



PURIFICAÇÃO DE LECTINAS DE TORTA DE MAMONA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DE MATRIZES DE GOMA DE GUAR E XILOGLUCANA. ¹

Vitor Paulo Andrade da Silva¹; Roselayne Ferro Furtado²; João Bosco de Carvalho¹; Gardenny Ribeiro Pimenta¹; Carlucio Roberto Alves¹; Renato de Azeredo Moreira³; Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira³; Rosa Amalia Fireman Dutra⁴.

¹Universidade Estadual do Ceará – vitorvolt@hotmail.com; ²Embrapa Agroindústria Tropical; ³Universidade de Fortaleza; ⁴Universidade Estadual de Pernambuco.

RESUMO – As lectinas são proteínas que possuem sítios ativos para carboidratos. Dentre elas, destacamos a ricina e a *ricinus aglutinina*, que são encontradas na torta de mamona, um dos principais subprodutos do beneficiamento da semente de mamona na produção do biodiesel. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de uso das matrizes de xiloglucana e de goma de guar na purificação das lectinas presentes na torta de mamona. Para isso, sementes de mamona passaram por processo de extração do óleo e centrifugação com solução de cloreto de sódio 0,15 molar. Posteriormente, submeteu-se uma alíquota do sobrenadante a coluna de cromatografia de afinidade com matriz de xiloglucana e outra alíquota a coluna com matriz de goma de guar. Obteve-se um cromatograma para cada coluna. Alíquotas do sobrenadante e do material coletado das colunas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% SDS-Page e teste de hemaglutinação. Os resultados revelaram bandas com peso molecular em torno de 32 e 34 kDa para amostras coletadas de ambas as colunas e alta atividade hemaglutinante. As matrizes de cromatografia de xiloglucana e de goma de guar permitiram o isolamento de RCA 60 e RCA 120 a partir de torta de mamona.

Palavras-chave – Gomas naturais, ricina, *ricinus aglutinina*.

INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas que possuem a capacidade de se ligarem especificamente a carboidratos e formarem ligações reversíveis com os mesmos. Elas são classificadas segundo a sua estrutura quaternária e a especificidade por monossacarídeos. As lectinas ligantes de galactose destacam-se entre as lectinas de maior interesse, tendo em vista que apresentam muitas das propriedades biológicas mais importantes das lectinas (MOREIRA, 2002). Considerando a semente de mamona, destacam-se as lectinas ricina (RCA 60) e a *ricinus aglutinina* (RCA 120). A ricina é nociva a humanos, animais e alguns invertebrados. Trata-se de uma glicoproteína constituída de duas cadeias

¹ Embrapa Agroindústria Tropical, CNPq.





unidas por uma ligação de dissulfeto: a cadeia A (cerca de 32 kDa) é citotóxica, inibidora da síntese protéica, e a cadeia B (cerca de 34 kDa) se liga a carboidratos presentes na célula (LORD, 1994). A *ricinus aglutinina* não possui atividade citotóxica direta, mas possui considerável capacidade hemaglutinante. Essa consiste de dois grupos de cadeia A e B, formando um tetrâmero (cerca de 120 kDa) (HOFFMAN, L. V. et al, 2007). Essas duas lectinas permanecem na torta de mamona, subproduto gerado em grande quantidade na produção do biodiesel e oferecem risco a animais alimentados com esse resíduo sem destoxificação.

Na literatura, métodos de purificação dessas proteínas, em geral, são laboriosos e envolvem muitas etapas (SILVA, 1974; SANTANA, 2004). Um método simples e barato para purificação das lectinas RCA 60 e RCA 120 seria empregando matrizes cromatográficas de gomas naturais contendo resíduos de galactose. A xiloglucana é um polissacarídeo encontrado em sementes de jatobá caracterizados por uma cadeia principal de (1→4)- β-D-galactopiranosose e cadeias laterais contendo unidades de α-D-xylopiranosil e β-D-galactopiranosil(1→2)-α-D-xilopiranosil, ligados (1→6) à cadeia principal (Lima et al., 1995). A goma de guar é uma galactomanana formada por cadeias lineares de unidades de D-manopiranosil ligadas entre si por ligações β(1→4) e unidades de D-galactopiranosil, ligadas entre si por ligações α(1→6) (HATAKEYAMA et al., 1989).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de uso das matrizes de xiloglucana e de goma de guar na purificação das lectinas presentes na torta de mamona.

METODOLOGIA

As lectinas foram obtidas a partir de amostra de sementes de mamona da cultivar Nordestina conseguida junto a Embrapa Algodão. Para a obtenção da torta de mamona, as sementes foram descascadas, trituradas e prensadas para a remoção do óleo. A fim de remover o óleo residual, a torta foi deixada 24 horas em repouso com hexano. Após evaporação do solvente, a torta de mamona foi homogeneizada em solução de cloreto de sódio 0,15 molar na proporção de 1:10 com agitador magnético por 30 minutos e centrifugada a 4 °C, 33.000 x g, por 20 minutos para separação do sobrenadante.

Para a purificação das lectinas foram utilizadas duas colunas de cromatografia de afinidade, uma de matriz de xiloglucana e a outra de goma de guar preparadas de acordo com Appukutan et al. (1977). Uma alíquota do sobrenadante foi submetida à coluna de xiloglucana e outra à coluna de goma de guar. Em ambas, a amostra foi deixada em contato com a fase estacionária repousando por uma





hora. Para a retirada das moléculas sem afinidade, foi feita a lavagem das colunas com solução de cloreto de sódio 0,15 molar. A eluição das proteínas nas colunas se procedeu com solução de glicina 0,1 molar e cloreto de sódio a 0,15 molar a pH 2,6. As frações foram coletadas em volume de 2 mL, e até que a absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda igual a 280 nm fosse nula. A vazão utilizada na etapa de lavagem e eluição das colunas foi de aproximadamente 0,8 mL/min. Posteriormente, o material foi liofilizado e armazenado em freezer a -20°C.

Amostras do material liofilizado foram analisadas por eletroforese em gel de poliácridamida 12% sob condições desnaturantes. Verificou-se também a atividade hemaglutinante do material obtido da coluna de xiloglucana e da coluna de goma de guar. O ensaio de hemaglutinação foi realizado em placas de microtitulação. Cada poço foi preenchido com 50 µL de solução salina, 50 µL das amostras e 50 µL de suspensão de eritrócitos a 2%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra o comportamento das frações eluídas a partir da coluna com matriz de xiloglucana e a Figura 2 para as frações eluídas a partir da coluna de goma de guar. A imagem do gel de poliácridamida 12% de frações coletadas da coluna de xiloglucana e da goma de guar (Figura 3) revela bandas com peso molecular em torno de 32 e 34 kDa. Tais pesos moleculares correspondem aos mencionados na literatura, respectivamente, das cadeias A e B, formadoras da ricina e *ricinus aglutinina*. Sendo assim, apesar da diferença anomérica existente entre as matrizes cromatográficas, (1→2)- β-D-galactopiranosil para a xiloglucana e (1→6)- α-D-galactopiranosil para a goma de guar, as duas matrizes podem ser usadas para purificar as referidas lectinas. Verificou-se atividade hemaglutinante das lectinas até a concentração testada de 0,9 µg mL⁻¹.

CONCLUSÃO

As matrizes de cromatografia de xiloglucana e de goma de guar permitiram o isolamento de RCA 60 e RCA 120 a partir de torta de mamona, e representam um método rápido e de baixo custo para a purificação dessas lectinas.





REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPUKUTTAN, P. S., SUROLLA, A. BACHHAWAT, B. K. Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. *Indian J. Biochem. Biophys.* v. 14, p.382-384. 1977.

FURTADO, R. F.;GUEDES, M.I.F.; ALVES, C.R.; MOREIRA, A.C.O.M.; DUTRA, R.A.F. Produção de anticorpos policlonais anti-ricina: metodologia científica. Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2008.17 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 116).

HATAKEYAMA, T. et al. The interaction of castor bean lectins with galactomannan. *Agric. Biol. Chem.* n. 53. p. 853-854. 1988.

HOFFMAN, L.V. et. al. Ricina: Um Impasse para Utilização da Torta de Mamona e suas Aplicações. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007. p.25 (Embrapa Algodão. Documentos, 174).

LORD, J. M., ROBERTS L. M., ROBERTUS J. D. Ricin-structure, mode of action, and some current applications, *FASEB J.* v.8 p. 201–208. 1994.

MOREIRA, R.A. Desenvolvimento de um novo método para o isolamento de lectinas ligantes de galactose, por cromatografia de afinidade. In: VI Reunião Regional da SBBq, 2002, Fortaleza: Anais da VI Reunião Regional da SBBq, p. 1-9.

MUTHANNA NISCHAL AMMATANDA, B.E. Extraction of ricin from castor. 69p. 1999 (Tese) Texas Tech University <http://etd.lib.ttu.edu/theses/available/etd-09152009-31295014323934/unrestricted/31295014323934.pdf>

SANTANA, Marcos Aurélio. Isolamento, propriedades biológicas e estudos biológicos de lectina de sementes da *Macrotyloma axillare* (E. Meyer). 2004. 118 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Ouro Preto, 2004.

SILVA, E.P. Estudo sobre a purificação e inativação da ricina. 1974. 97p. Dissertação de Mestrado. UFRJ, Rio de Janeiro.



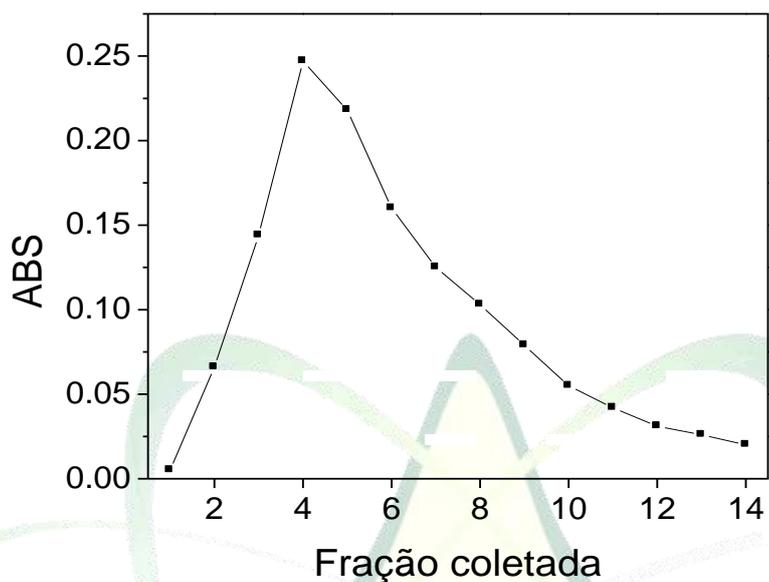


Figura 16 – Comportamento das frações eluidas a partir da coluna com matriz de xiloglucana. Absorbância medida em espectrofotômetro em comprimento de onda igual a 280 nm.

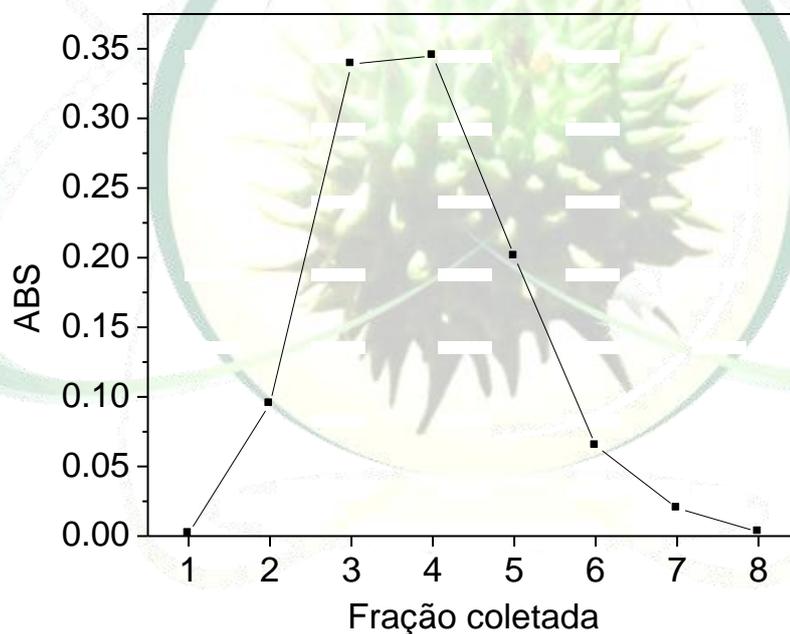


Figura 17 – Comportamento das frações eluidas a partir da coluna de matriz de goma de guar. Absorbância medida em espectrofotômetro em comprimento de onda igual a 280 nm.



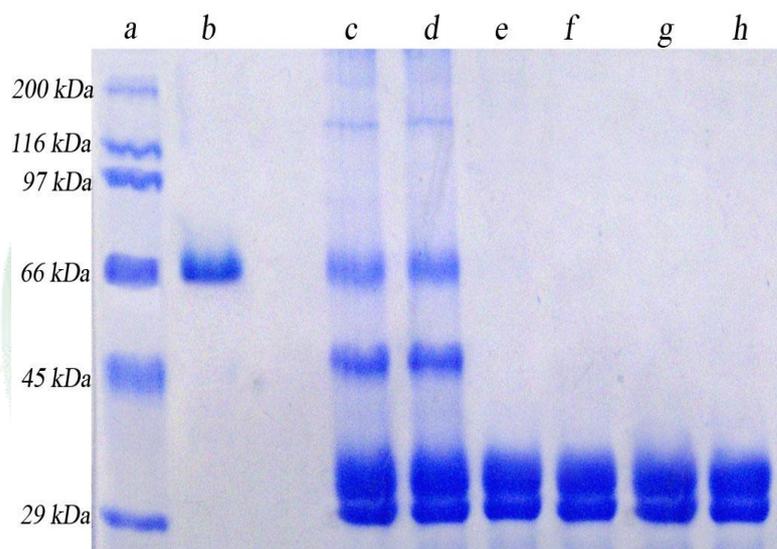


Figura 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% SDS-Page: marcador molecular (a), BSA (b), torta de mamona (c) e (d), frações eluídas da coluna de xiloglucana (e,f), frações eluídas da coluna de goma de guar (g, h).

