



UTILIZAÇÃO DE BIOSSENSOR DE ELETRODO DE OURO MODIFICADO PARA DETERMINAÇÃO DE RICINA E RICINUS AGLUTININA EM FARELO DE MAMONA¹

João Bosco de Carvalho^I; Vitor Paulo Andrade da Silva^I; Roselayne Ferro Furtado^{III}; Carlucio Roberto Alves^I; Davide Rondina^{II}; Rosa Fireman Dutra^{IV};

^IDepartamento de Química, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700, 60740-000, Fortaleza – CE, Brasil, bosco_kashi@hotmail.com ; ^{II}Departamento de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700, 60740-000, Fortaleza – CE, Brasil, davide@pq.cnpq.br ; ^{III}Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dr. Sara Mesquita, 2270, Planalto Pici, 60511-110, roselayne@cnpq.embrapa.br ; ^{IV}Departamento de ciências biológicas, UPE, Recife - PE

RESUMO – O presente trabalho visa o desenvolvimento de um biossensor de eletrodo de ouro modificado para determinação de ricina (RCA 60) e ricinus aglutinina RCA (120). Verificou-se que o biossensor foi satisfatório na detecção de RCA 60 e RCA 120, tanto em solução tampão quanto em farelo de mamona. O dispositivo mostrou-se adequado para averiguação da qualidade do farelo de mamona quanto a presença das lectinas. O Limite de detecção encontrado foi de 4 ppm e o Limite de Quantificação foi de 14 ppm.

Palavras-chave- Biossensor, RCA 60, RCA 120, resíduo

INTRODUÇÃO

O potencial de uso da torta de mamona, co- produto gerado em grande quantidade no processo de produção do biodiesel, na forma de ração e tem ganhado incentivos visando a agregação de valor. Contudo, dentre outras proteínas encontram-se na torta de mamona: a ricina (RCA 60) e a ricinus aglutinina (RCA 120), proteínas nocivas a animais. A viabilização da torta de mamona como ração é feita após processo de destoxificação por diferentes métodos químicos e físico-químicos.

Após os processos de destoxificação, a ração deve ser submetida a análise quanto a presença das lectinas ricina e ricinus aglutinina. Métodos analíticos de detecção podem ser empregados para reconhecer tais lectinas presentes na torta de mamona e assim utilizá-la de forma segura.

¹ Embrapa, CNPq, Funcap, UECE





.O presente trabalho foi dedicado à detecção das lectinas ricina e ricinus aglutinina em torta de mamona para futuro uso agro-industrial, utilizando biossensor eletroquímico. Neste sentido, primeiramente, purificamos estas duas lectinas e posteriormente, estudamos a resposta do biossensor desenvolvido.

Ricina (RCA 60) e Ricinus aglutinina (RCA 120)

A ricina é a proteína tóxica presente em maior quantidade na torta de mamona e pequena quantidade desta proteína pode levar animais e ser humano a óbito em pouco tempo após a sua ingestão. A ricina é uma proteína inativadora de ribossomos (RIPs) do tipo II, heterodimérica, com a enzima inibidora de ribossomo (~32 kDa, cadeia A ou RTA) ligada por ponte dissulfeto a uma lectina galactose (~34 kDa, cadeia B ou RTB) (Lord et al., 1994). As doses letais de ricina para animais é em torno de 1 mg/kg (1 ppm) (Eiklid et al., 1980). No intuito de garantir o uso seguro da torta de mamona como ração é recomendado análise de amostras quanto a presença de ricina e ricinus aglutinina a cada processo de destoxificação. A aglutinina RCA 120 é um tetrâmero composto por duas cadeias A e B. As cadeias polipeptídicas de RCA 60 e RCA 120 são estruturalmente relacionadas e apresentam 93% e 84% de homologia entre as seqüências primárias das cadeias A e B, respectivamente. (Turton et al., 2004). Essa lectina possui alta atividade hemaglutinante.

Biossensor

Desde a década de 70 estuda-se a possibilidade de combinação de amperometria com a alta seletividade de reações catalizadas por enzimas com o intuito de determinar agentes biológicos e bioquímicos, dando origem a vários tipos de biossensores. O funcionamento destes aparelhos se dá através do contato da amostra de interesse com uma enzima ou anticorpo imobilizado provocando uma reação catalítica proporcional a quantidade do analito de interesse.(Durst et al.,1969).

Dentre as vantagens dos biossensores estão a alta seletividade e especificidade das interações, baixo custo, amplo aproveitamento seja este laboratorial ou industrial e fácil utilização.

METODOLOGIA

Extração e purificação das lectinas

As sementes de mamona foram descascadas, trituradas e prensadas para a retirada do óleo. A fim de eliminar o óleo residual, a amostra foi colocada em hexano por 16 horas, em recipiente fechado





e no dia seguinte, o hexano foi retirado e a amostra foi deixada em capela de exaustão para eliminação total do solvente. A amostra foi diluída em solução de NaCl 0,15M na proporção de 1:8, e foi deixada sob agitação por 30 minutos e centrifugada a 4 °C, 33.000 x g, por 20 minutos para separação do sobrenadante.

O sobrenadante foi conduzido a matriz de goma de guar e deixada em repouso por uma hora. A eluição das lectinas de interesse foi feita com 0,1M de glicina e NaCl 0,15M pH 2,6 em um fluxo de eluição de, aproximadamente, 0,5 mL/min. O material eluído foram dialisados contra água e, posteriormente, liofilizados e armazenados à temperatura ambiente ou em freezer (-20 °C), dentro de frascos bem vedados para evitar a entrada de umidade.

Obtenção do farelo de mamona

As lectinas foram purificadas utilizando cromatografia de afinidade de goma de guar segundo metodologia de (Appukutan et al., 1977). O farelo de mamona foi adquirido junto a Usina Bom - Brasil Oleo de Mamona Ltda. O tratamento de destoxicação do farelo mamona foi realizado com CaO conforme metodologia de Oliveira, (2008). Amostras do farelo de mamona in natura e destoxificado foram caracterizados por eletroforese SDS-Page e testes de hemaglutinação no intuito de comprovar a eficiência do tratamento químico (dados não mostrados).

Produção e purificação dos anticorpos policlonais

Anticorpos anti- RCA 60 e RCA 120 foram produzidos em coelhos da raça Nova Zelândia com seis meses de idade e purificados posteriormente conforme metodologia de Furtado (2008).

Imobilização e estudo eletroquímico

Eletrodo de ouro modificado foi imerso em solução de RCA 60 e RCA 120 por 1 hora e seguidamente foi feito bloqueio do sistema eletroquímico com BSA 3% por uma hora. Ao final, o eletrodo foi deixado em repouso em solução de anticorpo anti- RCA 60 e RCA 120 conjugado a peroxidase por duas horas. Após cada etapa, o eletrodo foi lavado com água deionizada a fim de retirar os não- ligantes. Determinação de RCA 60 e RCA 120 foi medida a partir da intensidade de corrente correspondente a redução eletroquímica da benzoquinona. Este composto é formado pela catalise da peroxidase em solução de H₂O₂ na presença de hidroquinona como mediador. Isso foi realizado por imergir o eletrodo de trabalho em solução tampão fosfato em pH 7,0 e aplicar uma voltagem de polarização de -100 mV para o eletrodo de platina contra um Ag/AgCl (Sat. KCl). Todas as medidas foram conduzidas a temperatura ambiente em solução purgadas com N₂ por 15 minutos. As medidas





na presença das lectinas foram sempre comparadas as sem lectinas para o cálculo da intensidade de corrente final.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos dados obtidos através do presente estudo e na curva de calibração (fig.1), determinou-se o limite de detecção (LD) (mais baixa concentração de do analito em questão que pode ser determinada com certo grau de confiabilidade.) e o limite de quantificação (LQ) (mais baixa concentração de do analito em questão que pode ser determinada de forma quantitativa com precisão e exatidão.). O LD foi calculado multiplicando por três o desvio padrão das medidas do branco e dividido pela inclinação da curva analítica. O LQ foi calculado multiplicando por dez o desvio padrão das medidas do branco e dividido pela inclinação da curva analítica. O LD foi de 4 ppm e o LQ = 14 ppm.

A resposta do biossensor em farelo não detoxificado e detoxificado foi distinta e maior alteração de corrente elétrica foi verificada para o farelo *in natura*, caracterizando assim uma resposta positiva do biossensor frente a detecção das lectinas (fig. 2).

CONCLUSÕES

Concluimos que o presente trabalho mostrou-se satisfatório na detecção de RCA 60 e RCA 120, tanto em solução tampão quanto em farelo de mamona. O dispositivo pode ser utilizado para averiguação da qualidade do farelo de mamona quanto a presença das lectinas. Novos estudos estão sendo realizados para melhorar os limites de detecção e quantificação, bem como o desenvolvimento de eletrodos descartáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPUKUTTAN, P. S., SUROLLA, A. and BACHHAWAT, B. K. Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. *Indian J. Biochem. Biophys.* v. 14, n.4, p.382-384. 1977.

DURST, R. A. Ion selective electrodes. Special publication. P.314. 1969.





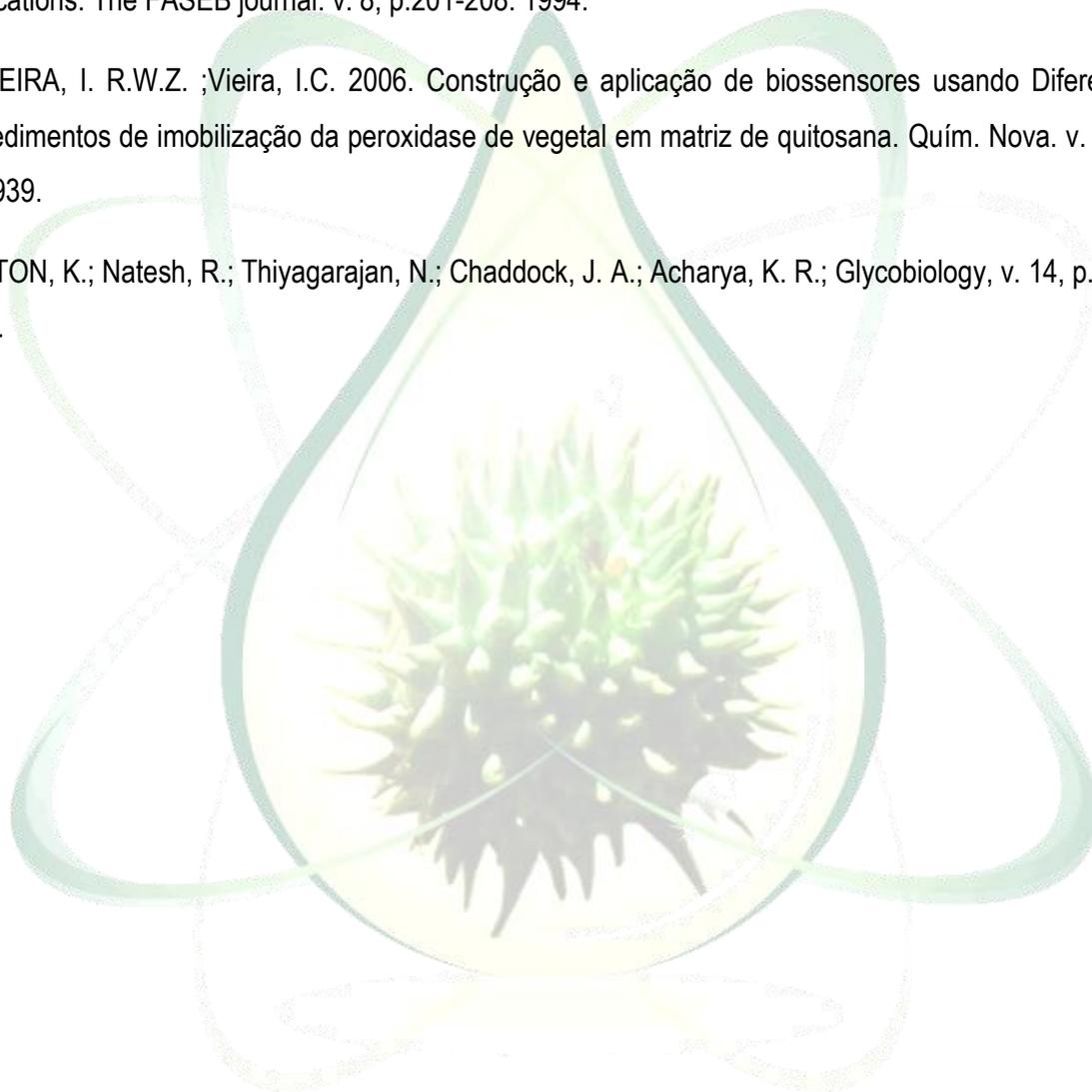
EIKLID K., OLSNES S., PIHL A. Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeL a cells. *Exp. Cell. Res.* v.126, p. 321–326. 1980.

FURTADO, R.F.; GUEDES, M.I.F.G; ALVES,C.R.; MOREIRA, A.C.O.M. Produção de anticorpos policlonais anti-ricina: metodologia científica. Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 17 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 116).

LORD, J.M.; ROBERTS, L.M.; ROBERTUS, J.D. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *The FASEB journal.* v. 8, p.201-208. 1994.

OLIVEIRA, I. R.W.Z. ;Vieira, I.C. 2006. Construção e aplicação de biossensores usando Diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. *Quím. Nova.* v. 29,p. 932-939.

TURTON, K.; Natesh, R.; Thiyagarajan, N.; Chaddock, J. A.; Acharya, K. R.; *Glycobiology*, v. 14, p. 923. 2004.



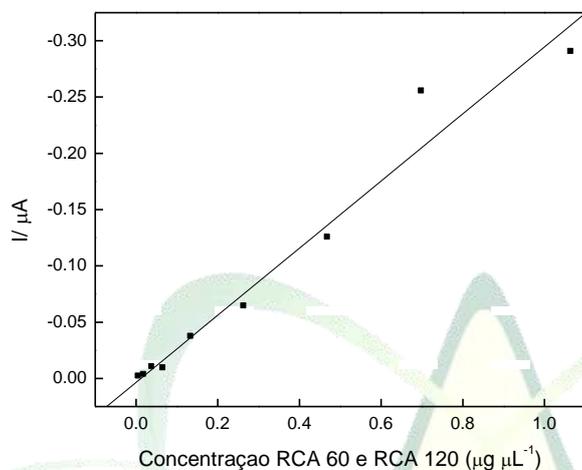


Figura 1- Curva analítica típica obtida para o biossensor em diferentes concentrações de RCA 60 e RCA 120 em tampão fosfato pH 7 em $35 \mu\text{mol L}^{-1}$ de hidroquinona e $60 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$. Potencial aplicado -110 mV (VS. ECS).

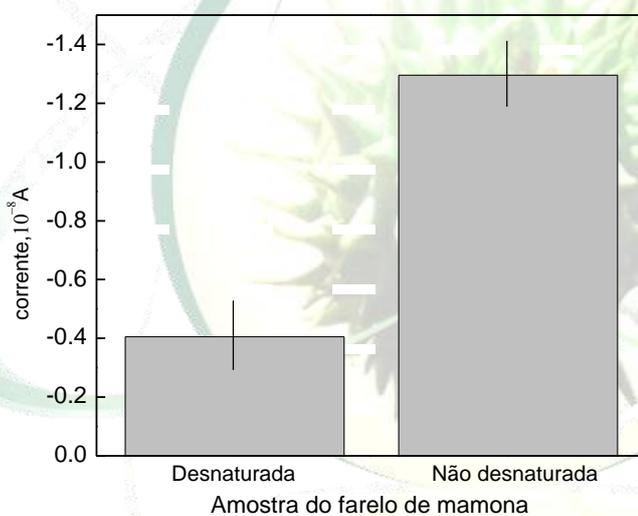


Figura 2- Determinação de RCA 60 e RCA 120 em amostras de farelo de mamona dstoxificado e não dstoxificado em tampão fosfato pH 7 e $35 \mu\text{mol}$ de hidroquinona e $60 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$. velocidade= 100 mVs^{-1} . Potencial aplicado -100 mV (VS. ECS). N=3.