

# COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BIOPOLÍMERO DE *BEIJERINCKIA* sp 7070 POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

PADILHA, Francine F.<sup>1,2</sup>; DELLAGOSTIN, Odir A.<sup>2</sup>; VENDRUSCOLO, Claire T.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel,

<sup>2</sup> Centro de Biotecnologia, <sup>3</sup> Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, C.P. 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

(Recebido para publicação em 27/07/98)

## RESUMO

Determinou-se a composição química dos biopolímeros obtidos por *Beijerinckia* sp cepa 7070 em diferentes tempos de fermentação por cromatografia em camada delgada. *Beijerinckia* sp é uma bactéria Gram negativa, aeróbia, geralmente encontrada em solo de cana-de-açúcar. A produção de biopolímero foi em 24 e 36 horas a 24°C e 180rpm. As amostras do biopolímero foram dializadas contra água durante 48 horas, sendo precipitadas com álcool etílico P.A., seco e triturado. Após foi feita hidrólise ácida total com ácido clorídrico 2N em tubo fechado a 70°C por 16 horas. As amostras foram concentradas e os resíduos cromatografados, utilizando-se o sistema clorofórmio:etanol:água:ácido acético 40:40:10:10 (v:v:v:v), gel de sílica e anizaldeído sulfúrico como revelador. Os resultados evidenciaram que o tempo de fermentação influenciou no perfil cromatográfico, observando-se maior concentração de glicose, galactose e ácido glicurônico em 24 horas e de fucose em 36 horas.

Palavras-chave: Cromatografia, biopolímero, *Beijerinckia*

## ABSTRACT

CHEMICAL COMPOSITION OF BIOPOLYMER FROM *Beijerinckia* sp 7070 FOR THIN LAYER CHROMATOGRAPHY. We have determined the chemical composition of biopolymer produced by *Beijerinckia* sp strain 7070 in different fermentation time, by thin layer chromatography. *Beijerinckia* sp is a Gram-negative, aerobic bacteria, usually found in sugar cane soil. The biopolymer was obtained after 24 or 36 hours incubation, at 24°C and 180rpm. Samples of biopolymers were dialysed against water during 48 hours, precipitated with ethanol, dried and triturated. Then total acid hidrolisis was done with hydrochloric acid 2N in closed tube at 70°C for 16 hours. The samples were concentrated and the residues were submitted to chromatography, using the system chloroform:methanol:acetic acid:water, 40:40:10:10 (v:v:v:v) on silica gel F<sub>254</sub> and sulfuric anyzaldeide as

developer. The results showed that the fermentation time influenced the chromatographic profile, with a higher concentration of glucose, galactose and glucuronic acid at 24 hours and fucose at 36 hours.

Key words: chromatography, biopolymer, *Beijerinckia*

## INTRODUÇÃO

Os biopolímeros, polissacarídeos de origem microbiana, devido as suas características físico-químicas, como capacidade de atuar em baixas concentrações, em amplas faixas de pH e temperatura, estão sendo muito utilizados em diversos segmentos industriais (SCAMPARINI *et al.*, 1997). A potencialidade do uso, na indústria de alimentos, de biopolímeros bacterianos obtidos através de fermentação, é consenso na literatura afim. As propriedades funcionais dos biopolímeros são consideradas uma ferramenta poderosa para se criar novas texturas. Os biopolímeros possuem inúmeras aplicações como agentes estabilizantes, gelificantes e espessantes nas indústrias de alimentos, embora possam ser aplicados nas indústrias químicas, petroquímicas e têxteis. Os biopolímeros de interesse são os extracelulares, devido a sua maior facilidade de extração e purificação (SANDERSON & CLARK, 1983; VENDRUSCOLO, 1995; SCAMPARINI *et al.*, 1997).

No Brasil, estão sendo pesquisadas novas cepas bacterianas capazes de produzirem biopolímero extracelular com potencial de aplicação industrial. No entanto, muito pouco foi elucidado quanto aos parâmetros de fermentação para a obtenção destes biopolímeros. A pesquisa para o uso de novos biopolímeros envolve estudos relacionados a atuação em amplas faixas de pH e temperatura, concentração, comportamento reológico, determinação da estrutura química e otimização dos processos fermentativos (VENDRUSCOLO, 1995; MALDONADE, 1996; SCAMPARINI, 1997). Um biopolímero, para ser aplicado em produtos de consumo, deve ter a sua composição química elucidada a fim de assegurar a inexistência de

açúcares como rafinose, estequiose e celobiose que não são metabolizados pelo homem (MARIUZZO, 1996).

Muitos estudos tem sido desenvolvido relacionados com a composição química de biopolímeros, empregando variadas técnicas e dentre elas a cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) que permite a detecção dos açúcares componentes dos biopolímeros. Objetivou-se verificar a alteração na composição química decorrente de biopolímeros de *Beijerinckia* sp cepa 7070, produzidos em 24 e 36 horas de fermentação.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material constou de biopolímeros de *Beijerinckia* sp cepa 7070, obtidos por fermentações aeróbicas por 24 e 36 horas no Centro de Biotecnologia – UFPEL.

O material, na proporção de 4%, foi dissolvido em água purificada (destilada, filtrada e esterilizada) e dialisado contra água com a mesma pureza por 48 horas a 4°C. Foram usados sacos de diálise com capacidade de retenção de 12000 Daltons. Seguiu-se de precipitação com etanol absoluto na proporção 1:3 e secagem em estufa a 55°C até peso constante.

Três gramas do material, nessas condições foi hidrolisado 100 ml de ácido clorídrico 2N em tubo fechado a 70°C por 16 horas. Após, foi concentrada em evaporador rotatório, sob vácuo, a 50°C até consistência de xarope com posterior evaporação espontânea em capela de exaustão por 24h. O resíduo foi dissolvido em metanol.

O material hidrolisado foi identificado por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e co-cromatografia ascendente em placas flexíveis de alumínio com gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck), em cuba pré-equilibrada durante 50 minutos. Os eluentes foram clorofórmio:metanol:água:ácido acético, na proporção de 40:40:10:10 (v/v/v/v) (HEINZMANN, B.M., 1991 modificada por MOREIRA, 1997). As amostras foram aplicadas com capilares padronizados.

Os cromatogramas foram revelados com auxílio do reativo anisaldeído sulfúrico, com posterior aquecimento

a aproximadamente 200°C, segundo WAGNER *et al.* (1984), seguindo-se visualização em luz ultravioleta a 254nm e 336nm. O resultado foi comparado com os padrões aplicados de fucose, glicose, manose, galactose, ramnose, frutose, xilose, ribose e ácido glicurônico.

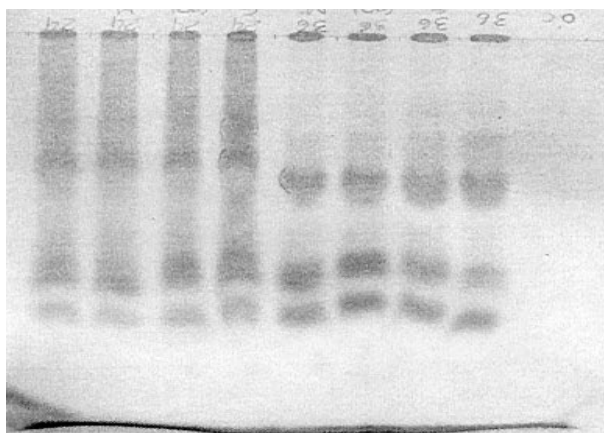
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na co-cromatografia em camada delgada comparativa, ascendente observou-se os seguintes compostos: glicose, galactose e fucose na composição do biopolímero de 24 e 36 horas. Pela cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), observou-se ainda a presença de um composto com coloração e R<sub>F</sub> característico do ácido glicurônico.

A composição dos polímeros de 24 e 36 horas apresentaram diferenças de perfil cromatográfico. O polímero de 24 horas apresentou duas manchas abaixo da galactose, enquanto o de 36 horas apresentou uma mancha. Estas manchas, pela coloração e R<sub>F</sub>, sugerem tratar-se de dissacarídeos (SMITH E SEAKINS, 1976) com R<sub>F</sub> inferior ao da sacarose que foi testada.

O biopolímero de 24 horas apresentou maior concentração de glicose, galactose e ácido glicurônico, e o de 36 horas maior concentração de fucose. Não foi detectado outros monossacarídeos como ramnose, frutose, ribose xilose e manose.

Na literatura não foi encontrado estudo de identificação comparativa da composição química dos biopolímeros em relação a influência do tempo de incubação. Entretanto, os biopolímeros de 24 e 36 horas mostraram diferenças em relação à composição química. Na Figura 1, observa-se a igualdade nos açúcares de 24 e 36 horas, referente à glicose, galactose, fucose e ácido glicurônico, sendo a diferença encontrada, nos dois dissacarídeos no biopolímero de 24 horas e um dissacarídeo encontrado no biopolímero de 36 horas, é semelhante à relatada por VENDRUSCOLO (1995) e LÓPEZ & BACKING (1968), em relação à presença de glicose, galactose e ácido glicurônico; por OHTANI *et al.* (1995), MARIUZZO (1996), e SCAMPARINI *et al.* (1997) quanto à presença de glicose, galactose e fucose.



**Figura 1** – Cromatograma das amostras de 24 e 36 horas de fermentação, com padrões de glicose (G), galactose (Gal), manose (M), ácido glicurônico (ác). Sistema: clorofórmio: metanol: ácido acético: água 40:40:10:10 (v:v:v:v), gel de sílica; revelador anilaldeído sulfúrico

## CONCLUSÃO

A cromatografia em camada delgada comparativa permite concluir que o tempo de fermentação altera a composição química do biopolímero sintetizado por *Beijerinckia* sp cepa 7070.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES e a FAPERGS pelo auxílio financeiro obtido através de projetos e bolsas de pesquisa. Ao Dr. Eloir Schenkel da Faculdade de Farmácia da UFRGS, a Angelita da Silveira Moreira, pela colaboração nas análises cromatográficas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LÓPEZ, R.; BACKING, J. H. Polysaccharide production by *Beijerinckia* and *Azotobacter*. *Microbiol. Espã.* v. 21, p. 53-75, 1968.
- MALDONADE, I. R. *Contribuição ao estudo dos parâmetros de fermentação por Beijerinckia sp.* Dissertação (Mestrado). UNICAMP, Campinas, 1996.
- MARIUZZO, D. M. *Contribuição ao estudo da estrutura química do exopolissacarídeo PS-32 obtido por fermentação aeróbica da bactéria Beijerinckia sp.* Dissertação (Mestrado). UNICAMP, Campinas, 1996.
- MOREIRA, A.S. *Relatório de Atividades: Bolsa de Recém-mestre (Análise da composição química por cromatografia em camada delgada e em papel de biopolímeros obtidos em diferentes meios de produção).* Pelotas: Centro de Biotecnologia, UFPEL, 1997.
- OHTANI, K.; YASUDA, S.; HIRUTA, O.; UOTANI, K.; TATSUTA, K.; MISAKI, A. Characterization of an extracellular polysaccharide elaborated by TX-1, a new strain of *Beijerinckia indica*. *Biosci., Biotech., Biochem.*, 59 (9), p. 1628-1631, 1995.
- SANDERSON, G. R.; CLARK, R. C. Laboratory-produced microbial polysaccharide has many potential food applications as a gelling, stabilizing and texturizing agent. *Food Technol.*, 37, p. 63-70, 1983.
- SCAMPARINI, A.; MARIUZZO, D.; FUJIHARA, H.; JACOBUSI, R.; VENDRUSCOLO, C. Structural studies of CV-70 polysaccharide. *Intern. J. Biol. Macromol.*, 21, p. 115-121, 1997.
- SMITH, I.; SEAKINS, J. W. T. *Cromatographic and Eletrophoretic techniques.* Chicago: Willian Heinemann, 1976.
- VENDRUSCOLO, C. T. *Produção e caracterização do biopolímero produzido por Beijerinckia sp isolada do solo da região de Ribeirão Preto - SP Brasil.* Tese (Doutorado). UNICAMP, Campinas, 1995.