

PURIFICAÇÃO DE RICINA A PARTIR DE SATURAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO*

Mayrla Rocha Lima¹, Vitor Paulo Andrade da Silva¹, Roselayne Ferro Furtado², Carlúcio Roberto Alves¹,
Maria Izabel Florindo Guedes¹, Rosa Amália Fireman Dutra³

¹Universidade Estadual do Ceará, lia_lima2004@ig.com.br, vitorvolt@hotmail.com, alvescr@yahoo.com, florinfo@terra.com.br, ² Embrapa Agroindústria Tropical, roselayne@cnpat.embrapa.br, ³ Universidade Estadual de Pernambuco, rfiremandutra@yahoo.com.br

RESUMO – A torta de mamona é bastante nutritiva, porém é observada a presença de ricina, uma das mais potentes fitotoxinas. Existem diferentes estudos envolvendo a purificação dessa proteína, no entanto, os métodos de purificação de ricina empregados, geralmente, são laboriosos e de alto custo. Neste trabalho estudou-se um método de purificação de ricina, após processo de extração de proteínas utilizando precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, em cinco intervalos de saturação: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-90%, a fim de se observar em qual destes ocorre a precipitação isolada de ricina e avaliar a quantidade da proteína precipitada. Após a extração das proteínas e precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, as amostras foram submetidas ao método de Bradford e eletroforese em gel de poli-acrilamida não-desnaturante. Segundo o método de Bradford verificou-se que 20g de torta apresentou 87,894mg de proteína. Verificou-se que em todos os intervalos de saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, houve precipitação de ricina e outra (s) proteína(s). Os percentuais de precipitação de proteína nos intervalos de: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-90% foram 2,48%, 38,31%, 47,55%, 11,21%, 0,45%, respectivamente. Assim, conclui-se que não foi possível isolar a ricina adotando o método de purificação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e que a maior quantidade de proteína precipitada correspondeu ao intervalo de 40-60% de saturação.

Palavras-chaves: ricina, torta de mamona, sulfato de amônio, purificação.

INTRODUÇÃO

A precipitação de proteínas com sulfato de amônio é conhecida por ser útil na concentração de soluções diluídas de proteína e no fracionamento de mistura de proteínas.

O mecanismo de precipitação de proteínas com sais decorre de um aumento da força iônica do sistema. Quando pequenas quantidades de sal são adicionadas à solução contendo proteínas, ocorre uma interação destas com as cargas provenientes da dissociação do sal e diminuição da interação inter-proteínas, aumentando a solubilidade no meio aquoso. Porém, em condições de elevada força iônica, decorrente da adição de grandes quantidades de sal, verifica-se um efeito oposto. As moléculas de água, interagem mais fortemente com os íons provenientes da dissociação do sal, promovendo desta forma, a desidratação das proteínas. Durante esse processo, a interação inter-proteínas se torna mais forte, diminuindo a solubilidade das mesmas em meio aquoso e, conseqüentemente, a ocorrência de precipitação das proteínas. Esse processo é também conhecido por "salting-out".

A precipitação de proteínas pelo gradativo aumento da concentração de sais é um processo muito importante para a separação de misturas complexas de proteínas, uma vez que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada proteína. O sulfato de amônio tem sido o sal

mais comumente utilizado nos ensaios de precipitação de proteína por algumas de suas características como a alta solubilidade, baixo custo e baixa toxicidade.

A torta de mamona possui grande quantidade de proteínas, fato que tem incentivado o destino da mesma para ração. No entanto, quando o interesse é isolar um único tipo de proteína da torta de mamona recorre-se a métodos de alto custo como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Neste sentido, a precipitação de proteínas com sulfato de amônio é uma alternativa de baixo custo e amplamente empregada para a purificação de um tipo de proteína de interesse (BACILA, 2001; FENGXIA et al., 2008). A ricina é uma proteína de alta toxicidade presente na torta de mamona e representa foco de estudo de inúmeras pesquisas na área da saúde (NA et al., 2004) e agrária (ANANDAN, et al., 2005) e que talvez possa ser isolada pelo método da saturação da solução com sulfato de amônio.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a possibilidade de precipitação isolada de ricina e através do método de Bradford quantificá-la, a fim de desenvolver um método simples de purificação da ricina e conhecer a quantidade de ricina possível de ser obtida.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a extração da ricina, 20 g de torta de mamona obtida a partir de sementes da cultivar Nordeste concedidas pela Embrapa Algodão, foram homogeneizadas em solução de NaCl 0,15 mol L⁻¹ por 30 minutos. Posteriormente, centrifugou-se a solução a 32981 x g por 20 minutos em temperatura de 4° C e separou-se o sobrenadante (S₁). O resíduo foi novamente homogeneizado em solução salina e centrifugado nas mesmas condições anteriores para a separação do sobrenadante (S₂). Misturaram-se os dois sobrenadantes, obtendo-se o sobrenadante total (S_t). Foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada sobrenadante para o método de Bradford (1976).

O sobrenadante total foi submetido à precipitação com sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, empregando cinco intervalos de saturação: 0-20% (m/m), 20-40% (m/m), 40-60% (m/m), 60-80%(m/m), 80-90% (m/m) de acordo com Scopes (1993). A cada saturação com sulfato de amônio a solução foi deixada em descanso por uma noite (overnight), centrifugada a 32981 x g por 20 minutos e coletado o precipitado. Os precipitados foram solubilizados em NaCl 0,15 mol L⁻¹, dialisados contra água destilada e submetidos ao método de Bradford (1976).

Realizou-se eletroforese das amostras dos precipitados de cada intervalo de saturação em gel de poliacrilamida a 12,5%, sob condições não desnaturantes, por 1 hora e 40 minutos aplicando corrente contínua de 20 mA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo o método de Bradford (1976) o sobrenadante total obtido a partir de 20 g de torta de mamona apresentou concentração de proteínas de $58,59 \pm 0,2378 \mu\text{g} / 100\mu\text{L}$, totalizando cerca de 87,89 mg de proteína. Na Tabela 1, verificou-se que os intervalos de saturação de 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-90% demonstraram os seguintes percentuais de precipitação de proteínas: 2,48%, 38,31%, 47,55%, 11,21% e 0,45%, respectivamente.

Observa-se na Figura 1 que a ricina precipitou em todos os intervalos de saturação, embora na figura o intervalo de saturação com sulfato de amônio de 20-40% não esteja bem nítida a presença da banda correspondente a ricina, 66 kDa, em virtude da diluição adotada. No intervalo de 80-90% a banda correspondente a ricina foi visualizada fracamente, devido a mesma ter precipitado em maior quantidade nos intervalos de saturação anteriores.

CONCLUSÕES

Não foi possível isolar a ricina pelo método de saturação com sulfato de amônio nos intervalos estudados.

Maior quantidade de proteínas precipitadas foi verificada no intervalo de saturação com sulfato de amônio de 40-60%.

* Os autores agradecem a FINEP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANDAN, S.; KUMAR, G. K. A.; GHOSH, J; RAMACHANDRA, K. S. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake *Animal Feed Science and Technology*, v. 120, n. 1-2, p. 159-168, 2005.

BACILA, M. A Presença da galactoquinase em tecidos animais. **Braz. Arch. Biol. Technol.** p. 293-297. 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p.248-254, 1976.

FENGXIA, L.; MEI, L.; ZHAOXIN, L.; XIAOMEI, B.; HAIZHEN, Z.; YI, W. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5938–5941. 2008.

NA, D. H.; YOUN, Y. S.; LEE, K. C. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for monitoring and optimization of site-specific PEGylation of ricin A-chain. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, v. 18, p. 2185–2189. 2004.

Tabela 1. Percentuais de proteína precipitada nos intervalos de saturação de 0-20%; 20-40%; 40-60%, 60-80%, 80-90% com sulfato de amônio.

Grau de saturação	Proteína Obtida (%)
0-20%	2,48
20-40%	38,31
40-60%	47,55
60-80%	11,21
80-90%	0,45

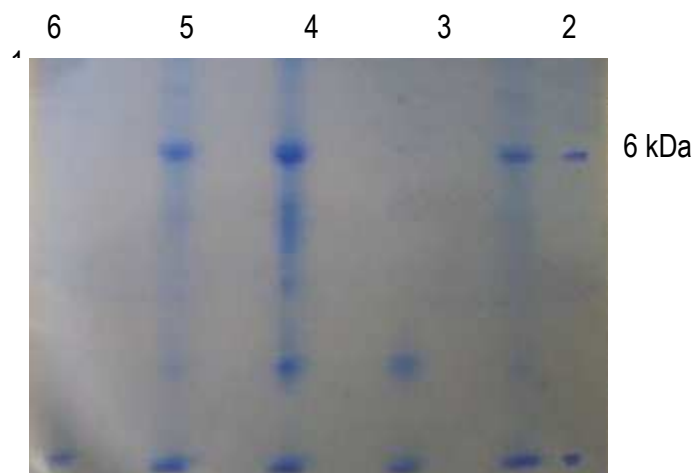


Figura 1. Eletroforese de gel de poliacrilamida 12,5% em condições não desnaturantes de BSA-marcador (1) e amostras dos percentuais de proteína precipitada nos intervalos de saturação de 0-20% (2); 20-40% (3); 40-60% (4); 60-80%(5); 80-90%(6), com sulfato de amônio.