

Comunicado Técnico 170

ISSN 0103-5231
Dezembro, 2010
Rio de Janeiro, RJ

Metodologia de extração de proteínas em torta de mamona e pinhão manso para análise por eletroforese (SDS-PAGE)

Marília Penteado Stephan¹
Bárbara Amorim Silva²
Tatiana de Lima Azevedo³
José Luís Ramirez Ascheri⁴

Introdução

A ampliação do cultivo de sementes oleaginosas no Brasil vem sendo impulsionado pelo Governo Federal para cumprir o Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel (PNPB), como alternativa ao consumo de combustíveis fósseis. A extensão territorial brasileira, a variedade de clima e o domínio tecnológico contribuíram para o desenvolvimento do cultivo de diversas espécies com alto potencial para a produção de biocombustíveis, como o biodiesel derivado das sementes de mamona e pinhão manso (BELTRÃO et al., 2006). A mamoneira (*Ricinus comunis* L.) e o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) destacam-se entre estas por possuírem um alto valor econômico. O pinhão manso apresenta vantagens em relação não só a mamona como também a outras sementes oleaginosas não comestíveis (*Pongamia pinnata*, *Simarouba glauca* e *Azadirachta indica*), devido a alta adaptabilidade de crescimento sob diferentes condições agrônomicas e ambientais, tal como solo

seco e regiões muito chuvosas (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010). O óleo extraído de suas sementes tem destino comercial bem definido, movimentando segmentos industriais importantes, gerando como subproduto uma torta com elevado teor de proteínas. A torta gerada durante o processo de extração tem sido usada como adubo orgânico por apresentar alto teor deste e de outros macronutrientes, porém possui baixo valor agregado. Uma alternativa para a utilização destes materiais com destino mais nobre seria seu emprego na formulação de ração animal. Porém, esta aplicação só se torna viável após a destoxificação destes materiais, já que possuem em sua composição as proteínas ricina (mamona) e curcina (pinhão manso) e outros compostos protéicos com propriedades alergênicas que impedem sua utilização na alimentação animal. Três classes de proteínas podem ser descritas em plantas: a) proteínas de reserva, utilizadas durante a germinação; b) proteínas funcionais tais como enzimas, hormônios e proteínas de defesa; e c) proteínas estruturais que têm função

¹ Farmacêutica, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, stephan@ctaa.embrapa.br

² Engenheira de Alimentos, mestranda da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, barbaraamorim@hotmail.com

³ Licenciada em Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, tatiana@ctaa.embrapa.br

⁴ Engenheiro de Alimentos, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, ascheri@ctaa.embrapa.br

definitiva nas plantas. As proteínas tóxicas de mamona e pinhão manso podem ser enquadradas na classe b, que são as proteínas funcionais. Estas proteínas são denominadas de RIPs (*ribosome-inactivating proteins*) que inativam o RNA ribossomal e inibem a síntese protéica com conseqüente morte celular. Elas são designadas como RIP tipo 2 por serem heterodiméricas e terem massa molecular de aproximadamente 60 kDa (BARBIERI; BATTELLI; STIRPE, 1993). Seu poder tóxico é tão grande que a possibilidade de sua utilização em ataques de bioterrorismo fez com que fosse desenvolvido um método de detecção rápida para esta substância. Este método fundamenta-se na emissão de fluorescência por uma reação luciferina-luciferase que, na presença desta proteína, não permite a emissão de luz (VIVIANI; BECHARA, 2008). A ricina tem sido analisada por técnicas de separação acopladas a espectrometria de massa, impulsionada pela necessidade de identificação e controle devido ao bioterrorismo (FREDRIKSSON et al., 2005). Porém esta técnica requer equipamentos caros refletindo em seu alto custo. A análise por eletroforese se apresenta como uma alternativa mais barata, porém muitos dos trabalhos realizados utilizando esta análise não são reprodutíveis por não descreverem claramente o método de extração das proteínas ou por apresentarem baixa eficiência nesta extração. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de extração que permita a detecção e quantificação das proteínas ricina e curcina nas tortas de mamona e pinhão manso, através da técnica de eletroforese (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida. Tem-se também como objetivo a futura utilização desta ferramenta para monitoramento da perda de integridade destas proteínas quando submetidas a processos tecnológicos de destoxificação destas tortas.

Foto: Bárbara Amorim Silva



Figura 1: Sementes de mamona.

Para o presente estudo foram utilizadas farinhas de torta desengordurada de mamona e de pinhão manso. Foi utilizado o sistema de eletroforese da

marca Biorad e a metodologia de preparação dos géis descrita por Laemmli (1970). Para quantificação de proteína total solúvel adicionou-se 2 mL da solução de NaOH (1M) a 0,5 g da farinha desengordurada de mamona e pinhão manso. A mistura foi mantida em banho-maria durante 10 min. As amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 10.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi retirado e utilizado para quantificação das proteínas através do método de Bradford (1976). Para quantificação das proteínas extraídas e análise de cadeia polipeptídica por eletroforese foram testadas duas soluções extratoras. Utilizou-se 5 g da torta moída e 30 mL das seguintes soluções extratoras: I) tampão acetato de sódio (0,45 M) e II) HCl (0,1%) / NaCl (0,6 M). A extração foi feita através de agitação das misturas durante 1 h sob vácuo. Após esta etapa, o extrato foi filtrado, diluído na proporção de 1/10 e utilizado para quantificação de proteínas extraídas através do método de Bradford (1976). Para análise de eletroforese foram utilizados 400 µL de cada um dos extratos adicionados de 200 µL da solução tampão de amostra (TRIS-HCl; dodecilsulfato de sódio (SDS); glicerol; mercaptoetanol; azul de bromofenol). Foram retiradas alíquotas de 30, 20 e 10 µL das amostras e aplicadas em gel de poliacrilamida na concentração de 12% durante 7 h sob uma tensão de 100V.

Foto: Bárbara Amorim Silva



Figura 2: Processo de extração do óleo para obtenção das tortas de mamona e pinhão manso.

Desenvolvimento da metodologia de extração das proteínas

A quantidade de proteína total solúvel encontrada para a extração realizada com solução de NaOH (1M) representou 8,6% da massa total da torta de pinhão manso e 9,6% da massa total da torta de mamona. Para a quantificação de proteína extraída, observou-se que a solução II (HCl/NaCl) extraiu cerca de 69,8% das proteínas para mamona e 49,1% proteínas presentes na amostra de pinhão manso. Já para a solução extratora I (AcNa) a porcentagem de extração das proteínas foi de 38% para a torta de mamona e 35% para a torta de pinhão manso (Figura 3). O que mostra uma maior eficiência da solução (HCl/NaCl) na extração das proteínas presentes nas tortas. Principalmente para a torta de mamona onde a extração realizada com a solução HCl/NaCl teve um rendimento de 69,8% quando para a solução extratora com acetato este rendimento foi de apenas 49,1%.

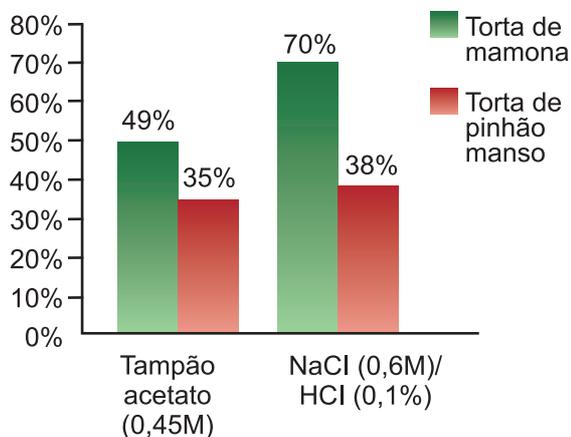


Figura 3: Percentual de proteína extraída em tortas de mamona e pinhão manso.

Resultados da identificação das proteínas tóxicas por eletroforese SDS-PAGE

A ricina e a curcina são proteínas tóxicas presentes em tortas de mamona e pinhão manso, respectivamente. Estas proteínas estão incluídas na classe das proteínas inativadoras de RNA- ribossomal, e recebem a designação de tipo I (curcina) e tipo II (ricina). A do tipo I é uma proteína constituída de uma única cadeia polipeptídica que apresenta massa molecular variando na faixa de 23 a 32 kDa. As proteínas do tipo II apresentam duas cadeias polipeptídicas com massa molecular aproximadamente na faixa de 30 kDa (PEUMANS; HAO; DAMME, 2001). Na análise das proteínas extraídas da torta e analisadas por eletroforese, um típico bandejamento de cadeia polipeptídica que compõe a ricina foi observado no gel em que foi aplicado o extrato de mamona tratado com solução de HCl/NaCl, presente na faixa de 34,60 (Figura 4). Este bandejamento é similar ao descrito por Narang et al. (1997). No extrato de pinhão manso tratado com solução de HCl/NaCl, pôde-se identificar uma banda na faixa de massa

molar de 23,26 kDa (Figura 5), atribuída a proteína designada de curcina e que apresenta bandejamento similar ao descrito por Lin et al. (2003). Deve-se ressaltar que a fraca intensidade da coloração do gel pode decorrer do fato destas proteínas serem classificadas como glicoproteínas e, portanto, conterem cadeias polipeptídicas menores.

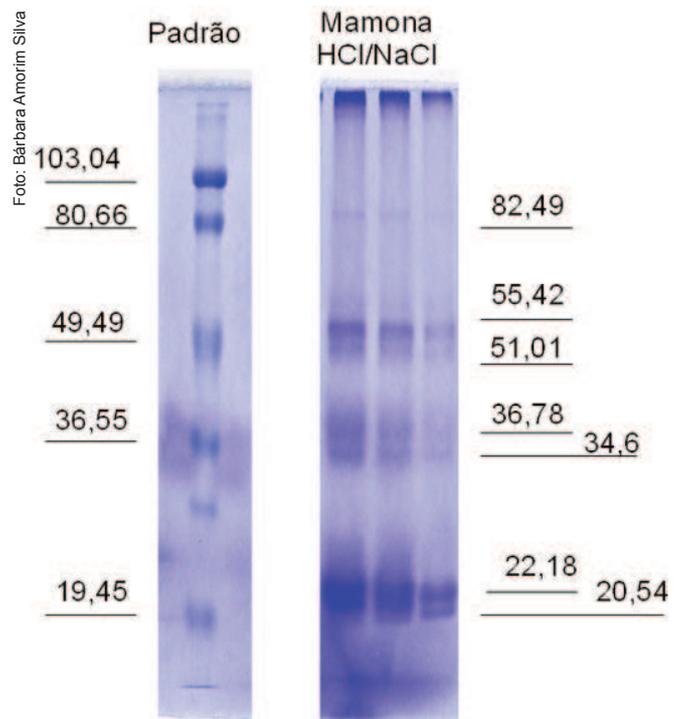


Figura 4: Perfil eletroforético das proteínas extraídas de torta de mamona.

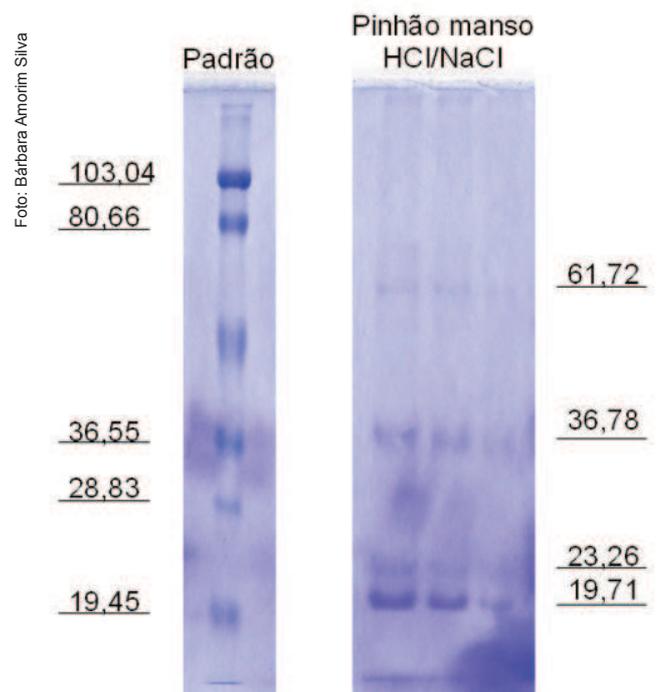


Figura 5. Perfil eletroforético de proteínas extraídas de torta de pinhão manso.

Conclusão

A metodologia de análise desenvolvida para identificação e quantificação das proteínas totais e tóxicas por eletroforese se apresenta como uma alternativa barata quando comparada aos demais métodos encontrados. A utilização da solução extratora HCl (0,1%)/NaCl (0,6M) se destaca como uma nova opção na extração das proteínas presentes na torta de mamona e pinhão manso, o que permitirá utilizá-la para futuros estudos de monitoramento da integridade destas proteínas em resposta aos processos tecnológicos empregados na sua destoxificação.

Referências

- BARBIERI, L.; BATTELLI, M.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating protein from plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1154, p. 237-282, 1993.
- BELTRÃO, N. E. de M.; CARTAXO, W. V.; PEREIRA, S. R. de P.; SOARES, J. J.; SILVA, O. R. R. F. **O cultivo sustentável da mamona no semi-árido brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 62 p. (Cartilha, 1).
- 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**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutritional, biochemical and pharmaceutical potential of proteins and peptides from jatropha: review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6543-6555, 2010.
- FREDRIKSSON, S.-A.; HULST, A. G.; ARTURSSON, E.; JONG, A. L. de; NILSSON, C.; BAAR, B. L. M. van; Forensic identification of neat ricin and of ricin from crude castor bean extracts by mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 77, N. 6, p.1545-1555, 2005.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LIN, J.; CHEN, Y; XU, Y; YAN, F.; TANG, L.; CHEN, F. Cloning and expression of curcin, a ribosome-inactivating protein from the seeds of *Jatropha curcas*. **Acta Botanica Sinica**, v. 45, p. 858-863, 2003.
- 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.
- PEUMANS, W. J.; HAO, Q.; DAMME, E. J. M. van. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases. **FASEB Journal**, v. 15, n. 9, p. 1493-1506, 2001.
- VIVIANI, V. R.; BECHARA, E. J. H. Um prêmio Nobel por uma proteína brilhante. **Química Nova na Escola**, n. 30, p. 24-26, nov. 2008.

Comunicado Técnico, 170

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) 3622-9713
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição
 1ª impressão (2010): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virginia Martins da Matta*
Membros: *Andre Luis do Nascimento Gomes, Daniela de Grandi Castro Freitas, Luciana Sampaio de Araújo, Marcos Jose de Oliveira Fonseca, Marília Penteado Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Galhardo Borguini, Renata Torrezan*

Expediente

Supervisão editorial: *Renata Galhardo Borguini*
Revisão de texto: *Edmar das Mercês Penha*
Normalização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo*
Editoração eletrônica: *Marcos Moulin e André Luis do Nascimento Gomes*