse é isolar um único tipo de proteína da torta de mamona recorre-se a métodos de alto custo como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Neste sentido, a precipitação de proteínas com sulfato de amônio é uma alternativa de baixo custo e amplamente empregada para a purificação de um tipo de proteína de interesse (BACILA, 2001; FENGXIA et al., 2008). A ricina é uma proteína de alta toxicidade presente na torta de mamona e representa foco de estudo de inúmeras pesquisas na área da saúde (NA et al., 2004) e agrária (ANANDAN, et al., 2005) e que talvez possa ser isolada pelo método da saturação da solução com sulfato de amônio.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a possibilidade de precipitação isolada de ricina e através do método de Bradford quantificá-la, a fim de desenvolver um método simples de purificação da ricina e conhecer a quantidade de ricina possível de ser obtida.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a extração da ricina, 20 g de torta de mamona obtida a partir de sementes da cultivar Nordeste concedidas pela Embrapa Algodão, foram homogeneizadas em solução de NaCl 0,15 mol L⁻¹ por 30 minutos. Posteriormente, centrifugou-se a solução a 32981 x g por 20 minutos em temperatura de 4° C e separou-se o sobrenadante (S₁). O resíduo foi novamente homogeneizado em solução salina e centrifugado nas mesmas condições anteriores para a separação do sobrenadante (S₂). Misturaram-se os dois sobrenadantes, obtendo-se o sobrenadante total (S_t). Foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada sobrenadante para o método de Bradford (1976).

O sobrenadante total foi submetido à precipitação com sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, empregando cinco intervalos de saturação: 0-20% (m/m), 20-40% (m/m), 40-60% (m/m), 60-80% (m/m), 80-90% (m/m) de acordo com Scopes (1993). A cada saturação com sulfato de amônio a solução foi deixada em descanso por uma noite (overnight), centrifugada a 32981 x g por 20 minutos e coletado o precipitado. Os precipitados foram solubilizados em NaCl 0,15 mol L⁻¹, dialisados contra água destilada e submetidos ao método de Bradford (1976).

Realizou-se eletroforese das amostras dos precipitados de cada intervalo de saturação em gel de poliacrilamida a 12,5%, sob condições não desnaturantes, por 1 hora e 40 minutos aplicando corrente contínua de 20 mA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo o método de Bradford (1976) o sobrenadante total obtido a partir de 20 g de torta de mamona apresentou concentração de proteínas de $58,59 \pm 0,2378 \mu\text{g} / 100\mu\text{L}$, totalizando cerca de 87,89 mg de proteína. Na Tabela 1, verificou-se que os intervalos de saturação de 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-90% demonstraram os seguintes percentuais de precipitação de proteínas: 2,48%, 38,31%, 47,55%, 11,21% e 0,45%, respectivamente.

Observa-se na Figura 1 que a ricina precipitou em todos os intervalos de saturação, embora na figura o intervalo de saturação com sulfato de amônio de 20-40% não esteja bem nítida a presença da banda correspondente a ricina, 66 kDa, em virtude da diluição adotada. No intervalo de 80-90% a banda correspondente a ricina foi visualizada fracamente, devido a mesma ter precipitado em maior quantidade nos intervalos de saturação anteriores.

CONCLUSÕES

Não foi possível isolar a ricina pelo método de saturação com sulfato de amônio nos intervalos estudados.

Maior quantidade de proteínas precipitadas foi verificada no intervalo de saturação com sulfato de amônio de 40-60%.

* Os autores agradecem a FINEP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANANDAN, S.; KUMAR, G. K. 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.
- BACILA, M. A Presença da galactoquinase em tecidos animais. **Braz. Arch. Biol. Technol.** p. 293-297. 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p.248-254, 1976.

FENGXIA, L.; MEI, L.; ZHAOXIN, L.; XIAOMEI, B.; HAIZHEN, Z.; YI, W. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5938–5941. 2008.

NA, D. H.; YOUN, Y. S.; LEE, K. C. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for monitoring and optimization of site-specific PEGylation of ricin A-chain. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, v. 18, p. 2185–2189. 2004.

Tabela 1. Percentuais de proteína precipitada nos intervalos de saturação de 0-20%; 20-40%; 40-60%, 60-80%, 80-90% com sulfato de amônio.

Grau de saturação	Proteína Obtida (%)
0-20%	2,48
20-40%	38,31
40-60%	47,55
60-80%	11,21
80-90%	0,45

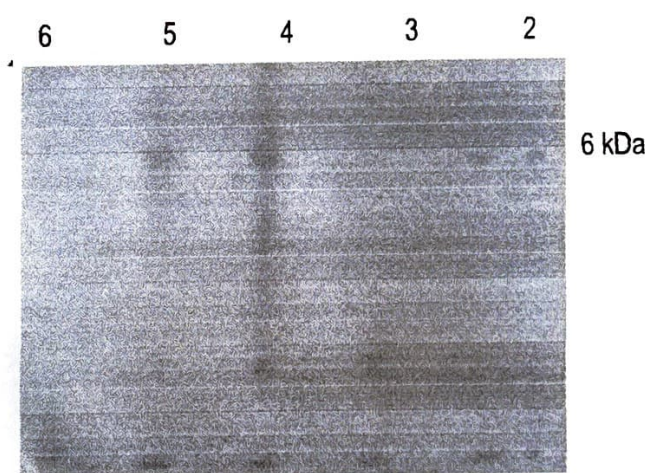
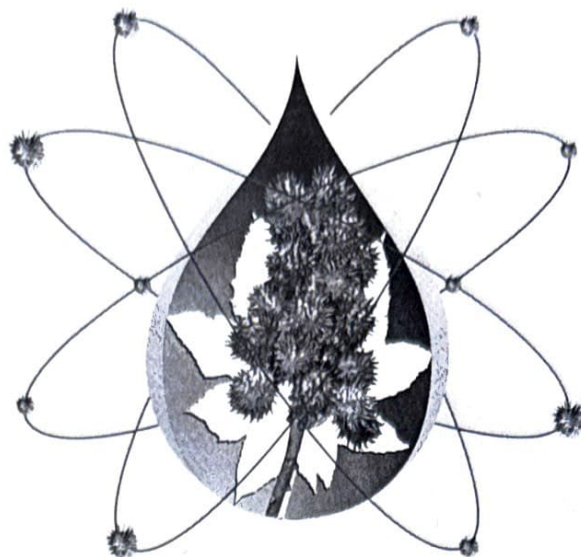


Figura 1. Eletroforese de gel de poliacrilamida 12,5% em condições não desnaturantes de BSA-marcador (1) e amostras dos percentuais de proteína precipitada nos intervalos de saturação de 0-20% (2); 20-40% (3); 40-60% (4); 60-80%(5); 80-90%(6), com sulfato de amônio.



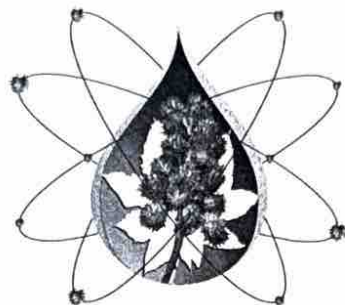
**CONGRESSO BRASILEIRO DE
MAMONA
ENERGIA E RICOINQUÍMICA**

Salvador : SEAGRI : Embargo Algodão , 2008.

04 A 07 DE AGOSTO DE 2008

Bahia Othon Palace Hotel
Salvador - BA





III CONGRESSO BRASILEIRO DE **MAMONA** ENERGIA E RICINOQUÍMICA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que Mayrla Rocha Lima, Vitor Paulo Andrade da Silva, Roselayne Ferro Furtado, Carlúcio Roberto Alves, Maria Izabel Florindo Guedes, Rosa Amália Fireman Dutra.

participou do III CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, realizado no Bahia Othon Palace Hotel no período de 04 a 07 de Agosto de 2008, na qualidade de **autores do trabalho: PURIFICAÇÃO DE RICINA A PARTIR DE SATURAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIA.**

Salvador, 07 de Agosto de 2008


Geraldo Simões de Oliveira
Presidente do III CBM


Odilon Reny Ribeiro Ferreira da Silva
Coordenador da Comissão Científica do III CBM

Realização:

Embrapa



TERRA DE TODOS NÓS
Secretaria da Agricultura
Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação
Secretaria da Indústria, Comércio e Mineração
Secretaria do Meio Ambiente