

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE BIOPOLÍMERO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA: METODOLOGIA

MOREIRA, A. da S.¹; SOUZA, A. da S.²; VENDRUSCOLO, Claire T.^{1,3}

¹ Centro de Biotecnologia, ² Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial,

³ Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Cx. Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS

(Recebido para publicação em 27/07/98)

RESUMO

Método simplificado foi desenvolvido para detecção de monossacarídeos e seus ácidos derivados que fazem parte da composição de biopolímeros bacterianos obtidos por fermentação. Biopolímeros foram hidrolisados com ácido clorídrico 2N [3:100 (m/v)] em tubo fechado a 80°C por 16h, seguindo-se concentração em evaporador rotatório a 50°C e ressuspensão do concentrado em metanol. Esse material, após evaporação espontânea em capela de exaustão por 24h, foi cromatografado no sistema clorofórmio:metanol:ácido acético:água 40:40:10:10 (v/v/v/v) e gel de sílica F₂₅₄, utilizando-se anisaldeído sulfúrico como revelador. A co-cromatografia dos padrões e amostras (gelana®, xantana® e clairana), no sistema desenvolvido, proporcionou boa separação e diferenciação colorimétrica dos monossacarídeos e seus ácidos derivados, possibilitando a identificação dos componentes majoritários dos biopolímeros analisados. O sistema mostrou-se capaz de detectar a presença da maioria dos açúcares comuns aos biopolímeros bacterianos.

Palavras-chave: biopolímero, composição, cromatografia

ABSTRACT

METHODOLOGY FOR ANALYSIS OF BACTERIAL BIOPOLYMERS FOR THIN LAYER CHROMATOGRAPHY. A simplified methodology it was developed for the detection of the monosaccharides and its derived acids commonly found in bacterial biopolymers obtained by fermentation. The biopolymers were hydrolysed (total hydrolyse) with hydrochloric acid 2N [3:100 (w/v)] in closed tube for 80°C by 16h; were concentrated in rotating evaporator under vacuum at 50°C and the residues were suspended in methanol. After, the samples were left in rest, in a fume hood for 24h following through chromatography in the system chloroform:methanol:acetic acid:water, 40:40:10:10 (v/v/v/v) on sílica gel F₂₅₄, being used sulfuric anyzaldeide as discloser. The co-chromatography of the patterns and samples (gelanTM, xanthanTM and clairan,

polymers that are still in study phase) in the developed system, it provided a good separation and colorimetric differentiation of the monosaccharides and its derived acids, facilitating the identification of the majority components of the analyzed biopolymers. The system was shown capable to detect the presence of the most common sugars of the bacterial biopolymers.

Key words: biopolimers, composition, chromatography

INTRODUÇÃO

Os biopolímeros de origem bacteriana, polissacarídeos obtidos por fermentação, como a xantana® e gelana®, encontram vasto campo de aplicação (MILAS *et al.*, 1986 e SANDERSON, 1990). Podem ser utilizados como agentes espessantes, estabilizantes, geleificantes e emulsificantes e vêm progressivamente substituindo os polissacarídeos convencionais, como o amido e outros, principalmente em produtos da linha *light* e *diet* (RINAUDO, 1993; MARIUZZO *et al.*, 1993).

Os biopolímeros bacterianos, em razão de sua origem, para serem utilizados em produtos para consumo humano, como fármacos, cosméticos e alimentos, devem, além de ter a aprovação prévia dos órgãos competentes, passar por rigoroso controle de qualidade. Devido ao constante surgimento de novos biopolímeros, a tendência é que vários deles venham a ter seu uso liberado e regulamentado. Surge daí a necessidade de metodologias rápidas, eficientes, de baixa toxicidade, econômicas e polivalentes para a análise da composição química de biopolímeros.

A grande semelhança estrutural existente entre alguns monossacarídeos como glicose e manose faz com que seus R_f sejam muito próximos, dificultando a separação destes nos métodos cromatográficos clássicos, como a cromatografia em camada delgada comparativa. No entanto, estes métodos são os mais simples e econômicos, indicados quando o volume e frequência de análises não justificam o emprego de

métodos instrumentais complexos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os carboidratos em geral, por serem extremamente hidrófilos, requerem eluentes polares, que apresentam migração lenta. A maioria dos sistemas preconizados para cromatografia em papel de misturas de açúcares de baixo peso molecular, apesar de eficientes, exigem um tempo de desenvolvimento de 10h a 30h. Já os sistemas que utilizam gel de sílica como suporte são mais rápidos, com 40min a 4h de desenvolvimento, mas a resolução é limitada (MENZIES E SEAKINS, 1976).

Vários sistemas e eluentes foram testados com o objetivo de se obter uma rotina de análise cromatográfica adequada às necessidades e condições disponíveis em indústrias e laboratórios de pequeno porte, tornando economicamente viável a análise de um grande número de amostras. A literatura clássica referente a cromatografia em camada delgada (CCD) (MENZIES & SEAKINS, 1976; STHAL, 1965 e CONGREGADO, 1985) preconiza o uso da piridina, substância altamente tóxica, na maioria dos eluentes recomendados para a análise de açúcares.

Decorrente do exposto objetivou-se desenvolver metodologia simplificada para detectar as substâncias (monossacarídeos e seus ácidos derivados) que comumente fazem parte da composição de biopolímeros bacterianos obtidos por fermentações.

MATERIAL E MÉTODOS

O material constou de dois biopolímeros comerciais, gelana® e xantana® e de um produzido no CenBiot/UFPEL, denominado clairana.

O material foi dialisado contra água ultrapura por 48h a 4°C e hidrolisado totalmente, em tubo fechado, com HCl 2N [3:100 (m/v)] a 80°C por 16h, seguindo-se concentração em evaporador rotatório sob vácuo a 50°C até consistência de xarope, ressuspensão em metanol e evaporação espontânea por 24h em capela de exaustão, segundo metodologia proposta por VENDRUSCOLO (1995) e modificada por MOREIRA (1997).

A análise da composição química dos biopolímeros foi realizada através de CCDC e co-cromatografia em placas de gel de sílica F₂₅₄ com o seguinte eluente: clorofórmio: metanol: ácido acético: água, 40:40:10:10 (v/v/v/v). A revelação foi com anisaldeído sulfúrico e aquecimento com pistola até 200°C, seguindo-se visualização sob luz ultravioleta a 366nm. A identificação dos açúcares e ácidos foi pelo aquecimento das placas cromatográficas em duas etapas, sendo cada etapa documentada em cromatogramas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema clorofórmio:metanol:ácido acético:água 40:40:10:10 (v/v/v/v) e gel de sílica, com tempo de desenvolvimento de 35min para placas 10x5cm, mostrou-se rápido, se comparado aos que utilizam papel, com migração de 10-30h, e eficiente na separação da maioria dos componentes dos polímeros estudados. No entanto, devido a pequena diferenciação entre os R_f dos monossacarídeos glicose (0,43) e manose (0,45), esperados para a goma xantana (MILAS *et al.*, 1986) e galactose (0,39), presente na clairana, utilizou-se também a técnica de co-cromatografia, onde o padrão (amostra autêntica) e a amostra a ser analisada são aplicados concomitantemente, salientando na amostra a mancha correspondente ao padrão aplicado. Com esta técnica, os açúcares galactose, glicose e manose puderam ser diferenciados por suas colorações características que foram evidenciadas pelo incremento da mancha. A co-cromatografia no sistema desenvolvido, aliado ao revelador anisaldeído sulfúrico, preparado segundo WAGNER *et al.*, 1986, proporcionou boa separação e diferenciação colorimétrica dos componentes dos biopolímeros bacterianos, possibilitando a identificação de seus componentes majoritários. Foram identificados o ácido glicurônico (em todas as amostras) e os monossacarídeos esperados para a clairana (glicose, galactose e fucose), gelana (glicose e ramnose) e xantana (glicose e manose), como mostra a Tabela 1. O sistema proposto detectou a maioria dos açúcares comuns aos biopolímeros bacterianos.

Durante a revelação dos cromatogramas, a diferenciação colorimétrica dos açúcares foi mais nítida na fase inicial de aquecimento (MENZIES & SEAKINS, 1976); já o ácido glicurônico exige maior aquecimento, tornando-se visível quando a maioria dos açúcares já perdeu a coloração típica, tornando-se marrons. Devido a isso, a revelação e documentação dos cromatogramas foi em duas etapas.

TABELA 1. R_f das substâncias identificadas em biopolímeros

Substância	Biopolímero		
	Clairana	Gelana®	Xantana®
Ramnose	—	0,60	—
Fucose	0,57	—	—
Manose	—	—	0,45
Glicose	0,43	0,43	0,43
Galactose	0,39	—	—
Ácido glicurônico	0,13	0,13	0,13

CONCLUSÃO

Metodologia desenvolvida para determinação dos componentes de biopolímeros, por cromatografia em camada delgada com gel de sílica F₂₅₄ e com seguinte eluente: clorofórmio: metanol: ácido acético: água, 40:40:10:10 (v/v/v/v), permite concluir que é eficiente, rápida, de baixa toxicidade e adequada para a análise preliminar da composição química e controle de qualidade de biopolímeros bacterianos obtidos por fermentação.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à FAPERGS-Fundação de Amparo à Pesquisa no Rio Grande do Sul- e à CAPES pelo apoio financeiro prestado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONGREGADO, F.; ESTAÑOL, I.; ESPUNY, M.; FUSTÉ, M. C.; MANRESA, M. A.; MARQUES, A. M.; GUINÉA, J.; SIMON-PUJOL, M. D. Preliminary studies on the production and composition of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas sp* EPS-5028. *Biotechnology Letters*.v. 7, n. 12, p. 883-888, 1985.

JEANES, A. R.; ROGOVIN, P.; CADMUS, M. C.; SILMAN, R. W.; KNUTSON, C. A. Polysaccharide of *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. ARS-NC-51. Washington, D. C. Agriculture Research Service, U. S. Department of Agriculture, 1976.

MARIUZZO, D. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; SOUZA, M.; MAZIERO, G. C.; VENDRUSCOLO, C.T. Use of xanthan gum in nonfat cheese and low-fat dairy desserts. In: THE SEVENTH GUMS AND STABILISERS FOR THE FOOD INDUSTRY CONFERENCE, 7., Ohio, 1993. *Abstracts of posters*. P. 1988.

MENZIES, I. S. & SEAKINS, J. W. T. Sugars. In: SMITH, I. & SEAKINS, J. W. T. *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*. 4^a.ed., Chicago, William Heinemann, 1976, v. 1.

MILAS, M.; RINALDO, M.; TINLAND, B. Comparative Polymerization of xanthan gum by ultrasonic enzymic treatments. Rheological and structural properties. *Carb. Polym.*, v. 6, p. 95-107, 1986.

MOREIRA, A. da S. Análise da composição química por cromatografia em camada delgada e em papel de biopolímeros obtidos em diferentes meios de produção. Relatório (Bolsa Recém-Mestre FAPERGS). Centro de Biotecnologia, UFPEL, Pelotas, 1997.

RINALDO, M. On the relation structure-properties of some polysaccharides used in the food industry. In: NISHINARI, K; DOI, E. ed. *Food hydrocolloids*. New York: Plenum Press, 1993. p. 510.

SANDERSON, G. R. Gellan gum. *Applied Science*, v. 479, p. 201-232, 1990.

STHAL, E. *Thin-layer Chromatography*. 1 ed. Berlim: Springer-Verlag, 1965.

WAGNER, H.; BIADT, S. & ZGAINSKI, G. M. *Plant Drug Analysis*. New York, Springer-Verlag, 1984.

VENDRUSCOLO, C. T. Produção e caracterização do Biopolímero produzido por *Beijerinckia sp* isolada do solo cultivado com cana de açúcar da região de Ribeirão Preto-São Paulo-Brasil. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1995.