

## Influência da concentração de NaCl e pH na extração de ricina em torta de mamona (*Ricinus communis* L.) e sua caracterização por eletroforese

Influence of NaCl and pH concentration on the extraction of ricin in castor bean (*Ricinus communis* L.) and its characterization by electrophoresis

Bárbara Amorim Silva<sup>I</sup> Marília Penteado Stephan<sup>II\*</sup> Maria Gabriela Bello Koblitz<sup>III</sup>  
José Luís Ramirez Ascheri<sup>II</sup>

### RESUMO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa de alto valor econômico pelo fato de apresentar um mercado bem definido para o óleo extraído de suas sementes. A torta, que é um resíduo desta extração, se destaca pelo alto teor em proteínas. Dentre as proteínas encontradas na torta destaca-se a ricina, uma citotoxina, que inviabiliza sua utilização como fonte protéica alternativa para alimentação animal. O presente trabalho tem como objetivo identificar um melhor tratamento experimental para a extração de ricina da torta de mamona, visando futuros estudos de perda de integridade da ricina, o que garantiria a inocuidade do produto. Para tanto, buscou-se identificar a solução de maior capacidade de extração de proteínas, empregando a metodologia de superfície de resposta. Um delineamento composto central rotacional foi elaborado a fim de verificar o melhor pH e concentração de NaCl para a extração. Dos cinco diferentes valores de pH (4,0; 4,6; 6,0; 7,4; 8,0) e concentração de NaCl (0,0M; 0,3M; 1,0M; 1,7M; 2,0M) utilizados, o tratamento associando fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,7M pH 7,4 foi escolhido como o melhor. A concentração de proteína extraída neste tratamento chegou a valores quatro vezes maiores que o encontrado no de mínima extração de proteína. Pela evidenciação do gel de eletroforese não houve extração preferencial de ricina nos tratamentos testados, entretanto etapas de purificação usando diálise e precipitação com sulfato de amônio, permitiram uma evidenciação melhor das duas cadeias polipeptídicas de ricina.

**Palavras-chave:** pH, NaCl, eletroforese, citotoxina, superfície de resposta.

### ABSTRACT

Castor bean (*Ricinus communis* L.) is an oilseed crop of high economic value due to the fact of presenting a clearly defined market for the oil extracted from its seeds. Castor cake, which is a residue of oil extraction, is at the moment receiving special attention because of its high protein content. However, among the proteins found in this cake it is observed the presence of ricin, a cytotoxin, which turns this seed dangerous to be used as an alternative protein source for animal feed. The present research has the objective of identifying the best experimental treatment for extraction of ricin from castor cake, with the aim of future studies of loss of ricin integrity, which would ensure the safety of the product. With this aim, it was initiated the search for a buffer of higher capacity of proteins extraction, using the response surface methodology. A central composite design was developed in order to determine the best pH and NaCl concentration for extraction. Of the five different pH values (4.0, 4.6, 6.0, 7.4, 8.0) and NaCl (0.0M, 0.3M, 1.0M, 1.7M, 2.0M) used, the treatment containing 0.2M potassium phosphate / 1.7M NaCl pH 7.4 was chosen as the best. The amount of protein extracted in this treatment reached values four times larger than the minimum found in other treatment studied. The electrophoresis analysis showed that there was no preferential extraction of ricin in the treatments; however purification steps using dialysis and precipitation with ammonium sulfate led to a better resolution of the two polypeptide chains presents in ricin.

**Key words:** pH, NaCl, electrophoresis, cytotoxin, surface response.

<sup>I</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>II</sup>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agroindústria de Alimentos (CTAA), 23020-470, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: stephan@ctaa.embrapa.br. \*Autor para correspondência.

<sup>III</sup>Escola de Nutrição, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

## INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa de alto valor econômico pelo fato de apresentar um mercado bem definido para o óleo extraído de suas sementes. Atualmente um grande interesse tem sido dado à torta, resíduo desta extração, por seu alto teor de proteínas (GODOY et al., 2009). Dentre as proteínas encontradas na torta destaca-se a ricina, uma citotoxina, que inviabiliza sua utilização como fonte protéica alternativa para alimentação animal (ANANDAN et al., 2005; STEPHAN et al., 2008).

A ricina é uma proteína heterodimérica constituída por duas cadeias, A e B, ligadas covalentemente por pontes de dissulfeto. Esta proteína pertence à família das proteínas inibidoras de ribossomo (RIPs) do tipo II (OLSNES, 2004; LORD et al., 1994; MONZINGO et al., 1993). Na sua forma enzimática ativa a ricina tem como mecanismo de ação atuações diferenciadas das cadeias A (32kDa) e B (34kD). A cadeia A da ricina (32KDa) é uma enzima com atividade N-glicosídica (LORD et al., 1994) que permite a remoção de um resíduo de adenina no *loop* de rRNA (RNA ribossomal 28s) e causa a inativação específica e reversível dos ribossomos eucarióticos, bloqueando a síntese de proteína. Este ciclo está envolvido na ligação da cadeia A na fase de alongamento da cadeia polipeptídica, modificando estruturalmente os ribossomos e tornando-os incapazes de realizar a síntese de proteínas (ENDO et al., 1991). A cadeia B (RTB cerca de 34KDa) é uma lectina (LORD, 1994) que se liga à galactose ou à N-acetilgalactosamina das glicoproteínas da superfície da célula promovendo, desta maneira, a endocitose da toxina no citosol. (ENDO & TSURUGI, 1987). A toxina é potencialmente letal para os seres humanos se inalada, ingerida ou injetada (AUDI et al., 2005). Alguns trabalhos científicos utilizaram a técnica de eletroforese para detectar a presença de ricina, utilizando colunas de amido, eletroforese em papel e gel de acrilamida (MACKINNON & ALDERTON, 2000). Esta técnica é semiquantitativa, pois permite ter uma noção da massa molecular da proteína, embora não forneça valores exatos de concentração que possam ser analisados. Trata-se de uma técnica muito útil e de grande sensibilidade para estudos com ricina (GODOY et al.,

2009). A utilização desta técnica para futuros estudos de perda de integridade protéica é uma realidade e deve ser conduzida utilizando tampões e soluções adequadas e de melhor capacidade de extração da ricina.

## MATERIAL E MÉTODOS

A cultivar de mamona utilizada neste trabalho foi a ‘Paraguaçu’, cedida pela Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, Brasil. As sementes foram prensadas em prensa *Expeller* para obtenção da torta. A torta desengordurada foi moída em moinho de disco e faca da marca *Perten 3600* (1680rpm) de peneira de 0,8mm. Para estudo do teor de proteína extraída da torta estabeleceu-se um delineamento do tipo composto central rotacional de 2ª ordem (BOX et al., 1978). O modelo de regressão utilizado foi de superfície de resposta com objetivo de estimar os efeitos simples (lineares e quadráticos) e/ou interações que contribuíram para a predição da resposta do experimento. A visualização do comportamento desses efeitos foi realizada através da representação gráfica. Os parâmetros do delineamento estabelecidos como variáveis independentes foram estudadas em cinco níveis codificados com: (- $\alpha$  -1, 0, +1 e + $\alpha$ ) (Tabela 1). Para a análise estatística dos resultados foi utilizado *software* Statistica 7.0.

A extração da proteína foi realizada utilizando 5g de torta desengordurada e 30ml da solução tampão como descrito na tabela 2 (Tratamento 1-12). As amostras foram homogeneizadas em blender 34BL97-7012 (*Waring Commercial, New Harford, USA*) durante dois minutos e posteriormente filtradas em filtro de algodão. Este filtrado foi submetido à centrifugação em uma centrífuga da marca *Thermo* modelo *multifuge 3L-R* a 4000rpm, sob a temperatura de 4°C e durante 15 minutos. A análise colorimétrica de proteína extraída no sobrenadante foi feita utilizando o método de

Tabela 1 - Delineamento completo do desenho experimental.

Variável	-----Nível-----				
	-1,414	-1	0	+1	+1,414
pH	4,0	4,6	6,0	7,4	8,0
NaCl(M)	0,0	0,3	1,0	1,7	2,0

Tabela 2 - Delineamento completo do desenho experimental .

Tratamento	-----Variável-----		Proteína g 100g <sup>-1</sup>
	pH	NaCl	
1 Acetato de sódio 0,2M/NaCl 0,3M pH 4,6	-1	-1	1,657
2 Acetato de sódio 0,2M/NaCl 1,7M pH 4,6	-1	+1	2,657
3 Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 0,3M pH 7,4	+1	-1	4,755
4 Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,7M pH 7,4	+1	+1	6,735
5 Acetato de sódio 0,2M/NaCl 1,0M pH 4,0	-1,414	0	1,662
6 Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,0M pH 8,0	+1,414	0	5,172
7 Fosfato de potássio 0,2M pH 6,0	0	+1,414	1,844
8 Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 2,0M pH 6,0	0	-1,414	6,743
9 Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,0M pH 6,0	0	0	6,303
10 Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,0M pH 6,0	0	0	6,989
11 Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,0M pH 6,0	0	0	6,092
12 Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,0M pH 6,0	0	0	6,119

Bradford (1976) e um espectrofotômetro da marca *Analytikjena* modelo *Specord 210* no comprimento de onda de 595nm. Para a análise de cadeia polipeptídica em eletroforese (SDS-PAGE) foi utilizado o sistema de eletroforese da marca *Biorad* e a metodologia de preparação dos géis descrita por LAEMMLI (1970). Para o gel de corrida foi utilizada acrilamida na concentração de 15% e de 4% no gel de aplicação da amostra. Visando uma análise comparativa do perfil protéico dos extratos em eletroforese (SDS-PAGE), igualou-se a quantidade de proteínas dos 12 diferentes extratos utilizando-se a seguinte estratégia: precipitação das proteínas com sulfato de amônio 90%, solubilização dos *pellets* de modo a conter concentrações similares de proteínas nos 12 diferentes tratamentos. Para a etapa de purificação da amostra foram utilizadas duas estratégias: a) diálise do extrato, contra tampão fosfato pH 7,4; b) precipitação das proteínas do extrato com sulfato de amônio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 90% e posterior solubilização do material em tampão fosfato pH 7,4. Todas as corridas eletroforéticas foram realizadas durante sete horas sob uma tensão de 100V. As proteínas dos géis foram coradas *overnight* com uma solução de ácido acético 10% (v/v), álcool metílico 40% (v/v) e *Coomassie Brilliant Blue R250* 1% (v/v). O gel foi descorado em solução contendo 10% (v/v) de ácido acético e 40% (v/v) de álcool metílico, renovando a solução a cada 30 minutos, até obtenção de revelação nítida. O cálculo da massa molecular das frações protéicas foi efetuado mediante a construção das

curvas padrão, com massas moleculares dos marcadores contra as respectivas distâncias percorridas no gel. O marcador de massa molecular utilizado foi do fabricante *Biorad* com a seguinte composição: a) marcador de alta massa molecular: miosina, 204,44kDa; 116,58kDa, β-galactosidase; 98,08kDa, albumina de soro bovino; 47,11kDa, ovoalbumina. b) marcador de baixa massa molecular: 103,03kDa, fosforilase B; 80,66kDa, albumina de soro bovino; 49,49kDa, ovoalbumina; 36,54kDa, anidrase carbônica; 28,83kDa, inibidor de tripsina de soja; 19,44kDa lisoenzima.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de proteínas extraídas, quantificada segundo o método de BRADFORD (1976), apresentaram valores que variaram de 6,989 a 1,657mg 100g<sup>-1</sup> de torta (Tabela 2). Estudos relacionados ao rendimento de extração de proteínas de torta de mamona ainda não são bem claros. O que tem sido observado é o rendimento de proteína extraída a partir de semente (KIM, 2001; ANANDAN, 2005), que relata valores de extração de ricina na ordem de 0,3g kg<sup>-1</sup> de semente. Deve-se ressaltar que essa extração foi realizada com HCl, pH 3.8 e que este é um líquido extrator diferente dos utilizados neste trabalho. O estudo dos efeitos do pH e concentração NaCl na concentração de proteína foi estabelecido através de um delineamento composto central rotacional, cujas variáveis e a resposta gerada estão dispostas na tabela 2.

O modelo apresenta um bom resultado para o coeficiente regressão ( $R^2=0,94$ ), indicando que quase 94% da variação encontrada se deve às variações dentro dos ensaios (pH e NaCl) e não a erro ou a outro fator.

O modelo obtido para o percentual de proteína extraída da torta de mamona é apresentado pela equação 1. Onde:

$$\text{Proteína (mg } 100\text{g}^{-1}) = -30,34124 + 9,88708x - 0,73414x^2 + 5,88399y - 2,06005y^2$$

X - pH e Y- Concentração de NaCL (M).

A análise de variância para o percentual de proteína extraída da torta de mamona foi significativo a nível de 5% com efeito tanto linear quanto quadrático para pH (X) e concentração de NaCl (Y). Já a interação entre elas não foi significativa em nível de 5%, mostrando que esta interação não tem efeito sobre o percentual de proteína extraída. (Figura 1).

Dos cinco diferentes valores de pH (4,0; 4,6; 6,0; 7,4; 8,0) e concentração NaCl (0,0M; 0,3M; 1,0M; 1,7M; 2,0M) utilizados, o de maior valor de proteína extraída foi observado no tratamento 10 chegando a valores quatro vezes maiores que o encontrado no de mínima extração de proteína (Tabela 3). Foram construídas as superfícies de respostas e os gráficos de contorno a partir das respostas experimentais dos ensaios (Figura 2), que contribuem para melhor

visualização dos efeitos de pH e concentração de NaCl no teor de proteína extraída da torta de mamona. O pH ótimo para extração de proteínas de torta de mamona encontra-se na faixa entre 6,3 e 7,4, bem como a concentração ótima de NaCl para extração de proteínas de torta de mamona na faixa entre 1,1 e 1,8M. (Figura2), sendo utilizado o tratamento 4 (tampão fosfato 0,2M/ NaCl 1,7M pH 7,4) para posteriores estudos moleculares. A justificativa da escolha pelo tratamento 4 baseia-se em dois fatos: a) apresenta valores de pH e de concentração de NaCl que se encontram na faixa ótima b) o valor de proteína extraída ( $6,7\text{g } 100\text{g}^{-1}$ ) é maior do que o observado na média das quatro repetições ( $6,37\text{g } 100\text{g}^{-1}$ ) do ponto central. Pela evidenciação no gel de eletroforese não houve extração preferencial de ricina nos tratamentos testados (Figura 3). Pode-se verificar que o bandejamento típico das duas cadeias (A e B) foi observado, apresentando neste trabalho massa molecular calculada de 38 e 36kDa, respectivamente. Estes resultados de valores de massa molecular estão próximos aos obtidos por LORD et al. (1994), GODOY et al. (2009) e ANANDAN et al. (2005). Quanto à intensidade de coloração do gel de poliacrilamida, pode-se dizer que o presente trabalho mostrou resultados melhores do que aqueles descritos por MACHADO et al. (2003) e STEPHAN et al. (2008)

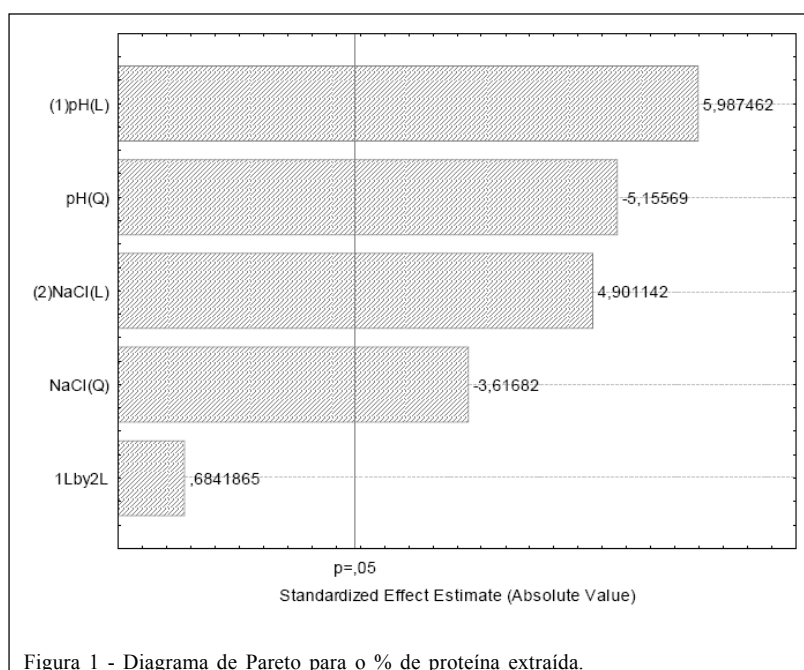


Tabela 3 - Análise de variância para o teor de proteínas extraídas da torta de mamona.

	SQ	GL	MQ	Fcalc	Ftab
Regressão	48,0347	5	9,606935	18,73017	1% = 8,75
Resíduo	3,0775	6	0,512912		
Falta de Ajuste	2,54967	3	0,84989	4,8308	
Erro puro	0,52780	3	0,17593		
Total	51,11215	11			

que utilizaram líquidos extratores que permitiram menor quantidade de proteína extraída. Posteriormente, etapas de purificação usando diálise e precipitação com sulfato de amônio permitiram uma evidênciação melhor das duas cadeias polipeptídicas de ricina (Figura 4). Pôde-

se evidenciar que um gel mais limpo é obtido no tratamento associando diálise e precipitação com sulfato de amônio, pois neste tratamento não se observa nem o rastro evidenciado na amostra aplicada sem tratamento prévio nem a presença de material de

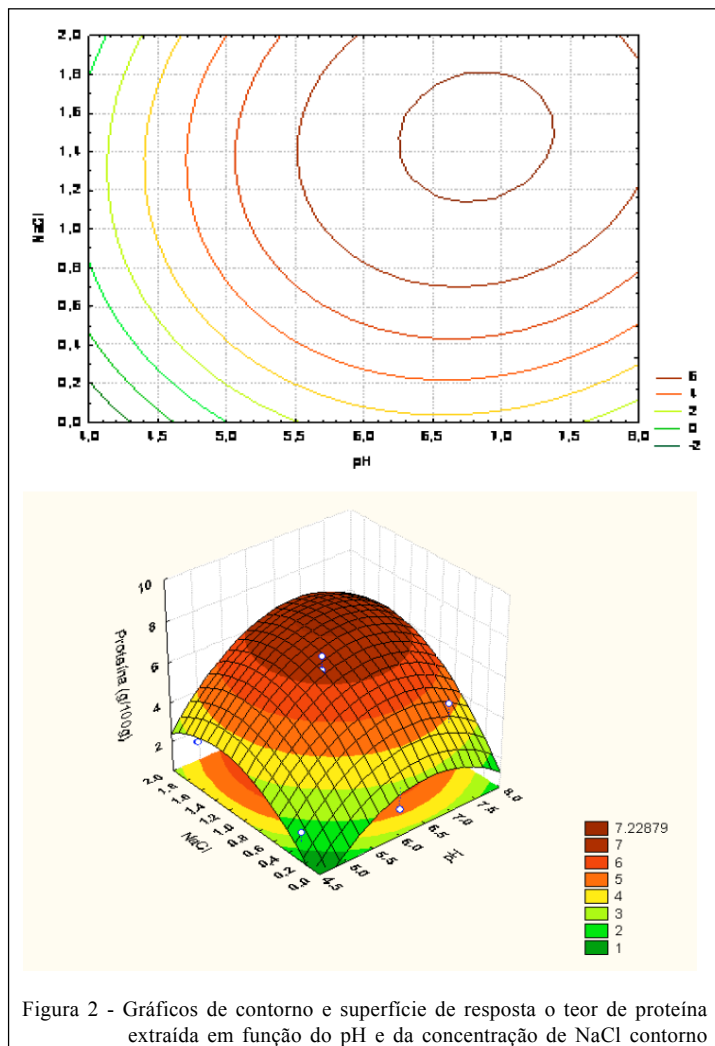


Figura 2 - Gráficos de contorno e superfície de resposta o teor de proteína extraída em função do pH e da concentração de NaCl contorno

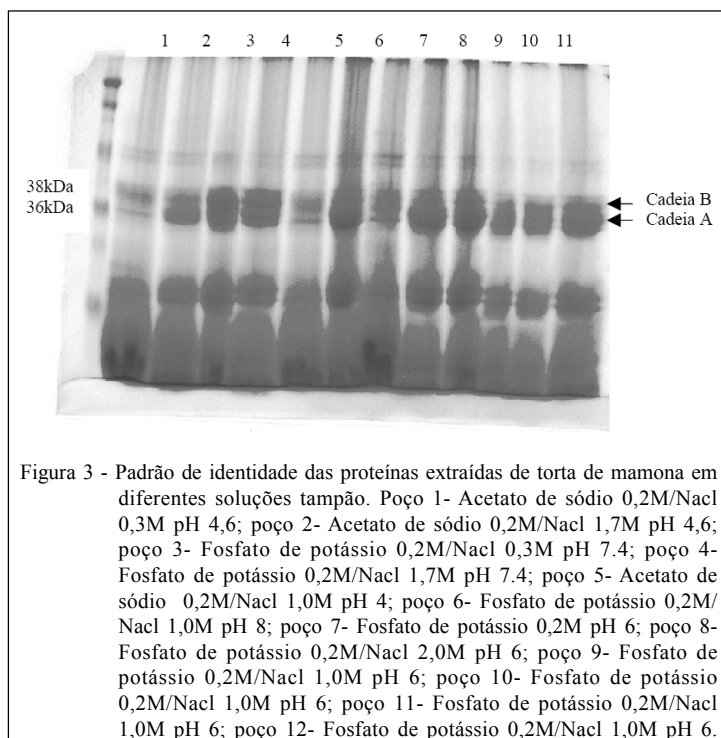


Figura 3 - Padrão de identidade das proteínas extraídas de torta de mamona em diferentes soluções tampão. Poço 1- Acetato de sódio 0,2M/NaCl 0,3M pH 4,6; poço 2- Acetato de sódio 0,2M/NaCl 1,7M pH 4,6; poço 3- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 0,3M pH 7,4; poço 4- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,7M pH 7,4; poço 5- Acetato de sódio 0,2M/NaCl 1,0M pH 4; poço 6- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,0M pH 8; poço 7- Fosfato de potássio 0,2M pH 6; poço 8- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 2,0M pH 6; poço 9- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,0M pH 6; poço 10- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,0M pH 6; poço 11- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,0M pH 6; poço 12- Fosfato de potássio 0,2M/NaCl 1,0M pH 6.

alta massa molecular no topo do gel, observado em amostras submetidas somente a diálise.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos de quantificação de proteínas através de estudo de superfície de resposta

permitem concluir que a associação do tampão fosfato de potássio 0,2M com NaCl 1,7M em pH 7.4 foi eficaz para a extração de ricina. A aplicação destes extratos no gel de eletroforese comprovou que uma perfeita observação das cadeias A e B de ricina pode ser feita utilizando a diálise e a precipitação com sulfato de amônio como métodos de purificação destes extratos.

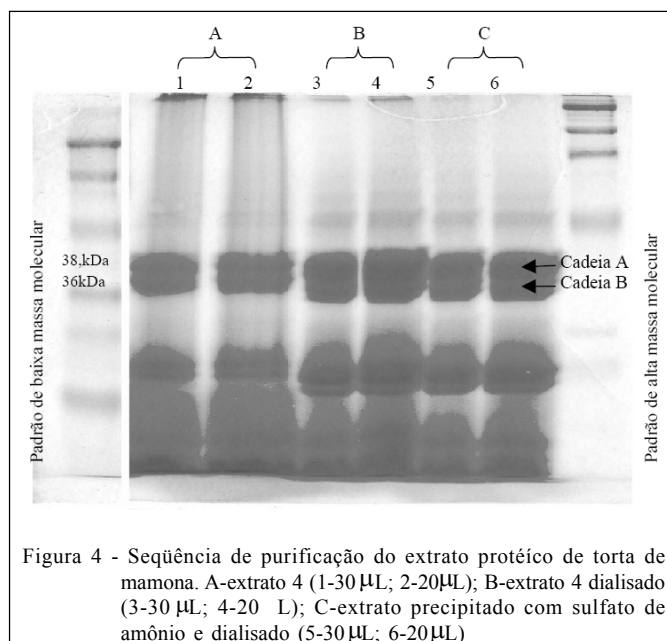


Figura 4 - Seqüência de purificação do extrato protéico de torta de mamona. A-extrato 4 (1-30  $\mu$ L; 2-20  $\mu$ L); B-extrato 4 dialisado (3-30  $\mu$ L; 4-20 L); C-extrato precipitado com sulfato de amônio e dialisado (5-30  $\mu$ L; 6-20  $\mu$ L)

## REFERÊNCIAS

- ANANDAN, S. et al. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal Feed Science and Technology**, v.120, p.159-168, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840104002305>>. Acesso em: 21 set. 2010. doi: 10.1016/j.anifeeds.2004.10.002.
- AUDI, J. et al. Ricin poisoning: A comprehensive review. **Journal of the American Medical Association**, v.294, n.18, p.2342-2351, 2005.
- BOX, G.E.P. et al. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building**. New York: John Wiley & Sons, 1978. 672p.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- ENDO, Y. et al. Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition a catalysis. **Journal of Molecular Biology**, v.221, p.193-207, 1991. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90956-K](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(92)90956-K)>. Acesso em: 10 nov. 2010. doi: 10.1016/00222836(92)90956-K.
- ENDO, Y.; TSURUGI, K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. **Journal Biological Chemistry**, v.262, p.8128-8130, 1987.
- GODOY, M.G. et al. Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v.44, p.317-322, 2009. Disponível em: <<http://www.elsevier.com.br/locate/emt>>. Acesso em: 10 nov. 2010. doi:10.1016/j.enz.2009.01.002.
- KIM, B.K. Effects of oil milling steps on residual toxin and antigen activities of castor bean. **Food Science and Biotechnology**, v.10, n.3, p.305-310, 2001.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LORD, J.M. et al. Ricin-structure, mode of action, and some current applications. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.8 p.201-208, 1994.
- MACHADO, O.L.T. et al. Characterization of allergenic 2S albumin isoforms from *Ricinus communis* seeds. **Allergologie**, v.26 p.45-51, 2003.
- MACKINNON, P.J.; ALDERTON, M.R. An investigation of the degradation of the plant toxin, ricin, by sodium hypochlorite. **Toxicon**, v.38, n.2, p.287-291, 2000.
- MONZINGO, A.F. et al. The 2.5 Å structure of pokeweed antiviral protein. **Journal of Molecular Biology**, v.233, p.705-715, 1993.
- OLSNES, S. The history of ricin, abrin and related toxins. **Toxicon**, v.44, p.361-370, 2004. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/toxicon>>. Acesso em: 22 ago. 2010. doi:10.1016/j.toxicon.2004.05.003.
- STEPHAN, M.P. et al. **Implantação do método de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para visualização de proteínas de torta de mamona**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2008. 3p. (Embrapa Agroindústria de Alimentos - Comunicado técnico, 136).