

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio
Anais do V Workshop 2009**

**Odílio Benedito Garrido de Assis
Wilson Tadeu Lopes da Silva
Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Editores**

**Embrapa Instrumentação Agropecuária
São Carlos, SP
2009**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
<http://www.cnpdia.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Capa: Manoela Campos e Valentim Monzane
Imagem da Capa: Imagem de AFM de nanofibra de celulose - Rubens Bernardes Filho
Editoração eletrônica: Manoela Campos e Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2009): tiragem 200

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação Agropecuária**

Anais do V Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao
agronegócio 2009 - São Carlos: Embrapa Instrumentação
Agropecuária, 2009.

Irregular
ISSN: 2175-8395

1. Nanotecnologia - Evento. I. Assis, Odílio Benedito Garrido de.
II. Silva, Wilson Tadeu Lopes da. III. Mattoso, Luiz Henrique
Capparelli. IV. Embrapa Instrumentação Agropecuária

© Embrapa 2009



DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE ELETROQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE RICINA

Roselayne Ferro Furtado (PQ)¹, Vitor Paulo Andrade da Silva (IC)², João Bosco de Carvalho (IC)², Maria Izabel Florindo Guedes (PQ)³, Carlucio Roberto Alves (PQ)², Luiz Henrique Capparelli Mattoso (PQ)⁴, Juliano Elvis de Oliveira (PG)⁴, Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira (PQ)⁵, Rosa Fireman Dutra (PQ)⁶

¹Embrapa Agroindústria Tropical, CNPAT, Fortaleza – CE, roselayne@cnpat.embrapa.br

²Departamento de Química, UECE, Fortaleza - CE

³Departamento de Nutrição, UECE, Fortaleza - CE

⁴Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio, CNDPIA, São Carlos-SP

⁵Departamento de Farmácia, UNIFOR, Fortaleza-CE

⁶Departamento de Ciências Biológicas, UPE, Recife - PE

Projeto Componente: PC 2

Plano de Ação: 01.05.1.01.02.02

Resumo

A torta de mamona é um subproduto do biodiesel gerado em grande quantidade, com potencial uso na forma de ração. Um dos principais empecilhos para esta prática de agregação de valor é a presença da ricina, uma proteína letal a animais. Por este motivo torna-se imprescindível a análise da torta de mamona após processo de destoxificação. Para tanto, um biossensor eletroquímico está sendo desenvolvido para detecção da proteína. Neste trabalho são demonstrados alguns resultados relacionados ao efeito da concentração do mediador na resposta eletroquímica e avaliação da estabilidade do biossensor quanto ao número de ciclos de varredura. Os resultados indicaram que o biossensor tem-se mostrado estável para varreduras entre potenciais de -600 a 600 mV e que a resposta pode variar de acordo com a concentração do mediador.

Palavras-chave: biossensor, ricina, detecção.

Introdução

A ricina, presente na torta de mamona (OLSNES, 2004), é uma proteína inativadora de ribossomos (RIPs). A torta de mamona, subproduto do biodiesel, tem elevado valor nutritivo com potencial uso na forma de ração (BELTRAO, 2003). Contudo, para ser usada, esta precisa ser submetida a processo de destoxificação a fim de promover a desnaturação da ricina. Os biossensores são dispositivos bio-eletrônicos que podem ser utilizados na detecção de contaminantes químicos e biológicos. Neste contexto, esses representam uma alternativa promissora como método de detecção de

ricina em torta de mamona submetida à destoxificação. A aplicação de biossensores eletroquímicos como método de análise oferece diversas vantagens: o baixo custo, resposta rápida e alta sensibilidade. Neste trabalho são demonstrados alguns resultados relacionados ao efeito da concentração do mediador na resposta eletroquímica e estabilidade do biossensor quanto ao número de ciclos de varredura.

Materiais e métodos

A proteína foi obtida a partir de sementes de mamona da cultivar Nordestina desenvolvida pela Embrapa Algodão. Foram realizadas cromatografias

de afinidade para purificação da lectina segundo metodologia de Appukutan (1977). Os anticorpos anti-ricina foram produzidos em coelhos de acordo com metodologia de Furtado et al. (2008) e posteriormente, purificados e liofilizados para uso no biossensor amperométrico.

Antes de cada procedimento de formação do filme com moléculas bioativas, o eletrodo de trabalho foi submetido à limpeza superficial química com polimento (alumina 0,03 μm) e solução piranha (H_2O_2 e H_2SO_4 - 1:3) com conseqüente banho ultrassônico em água deionizada.

O eletrodo de trabalho, superfície de ouro (área geométrica de 0,05 cm^2), foi modificado com filme de molécula bioativa para o reconhecimento de ricina nativa. O eletrodo foi deixado em contato com solução de ricina 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ por uma hora e posteriormente, em contato com solução de anticorpo anti-ricina conjugado a peroxidase por duas horas. As medidas foram realizadas em célula eletroquímica de 10 mL contendo solução tampão fosfato pH 6,5, 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ de H_2O_2 e 60 $\mu\text{L L}^{-1}$ de hidroquinona. Antes de cada medida voltamétrica, as soluções foram desaeradas na presença de N_2 por 15 minutos

Para a realização das medidas eletroquímicas foram utilizados eletrodos auxiliar de fio de platina (área geométrica de 1,0 cm^2) e de referência Ag/AgCl. As medidas foram obtidas em Autolab Potenciostato/Galvanostato PGSTAT 302N.

Resultados e discussão

A estabilidade das correntes de pico após 50 ciclos de varredura foi bastante satisfatória, indicando que a imobilização do filme não é lixiviada da superfície do ouro facilmente (Fig. 1).

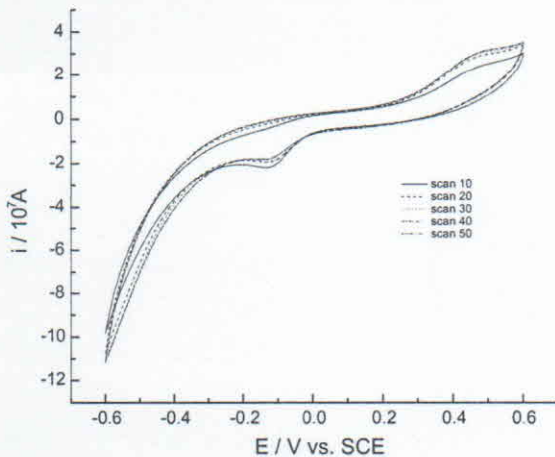


Fig. 1. Voltamogramas cíclicos do biossensor após detecção da ricina em eletrodo de ouro modificado; faixa de potencial: -0,6 a 0,6 V; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

A resposta do biossensor frente a diferentes concentrações da hidroquinona foi investigada por

voltametria cíclica. Como pode ser observado na Figura 2, a corrente de pico de redução aumenta significativamente com o incremento da concentração da hidroquinona. O mesmo fato não foi verificado para o biossensor não conjugado a peroxidase (controle) (Fig. 3). Este fato é decorrente da enzima peroxidase catalisar a oxidação da hidroquinona para quinona em presença de peróxido de hidrogênio e, posteriormente, a quinona formada é reduzida eletroquimicamente na superfície do biossensor (OLIVEIRA e VIEIRA, 2006) em potencial de cerca de -100 mV.

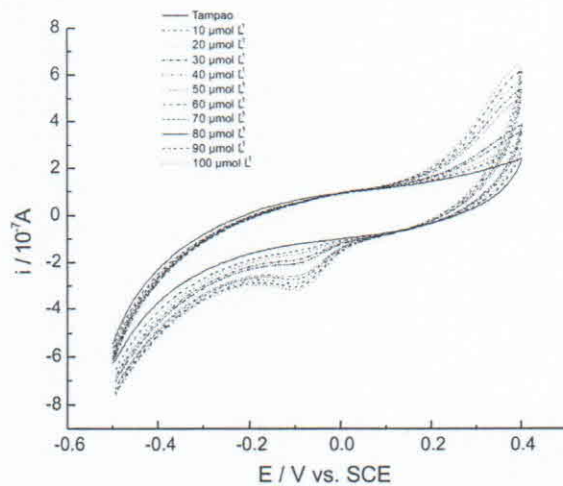


Fig. 2. Voltamogramas cíclicos do biossensor em eletrodo de ouro modificado em diferentes concentrações de hidroquinona em 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 ; faixa de potencial: -0,6 a 0,6 V; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

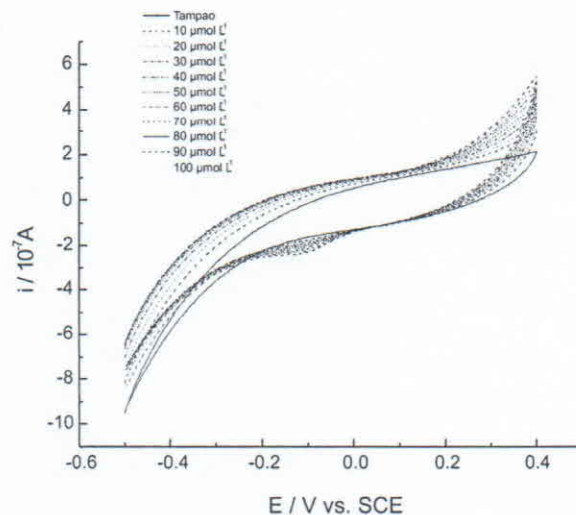


Fig. 3. Voltamogramas cíclicos do biossensor sem anticorpo conjugado com peroxidase em eletrodo de ouro modificado em diferentes concentrações de hidroquinona em 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 ; faixa de potencial: -0,6 a 0,6 V; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

Conclusões

Os resultados indicaram que a etapa de formação do filme para reconhecimento da ricina e metodologia de produção dos anticorpos anti-ricina conjugados a peroxidase estão sendo bastante satisfatórios. Os ensaios com o biossensor continuarão de modo a determinar sua sensibilidade e outros parâmetros de otimização, assim como sua validação em torta de mamona.

Agradecimentos

FINEP/MCT, EMBRAPA, CNPq.

Referências

- APPUKUTTAN, P. S.; SUROLLA, A; BACHHAWAT, B. K. Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, New Delhi, v. 14, n. 4, p. 382-384, 1977.
- BELTRÃO, N. E. M. **Informações sobre o biodiesel, em especial feito com o óleo de mamona**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 3 p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 177).
- OLSNES, S. The history of ricin, abrin, and related toxins. **Toxicon**, Elmsford, v. 44, p. 361-370, 2004.
- OLIVEIRA, R. W. Z. DE; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 932-939. 2006.