

ANÁLISE DOS NÍVEIS DE ALBUMINAS 2S E DE RICINA EM SEMENTES DE DIFERENTES CULTIVARES DE MAMONA (*Ricinus communis* L.)*

Keysson Vieira Fernandes¹, Fábio Menezes Maciel², Olga Lima Tavares Machado³

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ¹keysson@gmail.com,

²macielfm@yahoo.com.br, ³olga@uenf.br

RESUMO - A mamona é uma Euphorbiaceae cogitada para a produção de Biodiesel. A torta residual da extração de óleo é muito rica em proteínas. Dentre estas, são encontradas proteínas tóxicas, como a ricina, e alergênicas como as albuminas 2S, que limitam o uso da torta. A fim de identificar uma cultivar com baixa toxicidade e alergenicidade, e assim dar suporte aos programas de melhoramento da mamoneira, foram avaliados os teores de ricina e de albuminas 2S em três cultivares de mamona: BRS Paraguaçu, IAC-80 e IAC-226. As albuminas 2S foram purificadas segundo metodologia descrita por Thorpe *et al.* (1988). O extrato foi fracionado por cromatografia de filtração em gel gerando três frações protéicas. A fração não retida, de maior massa molecular, analisada por SDS-PAGE, continha bandas com 32 e 34 kDa. Estas proteínas correspondem às duas cadeias de Ricina. A fração correspondente a proteínas com massa em torno de 14 kDa, quando avaliada por eletroforese nativa e por SDS, continha bandas com as mesmas mobilidades eletroforéticas nas três cultivares analisadas. Tais bandas imunoreagiram com anticorpo anti-albuminas 2S. Os teores de ricina encontrados foram de 2,5 %, 1,6% e 1,4 % e os de albuminas 2s foram de 1,0 %, 0,5% e 0,6 % para as cultivares BRS Paraguaçu, IAC-226 e IAC-80, respectivamente. Assim, a partir dos dados obtidos concluímos que a cultivar IAC-226 é a menos alergênica e a IAC-80 a menos tóxica.

Palavras-chave: mamona, albuminas 2S, ricina, ricinus.

INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa de relevante importância econômica e social, com inúmeras aplicações industriais. Os principais países produtores são a Índia e a China com cerca de 60% e 20% da produção mundial, respectivamente. O Brasil, que já foi o maior produtor mundial, perdeu sua hegemonia a partir de 1983, com o aumento gradativo da área de cultivo e da produção dos principais concorrentes, além das dificuldades de relacionamento comercial entre a indústria e o agricultor (SAVY FILHO, 2005).

Segundo o Banco de Desenvolvimento de Minas Gerais S. A., a mamona apresenta inúmeras aplicações. No entanto, os principais produtos derivados da semente de mamona são o óleo e a torta residual. O óleo, além das diversas aplicações como produção de cosméticos até a substituição ao petróleo na fabricação de plásticos e lubrificantes, se constitui em uma das alternativas para a produção de Biodiesel. Quanto ao emprego da torta residual da extração de óleo de mamona, o seu principal uso é como adubo orgânico, que se constitui em um excelente fertilizante. E, apesar de

apresentar alto teor de proteínas, não se recomenda o uso da torta para ração, pois esta é tóxica devido à presença da proteína ricina, e do complexo alergênico, denominado nas décadas passadas de CB-1A (Castor bean allergen) que é uma mistura de proteínas de baixo peso molecular (YOULE; HUANG, 1978).

Sabe-se que o complexo CB-1A representa cerca de 12,5% do peso da torta. É formado por cerca de 20 isoformas de proteínas com massa molecular entre 10 e 14 kDa pertencentes à classe das albuminas 2S (MACHADO et al, 2003). As albuminas 2S possuem altos teores de glutamina, arginina e serina, apresentam uma distribuição característica de oito cisteínas em um padrão conservado e geralmente são compostas de 2 cadeias polipeptídicas diferentes de 3-5 e de 8-10 kDa ligadas por duas pontes dissulfeto. Elas ainda apresentam duas ligações intra cadeias, o que as tornam proteínas muito estáveis e compactas.

A ricina é uma proteína encontrada exclusivamente no endosperma das sementes de mamona, não sendo detectada em nenhuma outra parte da planta. É uma proteína inativadora de ribossomo do tipo II (RIP II). Trata-se de uma proteína com duas subunidades de aproximadamente 32 kDa (cadeia A) e 34 kDa (cadeia B) ligadas por uma ponte dissulfeto, possuindo, biologicamente, diferentes funções (OLSNES; KOZLOV, 2001). A cadeia A é enzimaticamente ativa, enquanto a cadeia B funciona como um ligante de receptores.

Visando às diversas aplicações econômicas da mamona, muitas instituições têm trabalhado no desenvolvimento de novas cultivares, buscando melhorar características economicamente importantes da planta. Entre as sementes de diferentes cultivares é possível perceber claras diferenças fenotípicas, como tamanho, peso e cores. No entanto, pouco se conhece sobre os níveis de alérgeno e de toxina nestas cultivares.

O presente trabalho tem por objetivo dar subsídio aos programas de melhoramento da mamoneira no país a partir do desenvolvimento de uma metodologia rápida e eficiente para determinar os níveis de albuminas 2S e ricina em genótipos de mamona.

MATERIAL E MÉTODOS

As cultivares de mamona utilizadas neste trabalho foram as seguintes: IAC-80, IAC-226 e BRS Paraguaçu.

A extração das proteínas foi feita a partir de 1 g do endosperma sem óleo (extração com hexano) de sementes de *Ricinus communis* L., segundo a metodologia descrita por Thorpe et al. (1988), a qual se baseia na solubilidade das albuminas 2S em tampão fosfato pH 7,0, na sua precipitação em sulfato de amônio e na resistência das mesmas ao aquecimento à 100°C por 15 minutos. O mesmo procedimento foi utilizado para a ricina, abstraindo o processo de fervura.

A separação das proteínas presentes no extrato bruto do endosperma das sementes de mamona foi feita por filtração em gel em uma coluna Sephadex G-50 utilizando-se como fase móvel uma solução de ácido trifluoroacético 0,1%. O perfil cromatográfico das amostras foi obtido por espectrofotometria (leitura de absorbância a 280 nm). A fração correspondente às albuminas 2S foi coletada no pico II e para a ricina no pico I. As proteínas foram quantificadas pelo método do reagente de Bradford, utilizando-se concentrações crescentes de ovalbumina a 1 mg/mL para construção da curva padrão.

Para a avaliação da homogeneidade protéica as amostras foram submetidas a fracionamento por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% - para as albuminas 2S - e 12% - para a ricina -, na presença de agentes desnaturantes. Para confirmação da presença das albuminas 2S no extrato protéico foi utilizado um ensaio imunológico de “Western blotting”, utilizando anticorpos primários do tipo IgG de coelho anti-albuminas, e secundários anti-IgG de coelho acoplado à peroxidase.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a purificação por filtração em gel e leitura espectrofotométrica a 280 nm, são apresentados o perfil cromatográfico do extrato protéico de cada cultivar, para albuminas 2S (Figura 1A) e para ricina (Figura 1B). A partir do perfil cromatográfico foi possível obter informações preliminares dos níveis de toxina e alérgeno nas amostras.

Pela dosagem de proteínas foi possível estimar o teor de albuminas 2S (Tabela 1) e de Ricina nas cultivares avaliadas. Verificam-se níveis de 1,4%, 1,6% e 2,5% de ricina para IAC-80, IAC-226 e BRS Paraguaçu, respectivamente. Para as albuminas 2S observam-se teores de 0,5%, 0,6% e 1,0% para IAC-226, IAC-80 e BRS Paraguaçu, respectivamente.

A homeogeneidade da amostra contendo albuminas 2S foi verificada por SDS-PAGE onde duas bandas de 12 kDa e 8 kDa foram visualizadas (Figura 2A), sendo a de maior massa molecular resíduos da proteína intacta, e a de menor massa a cadeia pesada da albumina 2S. Seis isoformas de albuminas 2S foram constatadas por PAGE-nativa nas amostras das três cultivares (Figura 3A). A confirmação da presença da fração alergênica nas bandas no gel foi feita por “Western blotting” (Figura 2B e 3B), onde as albuminas 2S foram reconhecidas pelo anticorpo.

A presença da ricina nas amostras foi conferida também por SDS-PAGE, utilizando-se as amostras correspondentes ao pico I da filtração em gel (Figura 4A) e extrato protéico bruto do endosperma das sementes (Figura 4B).

Pelos resultados constata-se que as cultivares IAC-226 e a IAC-80 apresentaram os menores teores de albuminas 2S e ricina, respectivamente e além disso, ainda apresentam teores de óleo dentro da média da espécie (Tabela 1).

O uso da metodologia possibilitará expandir o conhecimento a respeito dos níveis de alérgeno e toxina em genótipos de mamona auxiliando os trabalhos de desenvolvimento de cultivares nos programas de melhoramento da mamona.

*Apoio Financeiro: UENF, FAPERJ, CNPq

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MACHADO, O. L. T.; MARCONDES, J. A.; SOUZA-SILVA, F. de; HANSEN, E.; RIBEIRO, P. D.; VERÍSSIMO, M.; KANASHIRO, M.; KIPNIS, T. L.; SILVA JUNIOR, J. G. da; SANTOS, M. F. dos; COSTA E SILVA, M. C. 2003. Characterization of allergenic 2S albumin isoforms form *Ricinus communis* seeds. **Allergologie**, v. 26, p. 45- 51, 2003.

OLSNES, S.; KOZLOV, J. Ricin. **Toxicon**, v. 39, p. 1723-1728, 2001.

SAVY FILHO, A. **Mamona: Tecnologia Agrícola**. Campinas: EMOPI, 2005.

THORPE, S. C.; KEMEDY, D. M.; PANZANI, R. C.; MCGULR, B.; LORD, M. Allergy to castor bean II – identification of the major allergens in castor bean seeds. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 82, p. 67-62. 1988.

YOULE, R. J.; HUANG, A. H. C. Evidence that castor bean allergens are albumin storage proteins in protein bodies of castor bean. **Plant Physiology**, v. 61, p. 1040-1042. 1978.

Tabela 1. Comparativo entre os principais aspectos avaliados (teor de óleo, albumina 2S e ricina) para cada cultivar. Os valores mais apropriados são mostrados em verde.

Cultivar	Teor de óleo	Teor de albuminas 2S em 1 g de semente	Teor de ricina em 1 g de sementes
BRS Paraguaçu	48%	1,0%	2,5%
IAC-226	47%	0,5%	1,6%
IAC-80	47%	0,6%	1,4%

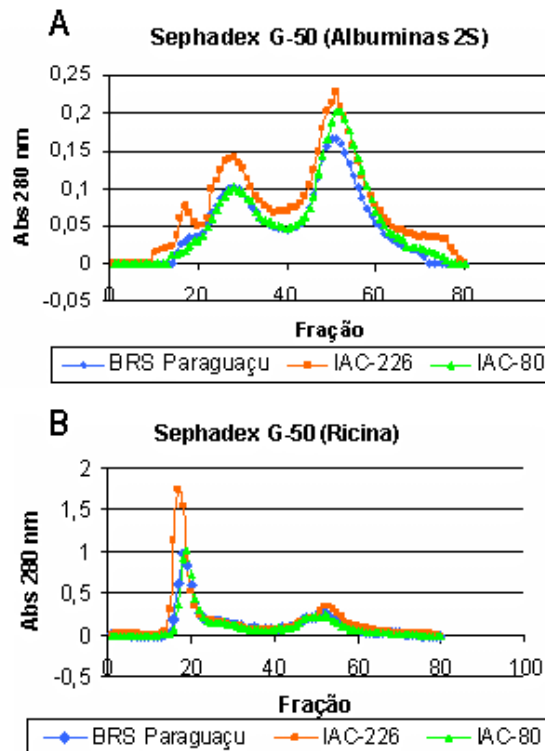


Figura 1. Sobreposição dos perfis cromatográficos para albuminas 2S (A) e ricina (B) de cada cultivar após gel-filtração em coluna Sephadex G-50. O pico I corresponde à fração de ricina, o pico II às albuminas 2S e o pico III à fração de baixo peso molecular.

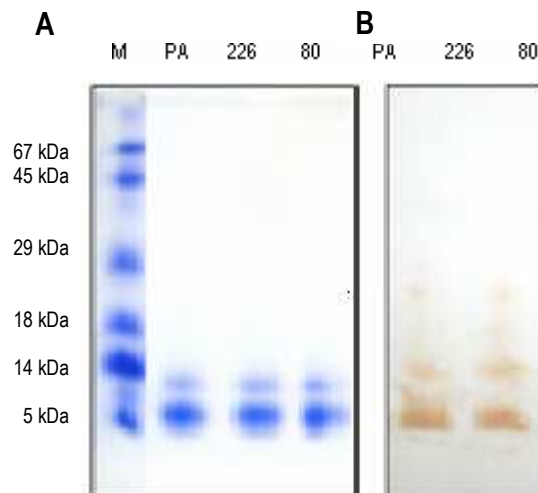


Figura 2. Em A, SDS-PAGE 15% das frações de albumina 2S. Em B, um “Western blotting” confirmando a presença das albuminas 2S no extrato eluído da filtração em gel. M = Marcador; PA = BRS Paraguaçu; 226 = IAC-226; 80 = IAC-80.

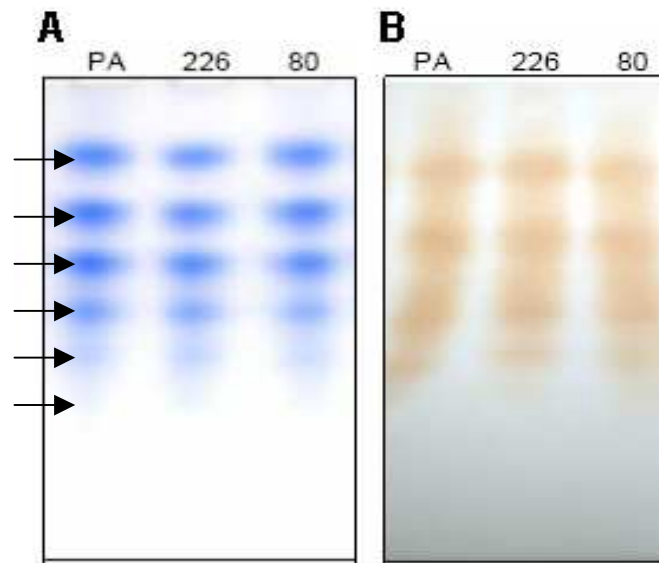


Figura 3. Em A, PAGE-nativa 15% das frações de albumina 2S. Em B, um “Western blotting” confirmando a presença das isoformas de albuminas 2S no gell. M = Marcador; PA = BRS Paraguaçu; 226 = IAC-226; 80 = IAC-80. As setas indicam as isoformas presentes.

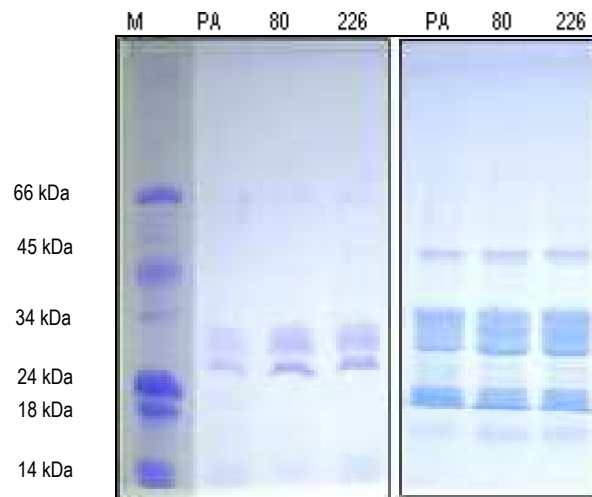


Figura 4. SDS-PAGE 12% para a fração eluída da Sephadex G-50 (A) e do extrato protéico bruto do endosperma (B). M = Marcador; PA = BRS Paraguaçu; 80 = IAC-80; 226 = IAC-226.