Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Comunicado Técnico 136

ISSN 0103-5231
Dezembro, 2008
Rio de Janeiro, RJ

Implantação do Método de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) para Visualização de Proteínas de Torta de Mamona

Marilia Penteado Stephan[1]
Carlos Wanderlei Piler de Carvalho[2]
José Luis Ramírez Ascheri[3]
Arlem Viana Ross[4]

Introdução

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma das culturas mais tradicionais no semi-árido brasileiro, sendo de relevante importância econômica e social por possuir inúmeras aplicações industriais. Segundo Azevedo e Lima (2001), a mamona apresenta um considerável potencial para a economia do país por ser uma boa matéria-prima para Região Nordeste em decorrência de ser um arbusto de grande resistência a períodos de seca. A torta de mamona oriunda do processo de obtenção de óleo possui elevado teor de proteínas e é produzida na proporção aproximada de 1,2 ton para cada tonelada de óleo extraído (AZEVEDO; LIMA, 2001), valor que pode variar influenciado por características da semente e do cultivo. De acordo com Savy Filho e Banzatto (1983), seu alto teor de proteína torna a torta atraente como alternativa para alimentação animal, porém a presença de substâncias tóxicas de difícil eliminação tem inviabilizado essa alternativa. Devido à inexistência de um método seguro para sua destoxicação, a torta tem sido utilizada predominantemente como adubo orgânico que tem valor inferior ao alimento animal. Seu alto teor de nitrogênio e presença de outros macronutrientes torna-lhe um excelente adubo que contribui também para o fornecimento de matéria orgânica para o solo (SILVA, 1971). Em sua composição, a torta de mamona possui 42,5% de proteína bruta, 20,0% de fibra e 0,78% de fósforo, entre outros componentes de grande importância nutricional. A toxidez da torta de mamona é causada pela presença de três substâncias: ricina (uma proteína), ricinina (um alcalóide) e CB-1A (um complexo alergênico), segundo Gardner Junior et al. (1960). A ricina é uma proteína encontrada exclusivamente no endosperma das sementes de mamona, não sendo detectada em outras partes da planta, como raízes, folhas ou caules. Trata-se de uma proteína com duas subunidades de aproximadamente 34 kDa e que biologicamente possuem diferentes funções (NARANG et al., 1997). A ricina classifica-se como lectina, ou seja, proteínas que têm um sítio receptor específico para um açúcar ou uma unidade de oligossacarídeo. Alguns trabalhos científicos utilizaram a técnica de eletroforese para detectar a presença de ricina utilizando colunas de amido, eletroforese em papel (PERRONE et al., 1966) e gel de acrilamida (MACKINNON; ALDERTON, 2000). Esta técnica é semi-quantitativa, pois permite ter

[1]*Farm.Bioquímica, D.Sc., Pesquisadora, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, Guaratiba. CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ, stephan@ctaa.embrapa.br*
[2]*Eng. Agrônomo, Ph.D., Pesquisador, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, Guaratiba. CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ, cwpiler@ctaa.embrapa.br*
[3]*Eng. de Alimentos, D. Sc., Pesquisador, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, Guaratiba. CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ, ascheri@ctaa.embrapa.br*
[4]*Aluno de graduação em Zootecnia, UFRRJ, arlemross@gmail.com*

noção da concentração da proteína, embora não forneça valores exatos que possam ser analisados estatisticamente. Porém, é uma técnica muito útil e de grande sensibilidade para determinados estudos com ricina. A comparação dos resultados eletroforéticos de determinada mistura com uma amostra de ricina pura pode ser de grande utilidade em algumas situações, tais como em técnicas de destoxicação (ASCHERI et al., 2007), na qual se precisa verificar a situação e/ou quantificação das bandas polipeptídicas da ricina. Neste trabalho, teve-se como objetivo ajustar um método de análise que permita a separação das proteínas em torta de mamona, de modo que as mesmas possam ser identificadas isoladamente. Como novidade propõem-se o uso do NaCl 0,3M e tampão TRIS-HCl pH 6,8 0,02M como solução de extração das proteínas da torta, visando utilizar este método para futuros estudos de hidrólise química e/ou enzimática da ricina, proteína que configura a toxidez desta matriz.

Eletroforese de Proteínas

Para o presente estudo foi utilizado o sistema de eletroforese da 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 4% no gel de aplicação da amostra. A corrida foi realizada durante sete horas sob uma tensão de 100 V. Os marcadores de massa molecular foram obtidos a partir do seguinte padrão de proteínas (em kDa): 103,035-fosforilase b; 80,664-soralbumina; 49,491-ovalbumina; 36,545-anidrase carbônica; 28,829-inibidor de tripsina de soja; 19,445-lisozima. As proteínas dos géis foram coradas com o reagente de cor "coomassie blue R250", por uma noite, e descoradas com solução de metanol/ácido acético/água (40: 10: 50), durante três horas.

Preparação de amostra de extrato protéico de torta de mamona para análise das cadeias polipeptídicas em eletroforese (SDS-PAGE) e resultados

Para este estudo, foram utilizadas farinhas de torta de mamona moídas em duas faixas de tamanho de partículas, o que permitiu que elas recebessem a denominação de grossa e fina. Utilizou-se para a extração 5 g deste material moído e 30 mL das seguintes soluções extratoras: fosfato 20 mM pH 7,5, Tris-HCl 0,02M (pH 8,0), uréia 6M e NaCl 0,3M. A extração foi feita inicialmente em Blender Waring (modelo: 34BL97-7012, New Harford, USA) durante 2 minutos e posteriormente em banho de ultrassom (modelo ultrasonic 3LD, Brasil) durante 30 minutos. Após estas etapas, o extrato foi filtrado em filtro de algodão e posteriormente foi centrifugado a 4000 rpm, à 4°C, durante 15 minutos. Após centrifugação, foram retirados 10 mL de sobrenadante e adicionados 90 mL de acetona. Para o tratamento com tampão fosfato foi necessário adicionar HCL para que houvesse a precipitação do material protéico como feito nos outros tratamentos. Após centrifugação a 4000 rpm, durante 15 minutos, o "pellet" protéico foi solubilizado em 5 mL das suas respectivas soluções: fosfato 20 mM, pH 7,5; TRIS-HCl 0,02M, pH8,0, uréia 6M e NaCl 0,3M. Quatrocentos μL de cada extrato foram misturados com 200μL do tampão de amostras TRIS-HCl pH 6,8. Desta amostra, foram retirados 20 ou 10μL (vide figura 1) de cada um destes extratos e aplicados em gel de poliacrilamida, utilizando-se as condições e padrões conforme descrito anteriormente. Para a extração com tampão fosfato e uréia, não foram observados nenhum bandeamento protéico (dados não apresentados). Entretanto, para as soluções de NaCl e TRIS-HCl pôde-se observar vários bandeamentos que apresentaram maior intensidade de coloração para os poços que continham 20μL de amostra. Um típico bandeamento de cadeia polipeptídica que compõe a ricina foi observado. Conforme é apresentado na Figura 1, este se refere à massa de 33 kDa que é similar à aquela de 34 kDa descrita por Narang et al. (1997).

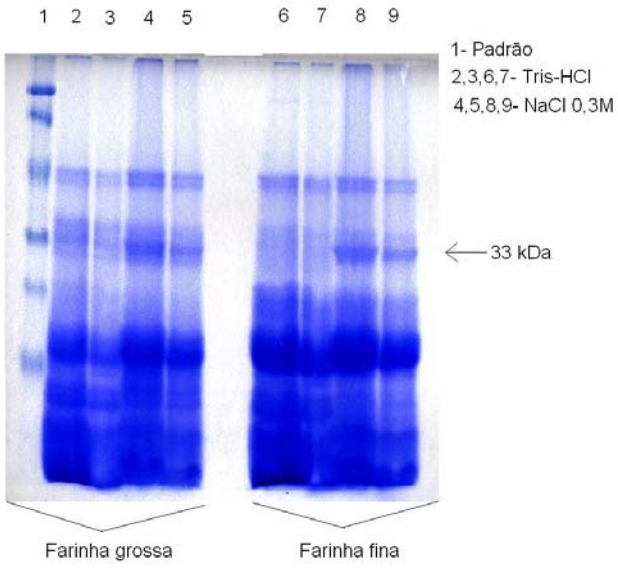

Fig. 1. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das cadeias polipeptídicas extraídas de torta de mamona, submetida a dois diferentes níveis de granulometria. Foram utilizadas duas soluções aquosas diferentes, tendo sido a amostra aplicada em dois diferentes volumes (20 e 10 μL).

Conclusão

O método se mostrou adequado ao tipo de matriz utilizada e também se diferenciou de outros descritos na literatura que utilizam outras soluções extratoras. A introdução da solução de TRIS-HCl 0,02M e NaCl 0,3M permitiu uma boa extração e solubilização de proteínas. O método se mostrou preciso e, com isto, pôde-se observar bandeamentos típicos de cadeias polipeptídicas que compõem a proteína ricina, mostrando um bandeamento em 33 kDa. Estes resultados mostraram-se promissores para futuros estudos de caracterização de destoxificação da ricina por meio de hidrólise da mesma.

Referências Bibliográficas

ASCHERI, J. L. R.; MACIEL, F. M.; CARVALHO, C. W. P. de; FREITAS, S. C. de; MACHADO, O. L. T. Destoxificação de torta de mamona por extrusão termoplástica: estudo preliminar. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: ABIPTI: MCT, 2007.

AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 350 p.

GARDNER JUNIOR, H. K.; D'AQUIN, E. L.; KOLTUN, S. P.; McCOURTNEY, E. J.; VIX, H. L. E.; GASTROCK, E. A. Detoxification and deallergenization of castor beans. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 37, n. 3, p. 142-148, 1960.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

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.

NARANG, U.; ANDERSON, G. P.; LIGLER, F. S.; BURANS, J. Fiber optic-based biosensor for ricin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 12, n. 9-10, p. 937-945, 1997.

PERRONE, J. C.; IACHAN, A.; DOMONT, G. B.; DISITZER, L. V.; CASTRO, V. R. O.; ROITMAN, R.; GOMES, S. M. **Contribuição ao estudo da torta de mamona**. Rio de Janeiro: Departamento de Imprensa Nacional, 1966. 51 p.

SAVY FILHO, A.; BANZATTO, N. V. O mercado está para a mamona. **Casa da Agricultura**, v. 5, n. 5, p. 12-15, 1983.

SILVA, N. M. **Estudo preliminar do emprego de torta de mamona associada à adubação mineral do algodoeiro**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1971. 8 p.

Comunicado Técnico, 136

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba 23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (0XX21) 3622-9600
Fax: (0XX21) 2410-1090 / 2410-9713
Home Page: http:\\www.ctaa.embrapa.br
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2008): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virgínia Martins da Matta.*
Membros: *Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteado Stephan, RenataTorrezan, Ronoel Luiz de Oliveira Godoy , Nilvanete Reis Lima e André Luis do Nascimento Gomes.*
Secretária: *Renata Maria Avilla Paldês*

Expediente

Revisão de texto: *Comitê de Publicações.*
Normalização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo.*
Editoração eletrônica: *André Guimarães de Souza*