



## DESENVOLVIMENTO DE UM BIOENSAIO PARA DETECÇÃO DA RICINA NA TORTA DE MAMONA SUBMETIDA A PROCESSOS DE DESTOXIFICAÇÃO\*

Keysson Vieira Fernandes<sup>1</sup> (keysson@gmail.com), Edésio José Tenório de Melo<sup>1</sup>, Mateus Gomes Godoy<sup>2</sup>, Zulmira Guimarães<sup>1</sup>, José Luiz Ascheri<sup>3</sup>, Olga Lima Tavares Machado<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Biotecnologia e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, RJ;

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, RJ;

<sup>3</sup>Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

**RESUMO** - A ricina é uma lectina tóxica a qual representa um risco à segurança, por isso sua rápida detecção é algo desejável. Os métodos atuais para a detecção de ricina consistem de identificação eletroforética ou vários ensaios baseados em anticorpos, que não são indicativos de uma molécula biologicamente ativa. O objetivo deste estudo foi desenvolver um bioensaio *in vitro* para a detecção da ricina biologicamente ativas na torta de mamona. As proteínas da torta de mamona foram extraídas com PBS. O extrato protéico foi incubado em cultura de células Vero. A ricina purificada foi utilizada em diferentes concentrações para determinar o limite de detecção para este teste. A concentração de células vivas após o tratamento foi determinada pela contagem de cultura e medida da atividade da lactato desidrogenase. Anticorpo anti-cadeia A de ricina foi usado para demonstrar a especificidade desta proteína. Nossos resultados mostraram uma diminuição considerável no crescimento em culturas de células tratadas com torta de mamona *in natura* e extrusada apenas. No entanto, a torta extrusada com adição de CaO 7% não foi tóxica para as células. O limite de detecção de ricina no teste proposto foi de 10 ng / mL. Assim, podemos concluir que o bioensaio proposto é uma maneira simples e rápida para detectar ricina em torta de mamona.

**Palavras-chave:** mamona, torta de mamona, ricina, detecção

### INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de oleaginosas, o que lhe confere um enorme potencial na produção de óleos vegetais e derivados. Entre os diversos produtos deste setor, o biodiesel é aquele que vem recebendo o maior destaque. Dentre as oleaginosas cogitadas para a produção de biodiesel no Brasil está a mamona (*Ricinus communis* L). Além do óleo de rícino, a mamona ainda oferece um outro produto de grande valor, a torta residual. Esta pode ser utilizada na adubação orgânica, e após passar por processos de destoxificação, pode ser utilizada na alimentação animal.

\* Financiamento: CNPq, FINEP, FAPERJ e EMBRAPA.





As principais substâncias tóxicas presentes na semente e, conseqüentemente, na torta de mamona são as albuminas 2S (proteínas alergênicas), a ricinina e a ricina. Dentre estas toxinas, aquela que oferece maiores complicações no reaproveitamento da torta para alimentação animal é a ricina. Tal toxina consiste em uma proteína inativadora de ribossomos (RIP) do tipo 2. É formada por uma cadeia A enzimaticamente ativa que vai agir inibindo a síntese protéica através da depuração do RNA ribossomal, e uma cadeia B ligante de galactose que permite a entrada da toxina na célula assim como seu transporte intracelular.

Atualmente existem muitos trabalhos envolvidos na destoxificação da torta de mamona através da eliminação ou inativação da ricina. No entanto, os ensaios existentes para validação do processo, na maioria das vezes avaliam apenas a presença ou ausência da toxina (testes baseados em reconhecimento por anticorpo e eletroforese, por exemplo). Para verificar se esta continua ativa, é necessário um ensaio biológico, que pode ser *in vivo* (geralmente requer mais tempo e infra estrutura para manter animais), ou *in vitro*. Essa necessidade de complementar ensaios pode tornar o método demorado e/ou elevar os custos de detecção da toxina.

O presente trabalho apresenta uma metodologia para detecção da ricina *in vitro*, baseado na contagem de células viáveis e na detecção de atividade da lactato desidrogenase liberada em cultura de células tratadas com extrato protéico de torta de mamona submetida a diferentes tratamentos de destoxificação.

## METODOLOGIA

*Purificação da ricina.* A ricina foi extraída a partir da torta de mamona e purificada seguindo a metodologia descrita por Anandan (2005). A quantidade de ricina foi estimada pelo método de Bradford (1976) e a qualidade do material foi avaliada por SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970). A sequência N-terminal parcial de uma das bandas vistas no gel foi obtida por degradação de Edman (1950).

*Extração de proteínas totais da torta.* Feita a partir das amostras de torta de mamona tratadas e *in natura* utilizando tampão PBS pH 7,0. A mistura foi mantida em agitação durante 3 horas em temperatura ambiente e em seguida submetidas à centrifugação a 14.000 rpm durante 15 minutos. A dosagem de proteínas totais foi feita pelo método de Bradford (1976).

*Preparo da cultura e incubação.* As células foram desprendidas de uma garrafa de 25 cm<sup>2</sup> contendo uma cultura em monocamada. Para isso foi utilizada uma solução de tripsina, durante 5 minutos à 37°C. As células foram ressuspendidas em meio DMEM. Esta suspensão foi dividida em uma





placa de 24 poços, na proporção de  $2,0 \times 10^4$  células por poço, e a cultura foi mantida à 37 °C. As amostras protéicas foram primeiramente esterilizadas em filtro de poro 0,22 mm. O material filtrado foi então incubado com as células, em duplicata, numa concentração de 10 µg/mL. Para determinar a especificidade da ricina, foi utilizado um ensaio conjugado com anticorpo anti-cadeia A (IgG de cabra). O anticorpo foi administrado na cultura de células (8 µg) juntamente com a amostra em teste.

*Determinação da toxicidade.* Para determinar o efeito tóxico das amostras sobre a cultura, foram realizadas: contagens de células nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas após a incubação; dosagem de lactato desidrogenase (LDH) nos tempos de 24 e 48 horas após a incubação, utilizando um kit Roche para detecção de LDH.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1A mostra por SDS-PAGE 12% que a ricina foi parcialmente purificada através da metodologia proposta (ANANDAN *et al.*, 2005). Foram detectadas três bandas, sendo duas delas (seta verde e azul) com massa molecular semelhante às cadeias A e B da ricina. A sequência N-terminal parcial (Figura 1B) da terceira banda (seta verde), determinada por degradação de Edman (Ile-Phe-Pro-Gln-Tyr-Pro-Met-Lys), apresentou identidade com a região N-terminal da cadeia A da ricina e da RCA.

Foi visto que o ensaio é capaz de detectar até 10 ng de ricina/mL (Figura 2). A cultura tratada com o anticorpo não sofreu com atividade tóxica, diferentemente da sua equivalente tratada apenas com ricina (1 µg/mL), onde houve morte celular. O teste pela dosagem de LDH mostrou-se tão eficiente quanto a contagem para a avaliação da morte celular.

Amostras de torta e rejeito (Petrobras, patente I0105888-6) de mamona submetidos a processos de destoxificação foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 3) e para citotoxicidade (Figura 4). Os tratamentos testados foram: Torta autoclavada, extrusada sem e com a adição de 4%, 6% e 7% de CaO (Ascheri *et al.*, 2007), e rejeito fermentado em estado sólido por 72 horas (Godoy *et al.*, 2009).

## CONCLUSÃO

Verificamos que o processo de extrusão por si só não destoxifica a torta de mamona (Tabela 1). No entanto a extrusão com adição de mais de 6% de CaO mostrou-se eficiente.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANDAN, S.; ANIL KUMAR, G. K.; GHOSH, J.; RAMACHANDRA, K. S. *Animal Feed Science and Technology*. v. 120, p. 159-168, 2005.

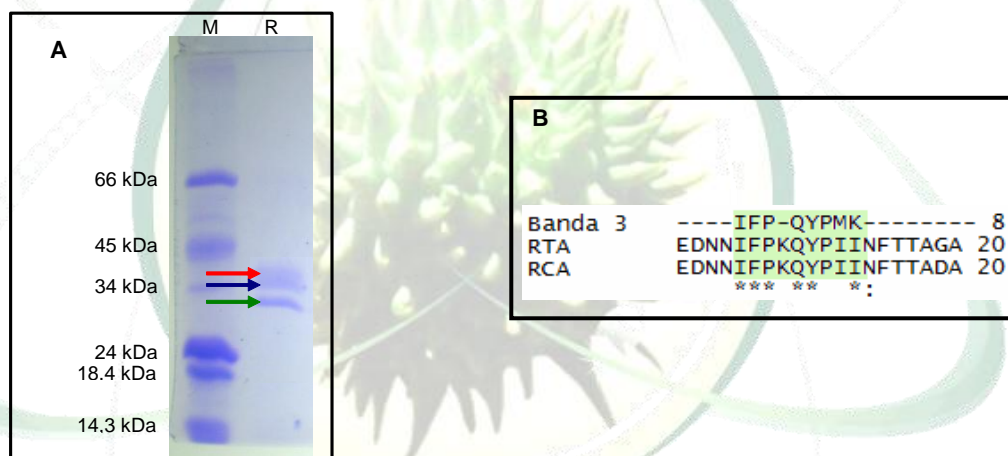
ASCHERI, J. L. R.; MACIEL, F. M.; CARVALHO, C. W.; FREITAS, S. C.; MACHADO, O. L. T. *Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel – Resumo Expandido*. Novembro 28-29, Brasília-DF, 2007.

BRADFORD, M. M. *Analytical Biochemistry*. v. 72, p. 248-254, 1976.

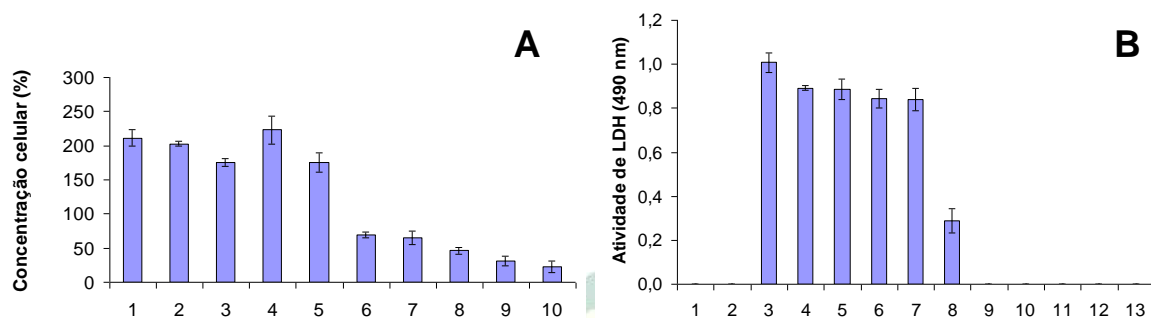
GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; MACIEL, F. M.; FELIX, S. P.; BEVILAQUA, J. B.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, D. M. G. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 44, p. 317-322, 2009.

LAEMMLI, U. K. *Nature*. v. 227, p. 680-685, 1970.

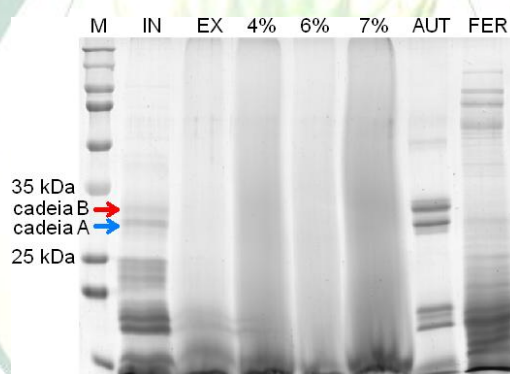
## FIGURAS E TABELAS



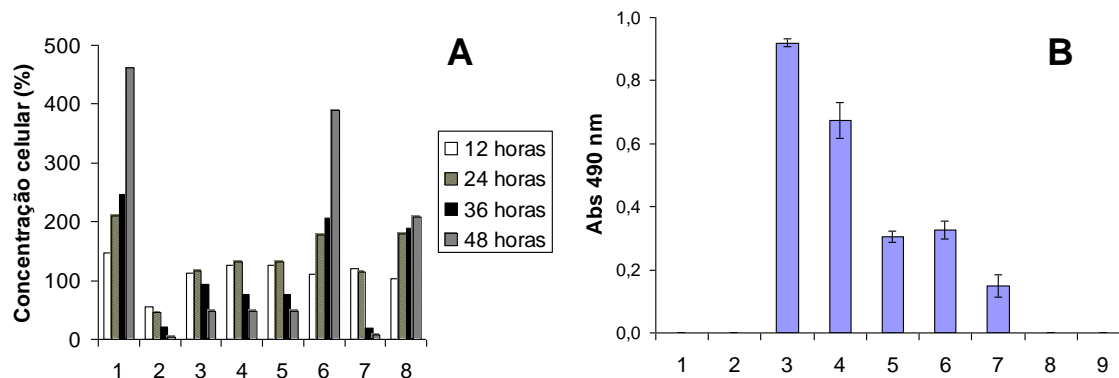
**Figura 1.** A) Visualização eletroforética em SDS-PAGE 12% da fração obtida ao fim da purificação, mostrando a presença de três bandas com massa entre 34 e 24 kDa. As setas indicam a cadeia A (verde) e provável B (azul) da ricina, e a provável cadeia A da aglutinina (vermelha). M = Marcador. B) Alinhamento, feito através do ClustalW2, da sequência obtida a partir da terceira banda, com a sequência N-terminal da cadeia A da ricina (RTA) e com a cadeia A da aglutinina de *R. communis* (RCA).



**Figura 2.** Comparativo entre a avaliação do teste de citotoxicidade através da contagem de células em microscópio ótico (A) e pela dosagem da atividade de lactato desidrogenase (B) após 24 horas de incubação. PBS pH 7,0 foi utilizado como controle negativo, e na dosagem de LDH utilizou-se DMEM como branco do ensaio. A) 1 = PBS pH 7,0; 2 = ricina 1µg/mL + IgG; 3 = 10 pg/mL; 4 = 100 pg/mL; 5 = 1 ng/mL; 6 = 10ng/mL; 7 = 100 ng/mL; 8 = 1µg/mL; 9 = 10 µg/mL; 10 = 100 µg/mL. B) 1 = DMEM; 2 = PBS pH 7,0; 3 = Triton 2%; 4 = 100 µg/mL; 5 = 10µg/mL; 6 = 1 µg/mL; 7 = 100 ng/mL; 8 = 10 ng/mL; 9 = 1ng/mL; 10 = 100 pg/mL; 11 = 10 pg/mL; 12 = 1pg/mL; 13 = 1µg/mL + IgG



**Figura 3.** SDS-PAGE para o extrato protéico de torta e rejeito de mamona submetidos a diferentes tipos de tratamento. As setas indicam as duas cadeias da ricina. M – Marcador; IN – In natura; EX – Extrusada; 4% - Extrusada com 4% de CaO; 6% - Extrusada com 6% de CaO; 7% - Extrusada com 7% de CaO; AUT – Autoclavada; FER – Fermentado por 72 horas.



**Figura 4.** Teste de citotoxicidade para o extrato protéico de torta e rejeito de mamona submetidos à diferentes tipos de tratamento. (A) Contagem de células por microscopia ótica; (B) Dosagem da atividade de LDH. Foi utilizado PBS pH 7,0 como controle negativo, e na dosagem de LDH utilizou-se DMEM como controle de *background*. A) 1 = PBS pH 7,0; 2 = In natura; 3 = Extrusada; 4 = Extrusada + CaO 4%; 5 = Extrusada + CaO 6%; 6 = Extrusada + CaO 7%; 7 = Autoclavada; 8 = Rejeito fermentado por 72 h. B) 1 = DMEM; 2 = PBS pH 7,0; 3 = In natura; 4 = Autoclavada; 5 = Extrusada; 6 = Extrusada + CaO 4%; 7 = Extrusada + CaO 6%; 8 = Extrusada + CaO 7%; 9 = Rejeito fermentado por 72 h.

**Tabela 1.** Comparativo entre a detecção da ricina na torta e no rejeito de mamona por SDS-PAGE e pelo ensaio de citotoxicidade proposto.

Amostra	SDS-PAGE	Citotoxicidade
Torta <i>in natura</i>	+	+
Torta extrusada	-	+
Torta extrusada + 4% CaO	-	+
Torta extrusada + 6% CaO	-	+
Torta extrusada + 7% CaO	-	-
Rejeito autoclavado	+	+
Rejeito fermentado 72h	-	-

+ Presença de ricina      - Ausência de ricina