



IX International Macromolecular
Colloquium

306628



6º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS

IX INTERNATIONAL MACROMOLECULAR COLLOQUIUM

11 a 15 de novembro de 2001
Centro de Convenções do Hotel Serrano
Gramado/RS

Promoção:



Associação Brasileira de Polímeros

Instituto de Química da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul (IQ/UFRGS)

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE BIOPOLÍMEROS SINTETIZADOS POR XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV PRUNI



Angelita da S. Moreira^{1*}, Claire. T. Vendruscolo¹, Griselda Galland², Lígia Furlan¹

^{1*} Centro de Biotecnologia da UFPel, Caixa Postal 354, 96010-900, Capão do Leão/RS – angelita@ufpel.tche.br;

¹ Centro de Biotecnologia da UFPel - claire@ufpel.tche.br; ¹Depto de Química Analítica e Inorgânica da UFPel – ligia@ufpel.tche.br; ²Instituto de Química da UFRGS.

Chemical Characterization of Xanthan Biopolymer Synthesized by Xanthomonas campestris pv pruni strains

In this work we describe the characterisation of Xanthan biopolymer synthesized by two *Xanthomonas campestris pv pruni* strains, in aerobic fermentation. By chromatography on TLC we could notice the presence of Mannose monomer in higher proportion in the 82 strain with relation to the another ones. The viscosity results showed the temperature dependence. The 06 and 82 strains had their viscosity increased whereas for the 87 strain we could observe a reduction with temperature increasing. The ¹³C NMR spectrum of 87 strain showed the characteristic signals at approximately 92.8, 70.4 and 61.4 ppm, attributed to C1, C4 and C6 from glucose monomer, with higher intensity.

Introdução

Biopolímeros são macromoléculas polissacarídicas de origem microbiana, isto é, produzidas por processos biológicos. Geralmente são capazes de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações.

Apesar das amplas possibilidades do uso de biopolímeros em alimentos, os mercados de consumo mais importantes para estes polissacarídeos são as indústrias de petróleo, de mineração, têxtil e termoquímica, de tintas de impressão, de papel, cosmética, farmacêutica, e de produtos agropecuários. Observa-se nesses setores uma contínua substituição dos polissacarídeos convencionais por produtos de origem microbiana.

Selecionar variedades de microrganismos que produzam polissacarídeos em quantidade e com propriedades economicamente interessantes é um desafio que vem sendo enfrentado por vários grupos de pesquisa

O biopolímero xantana foi o segundo a ser comercializado e o primeiro utilizado na indústria de alimentos (Kang *et al.*, 1983). A xantana consiste em um polissacarídeo aniônico, extra celular, de alto peso molecular, produzido durante o processo de fermentação aeróbica de culturas puras de *Xanthomonas campestris* em meio líquido (Lilly,

1958). Janson *et al.* (1975) determinaram a estrutura do biopolímero xantana produzido pelo patovar *Xanthomonas campestris pv campestris*. A mesma consiste de uma cadeia principal de unidades de *D* glucose unidas entre si por ligações β 1-4 com resíduos alternados de *D*-manose e ácido *D*-glicurônico, na proporção molar de 2:1, formando a cadeia lateral. O biopolímero xantana apresenta propriedades como a formação de soluções viscosas pseudoplásticas e géis (quando em associação com outros polímeros como as galactomanamas) em meio aquoso. A xantana, mesmo em baixas concentrações, mantém estas características numa ampla faixa de pH e temperatura e é compatível com sais minerais (Cottrell, 1980). Devido a estas características, vem sendo amplamente utilizada em vários setores industriais. Em alimentos, tem sido usada como agente espessante, estabilizante e até mesmo como emulsificante, possibilitando a criação de novos produtos com texturas únicas (Sanderson, 1990). É empregada também na área de cosméticos, principalmente como estabilizante e emulsificante, pela sua estabilidade e compatibilidade com vários sais. Na indústria de defensivos e outros produtos agrícolas é utilizada pela sua adesividade. (Marques *et al.*, 1986 e Rao, 1986)

Devido à grande aplicabilidade industrial da goma xantana, os microrganismos potencialmente produtores estão sendo objeto de estudos, bem como a otimização

das condições de crescimento celular, de produção, recuperação, e de purificação deste exopolissacarídeo.

As bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* são essencialmente fitopatogênicas (Hayword, 1993). Vários patovares de *Xanthomonas campestris*, particularmente, assim como outras espécies de *Xanthomonas*, produzem, em abundância, polissacarídeo extracelular denominado “goma xantana”. No entanto, as empresas produtoras deste biopolímero têm utilizado, tradicionalmente, o patovar *campestris*, mais especificamente a cepa NRRL B-1459 (Sutherland, 1993).

Por mais de vinte anos os fitopatologistas do centro de pesquisa EMBRAPA-CPACT têm isolado e identificado cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni*, que infestam os pomares de pessegueiros e ameixeiras do Rio Grande do Sul, principalmente. Entretanto, apenas recentemente iniciaram-se os estudos para produção de goma xantana por este patovar (Vendruscolo *et al.*, 1995).

Em estudo anterior, 18 cepas foram analisadas quando a produtividade, viscosidade e composição química do polímero xantana produzido (Moreira *et al.*, 2000). Quanto a composição química, analisada por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), os polímeros produzidos pelas cepas analisadas apresentaram composição química diferente da goma xantana comercial (pela presença da ramnose, ausente no polímero comercial). A análise cromatográfica revelou, também, prováveis diferenças quantitativas entre as cepas. Algumas cepas apresentaram predominância de manose no polímero, enquanto que outras de glicose e ramnose. Entretanto, o método usado não era conclusivo. Quanto a viscosidade dos polímeros, além de grande variação entre as cepas, observou-se ainda que os polímeros comportavam-se diferentemente em relação ao aumento de temperatura: alguns diminuíam, outros mantinham e ainda outros aumentavam sua viscosidade.

No presente trabalho, através da utilização de infra vermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C buscou-se a confirmação dos resultados anteriormente obtidos por CCDC e verificar a existência de uma relação entre a composição química e o comportamento da viscosidade em relação ao aumento de temperatura.

O comportamento da viscosidade frente a temperatura é relevante para a determinação do uso dos polímeros. Em alimentos que são aquecidos e bombeados, a diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura é importante, visto que diminui o gasto de energia durante o bombeamento. Por outro lado, a manutenção ou aumento da viscosidade com o aquecimento é interessante na extração de petróleo, onde o polímero é utilizado na manutenção da pressão hidrostática dos poços.

Experimental

Produção

Neste trabalho utilizou-se amostras de polímeros produzidos em fermentação aeróbica de *X. campestris* pv *pruni*.

Determinação da viscosidade aparente

As medidas de viscosidade das soluções aquosas a 3% dos biopolímeros foram efetuadas em viscosímetro Brookfield, modelo LV, nas temperaturas de 25°C e 65°C, nas velocidades de 6, 12, 30 e 60 rpm.

Caracterização cromatográfica

A determinação prévia dos monossacarídeos e derivados que compõem os biopolímeros foi realizada através de cromatografia em camada delgada. As amostras dos biopolímeros foram previamente dializadas a 4°C, contra água ultrapura por 24 h sob agitação, utilizando membranas semi permeáveis com capacidade de retenção de 12.000 Daltons. Após a diálise, as amostras foram hidrolizadas com HCl 2N, na proporção de 3:100 (m/v) a 80°C por 16 h, seguindo a metodologia de Moreira *et al.* (1998). O produto foi analisado por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) em placas flexíveis de alumínio (cromatofolhas) de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck), em cuba pré-equilibrada durante 10 minutos. Utilizou-se o seguinte eluente: clorofórmio-metanol-água-ácido acético, na proporção de 40:40:10:10 (v/v/v/v). As amostras foram aplicadas com capilares padronizados. Para a revelação utilizou-se anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C, durante 5 min (Moreira *et al.*, 1998). A caracterização dos constituintes foi realizada comparando-os com amostras autênticas de glicose, manose, ramnose e ácido glicurônico.

Caracterização por Infravermelho

Para as análises de IV os polímeros foram purificados por diálise em água ultra pura, recuperados por precipitação em álcool, secos e triturados em moinho de martelo. Os espectros de IV foram obtidos em pastilhas de KBr utilizando um espectrofotômetro Shimadzu, modelo DR 8001.

Caracterização por ressonância magnética nuclear de ^{13}C

As medidas de ^{13}C foram realizadas em espectrômetro Innova-300. Utilizou-se 90mg de cada amostra, purificada e triturada; foram diluídas em 1mL de D₂O e analisadas.

Resultados e Discussão

Pela análise dos gráficos de viscosidade (Figura 1), pode-se comprovar que todos os polímeros apresentaram comportamento pseudoplástico, característico da goma xantana. A cepa 87 teve sua viscosidade diminuída com o aumento da temperatura, a cepa 06, assim como a xantana comercial, praticamente mantiveram viscosidade estável,

enquanto que a cepa 82 aumentou a sua viscosidade (Figura 2).

As cepas 06 e 82 apresentaram, na análise cromatográfica, maior teor de manose. Já na cepa 87 houve predomínio da glicose e ramnose (Figura 3).

De modo a comprovar a existência de um maior conteúdo de ramnose na cepa 87, realizou-se um estudo de espectroscopia na região do infravermelho. A ramnose possui uma banda característica em torno de 1730 cm^{-1} que a diferencia dos açúcares glicose e manose, presente na xantana. Entretanto, nas xantanas, esta banda não pode ser observada pois encontra-se encoberta pela banda referente ao estiramento da carbonila do ácido glicurônico. Os espectros das amostras analisadas mostraram perfil característico de xantana, com pequenas diferenças entre eles. No entanto, não foi possível detectar o pico característico da ramnose. Já na análise de ressonância magnética nuclear de ^{13}C , apesar da qualidade ruim dos espectros, foram detectados sinais característicos em 92,8, 70,4 e 61,4 ppm, atribuídos aos C1, C4 e C6 do monômero glicose, (Cole et al., 2000) com intensidade maior no polímero da cepa 87, vindo assim corroborar com os estudos de CCD.

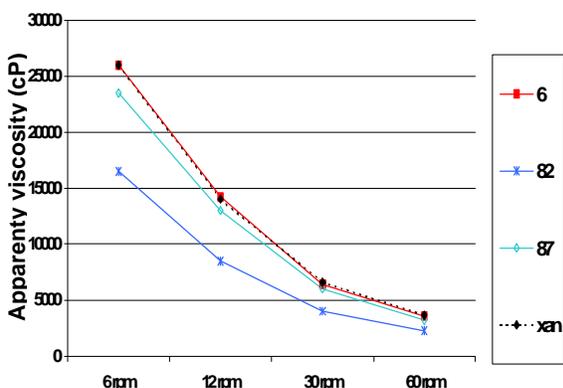


Figura 1. Viscosidade aparente dos polímeros das cepas 06, 82, 87 de *Xanthomonas campestris* pv pruni e xantana comercial a 25°C

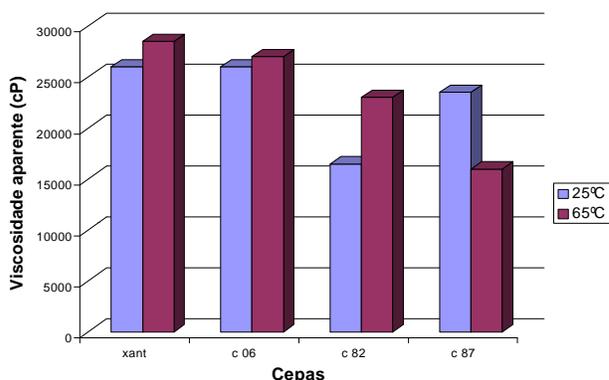


Figura 2. Viscosidade aparente das cepas 06, 82 e 87 de *X. campestris* pv pruni e xantana comercial medida a 6 rpm em diferentes temperaturas.

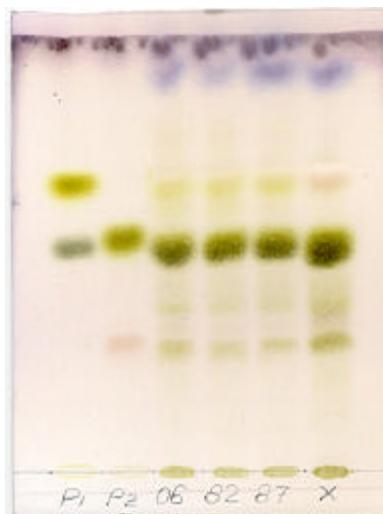


Figura 3. Cromatografia em camada delgada comparativa de xantana comercial (X) e polímeros das cepas 06, 82 e 87 de *Xanthomonas campestris* pv pruni. Padrões: P1 glicose (R_f 0,54), ramnose (R_f 0,69); P2 ácido glicurônico (R_f 0,30), manose (R_f 0,56). Eluída com clorofórmio-metanol-ácido acético-água (40:40:10:10 v/v/v/v); revelador anizaldeído sulfúrico.

Conclusões

A diferença no comportamento da viscosidade frente ao aumento de temperatura observada nos polímeros analisados é devida, possivelmente, a diferenças em suas composições química. Os resultados de ^{13}C NMR, em concordância com os resultados da análise cromatográfica, mostraram a presença do monômero glicose em maior proporção no polímero da cepa 87, que teve sua viscosidade diminuída com o aumento da temperatura. A glicose possui maior solubilidade em água que a manose, que parece predominar nos polímeros das cepas 82 e 06. A viscosidade dos polímeros é diretamente afetada pela sua solubilidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da FAPERGS e CNPq, e a cedência das cepas bacterianas pela EMBRAPA-CPACT.

Referências Bibliográficas

1. V. G Lilly.; H. A Wilson; J. G Leach., *Applied Microbiology*, 1958, 6, 105.
2. P.E. Jansson; L. Kenne; B. S. Lindberg., *Carbohydrate Research*, 1975, 45., 275.
3. I. W Cottrell. In: P. A. Sandford; K. Matsuda., *American Chemical Society*, New Yor, 1979, 251-270 (ACS Symposium Series, 126).
4. A M. Marqués; I. Estanol; J. M. Alsina; C. Fusté; D. Simon- Pujol; J. Guinea; F. Congregado. *Applied Environmental Microbiology* 1996, 5 (52), 1221.

5. M. A. Rao. In: M. A. Rao; S. S. Rizvi. *Engineering Properties of Foods*. Marcel Dekker, New York:, 1986.
6. G. R. Sanderson. *Appl. Science*, 1990, 479, 201.
7. A. C. Hayward. In: J. G. Swings; E. L. Civerolo. *Xanthomonas*, Chapman & Hall, London:, 1993.
8. I. W. Sutherlandn. In: J. G. Swings; E. L. Civerolo. *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London:, 1993.
9. C. T. Vendruscolo. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 1995.
10. A. S. Moreira ; C.T Vendruscolo; C. G. Turnes; J. L. S.Vendruscolo. 5Th International Hydrocolloids Conference, Raleigh North Caroline, USA, 2000, V.1, 77.
11. A. S. Moreira; A. S Souza; C.T Vendruscolo.. *Agrociência*, 1998,,3,. 222.
12. E. R. Cole; D. C. Craig; L J. Fitzpatrick; D. B. Hibbert; J. D. Stevens. *Carboh. Polymer*, 2000, 43, 105-112.