

## ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA DA CROMATOGRAFIA DE PERMEÇÃO EM GEL PARA DETERMINAR OS TAMANHOS DAS MOLÉCULAS DOS BIOPOLÍMEROS DE AMIDOS

*Analytical resources used in characterizing the molecular structure of starch polysaccharides*

Fábio Iachel da SILVA<sup>1</sup>

Cláudio CABELLO<sup>2</sup>

Aura Cristina Bruder PEREIRA<sup>3</sup>

### RESUMO

Esta pesquisa teve por objetivo adaptar uma metodologia de separação de moléculas por tamanho de cadeias, bem como determinar os tamanhos das cadeias dos biopolímeros amilose e amilopectina em uma amostra de fécula de mandioca. Foi utilizado um sistema completo para cromatografia de permeação em gel, para executar o fracionamento dos polissacarídeos; para caracterizar as frações permeadas e coletadas, foram utilizados diversos equipamentos, tais como analisador de carbono (TOC), evaporador rotativo, ultra – centrífuga, espectrofotômetro com varredura na região do UV-visível e detector por índice de refração. Importantes informações a respeito das estruturas moleculares dos biopolímeros foram obtidas a partir das análises de afinidade ao reagente iodato e relação entre os teores de carboidratos totais e açúcares redutores. Os resultados mostraram que a metodologia cromatográfica de permeação em gel a baixa pressão foi adequada, permitindo observar um perfil de separação referente aos tamanhos de cadeias poliméricas das amostras analisadas. Isto pode ser confirmado pelo fato de na permeação da amilose somente terem sido encontradas moléculas de tamanhos menores que 130 monômeros de glicose anidra, demonstrando que não havia contaminação por moléculas de amilopectina, que são muito maiores, além de na permeação da amilopectina ter apresentado apenas moléculas de maiores massas moleculares. Sendo assim, esta pesquisa comprovou que estas técnicas empregadas são úteis para separar as macromoléculas constituintes dos grânulos de amido e caracterizar suas estruturas moleculares.

**Palavras-chave:** carboidratos; equipamentos de laboratório; grau de polimerização; permeação em gel.

<sup>1</sup> Químico Mestre CERAT/UNESP - Fazenda Experimental Lageado, Rua José Barbosa de Barros, 1780. Cx Posta:1 237 CEP 18.610-307 Botucatu/SP, fiachelsilva@fca.unesp.br

<sup>2</sup> Professor Orientador CERAT/UNESP Botucatu, dircerat@fca.unesp.br

<sup>3</sup> Técnico Químico CERAT/UNESP Botucatu, auracbp@yahoo.com.br

## SUMMARY

*The objective of his study was to adapt a methodology for molecule separation by chain size, and to determine the molecular chain sizes of cassava starches. Results showed that gel permeation under low pressure was a suitable methodology for separating samples according to molecular chain size.*

**Keywords:** carbohydrates; laboratory equipment; polymerization degree; gel permeation.

## INTRODUÇÃO

O amido é um dos mais importantes biopolímeros utilizados para melhorar a qualidade sensorial e as propriedades tecnológicas dos alimentos. Sendo um componente natural, contribui para realçar propriedades características de alimentos feitos a partir de arroz, batata, milho, dentre outras fontes amiláceas. Também é adicionado para agir como espessante ou estabilizante de muitos produtos, tais como molhos, pudins, produtos de confeitaria, embutidos cárneos, sendo substituto de gorduras numa grande variedade de alimentos.

Quimicamente todos os amidos são iguais, sendo constituídos de resíduos de  $\alpha$ -D-glicose unidos através de ligações glicosídicas formando extensos polímeros. Entretanto, apresentam propriedades diversas conforme sua origem botânica.

Os grânulos de amido são compostos por dois tipos de polissacarídeos: a amilose, cujos monômeros de glicose estão ligados entre si através de ligações  $\alpha$ -1,4 formando uma extensa cadeia linear e a amilopectina, que é formada por monômeros de glicose unidos quimicamente uns aos outros através de ligações  $\alpha$ -1,4 formando uma cadeia linear principal, da qual saem ramificações por meio de

uma ligação  $\alpha$ -1,6 também formadas por moléculas de glicose (BOBBIO; BOBBIO, 1989).

A literatura relata a existência de moléculas de amilose e amilopectina de diferentes tamanhos de cadeias e conseqüentemente, diferentes massas moleculares. Essas diferenças entre os amidos podem ser verificadas através de metodologias analíticas físico-químicas, gerando informações relevantes para os diversos processos industriais que utilizam o amido como matéria prima.

As propriedades tecnológicas dos amidos estão correlacionadas com a estrutura molecular destas amiloses e amilopectinas que as compõem, e da forma como estão organizadas nos grânulos do amido. Estas relações entre a estrutura molecular e correspondentes propriedades funcionais dos amidos têm sido objeto de pesquisas (FREDRIKSSON et al., 1997).

O método clássico para realizar a separação do polissacarídeo amilose é efetuado por precipitação seletiva, utilizando-se a propriedade de sua complexação com 1-butanol e conseqüente separação por ultracentrifugação (WHISTLER, 1964). A aplicação deste mesmo procedimento repetidas vezes à fração de amilose precipitada, assegura uma razoável separação, obtendo-se então este

polissacarídeo com baixo teor de contaminação por amilopectina e/ou outras dextrinas, porém com uma manipulação prolongada e exaustiva.

Por esse motivo, o método escolhido para aperfeiçoar a separação da amilose e amilopectina foi a técnica da cromatografia de permeação em gel (GPC), conforme citado por Song e Jane (2000). Utilizou-se colunas cromatográficas contendo um gel específico para filtração, que separa os componentes das amostras através de peneiras moleculares, baseando-se em seus tamanhos e configurações geométricas. Deste modo pode-se obter por meio de permeações, várias frações dos polissacarídeos para posterior caracterização.

Segundo Collins et al. (1990) o gel é a fase estacionária em que uma fase móvel líquida, geralmente água, ocupa os poros da matriz. Ele possui características de tamanhos de partícula e poros homogêneos, química e fisicamente estáveis e sem propriedades de adsorção. Na separação de carboidratos, geralmente utiliza-se fase móvel água ou algum eluente tampão adequado e fase estacionária gel de dextrana. As moléculas pequenas percorrem pelo interior dos poros do gel e permeiam para a base da coluna, enquanto as moléculas maiores não conseguem percorrer pelo interior dos poros; assim, contornam as partículas do gel e caminham mais rapidamente para a base da coluna, eluindo antes das moléculas menores. As moléculas maiores são as primeiras a serem eluídas, posteriormente são eluídas as moléculas menores.

O uso da cromatografia de permeação em gel para separar e purificar proteínas tem sido

relatado. Entretanto, poucos trabalhos relatam o uso desta técnica para a separação de polissacarídeos e determinação de seus pesos moleculares. Ikawa et al. (1981) e Fuwa et al. (1992) permearam amidos de milho e arroz, respectivamente, tendo encontrado em ambos os casos perfis cromatográficos mostrando a existência de quatro faixas de tamanhos moleculares. Chen et al. (1997) demonstraram que devido a dificuldade de completa solubilização das amilopectinas em solventes aquosos, é muito difícil determinar a distribuição dos pesos moleculares dos polissacarídeos de amido.

Diante da importância da mandioca (*Manihot esculenta*) como fonte de amido e da necessidade de ajustes nas técnicas analíticas, este trabalho teve por objetivo adaptar uma metodologia de separação de moléculas de carboidratos presentes no amido de mandioca.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparo da amostra:

A amostra de fécula de mandioca foi obtida no laboratório de extração do CERAT – Centro de Raízes e Amidos Tropicais, Botucatu-SP.

A fécula foi desengordurada com etanol absoluto P.A. e posteriormente lavada três vezes com água destilada ( agitação, decantação e retirada do sobrenadante ). Foi levada a uma estufa a 35°C com circulação de ar durante 24 h e em seguida, foi seca completamente a 105°C.

Foi preparada uma suspensão aquosa da fécula a 2 %, sendo submetida ao aquecimento

gradativo, até atingir 95°C. Em seguida foram adicionados 40 mL de n-butanol P.A., sendo agitada por mais 15 minutos. Permaneceu em repouso durante 16 horas; posteriormente, o material foi centrifugado por 30 minutos a 11000 r.p.m. a 25°C, em uma ultra-centrífuga da marca Jouan (St. Herblain / França), modelo GR 20-22.

O líquido sobrenadante foi concentrado no evaporador rotativo da marca Büchi (Suíça), modelo rotavapor R-114, sob pressão reduzida e a amilopectina foi precipitada conforme descrito por Song e Jane (2000). Ao precipitado formado foram adicionados 50 mL de água destilada e aquecido à 95°C sob agitação até dissolução; após a filtração, a amostra foi dividida em duas frações: uma para ser injetada diretamente na coluna de permeação em gel e outra para ser submetida à hidrólise enzimática com isoamilase (IKAWA, 1981).

O precipitado gelatinoso obtido na centrifugação, composto pelo complexo amilose-butanol, teve sua superfície removida e a região central desse complexo foi novamente suspensa em água destilada e aquecida a 95°C sob agitação; novamente foram repetidas as etapas acima citadas, a partir da adição de n-butanol até a remoção da camada externa do gel.

A amilose também foi novamente suspensa em água destilada quente, em seguida foi filtrada e disponibilizada para a permeação.

### Permeações em gel

Foi usado um sistema completo para cromatografia de permeação em gel, constituído de colunas, géis cromatográficos, coletor automático das frações permeadas, bomba peristáltica, kit de proteínas de pesos moleculares padrões, carboidrato de peso molecular padrão e outros acessórios fornecidos pela Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont – Buckinghamshire / Inglaterra).

Para a desramificação das amilopectinas, foi empregada enzima isoamilase purificada (Sigma) e solução de hidróxido de sódio P.A. a 1 mol.L<sup>-1</sup>. Para a caracterização das frações coletadas, foram utilizados: analisador de carbono orgânico total (TOC), da Shimadzu Corporation (Sydney / Austrália), modelo TOC 5000 A; espectrofotômetro UV-visível com varredura de 190 a 1100 nm da marca Varian (Austrália), modelo Cary 50 Bio e analisador de índice de refração, da marca LDC (Riviera Beach – Flórida / USA), modelo Refracto Monitor IV.

As frações amilose e a amilopectina intactas foram permeadas separadamente em uma coluna preenchida com 85 cm de gel Sepharose CL-2B, sob um fluxo de 20 mL.h<sup>-1</sup>, usando a fase móvel citada por Song e Jane (2000). As frações foram coletadas automaticamente em volumes de 100 gotas por tubo (equivalentes a aproximadamente 3 mL).

A amilopectina desramificada foi permeada em uma coluna preenchida com 60 cm de gel Sephadex G-75, sob um fluxo de 20 mL.h<sup>-1</sup>, usando a fase móvel citada por Song e Jane (2000). As frações foram coletadas de modo idêntico às outras amostras.

O gel Sepharose CL-2B tem faixa de exclusão para dextrinas estimada na faixa de 7 x 10<sup>4</sup> a 4 x 10<sup>7</sup> Daltons. O gel Sephadex G-75 que tem faixa de exclusão para dextrina estimada na faixa de 1 x 10<sup>3</sup> a 1 x 10<sup>4</sup> Daltons.

Todas as frações coletadas foram analisadas com o objetivo de identificar a presença de carboidratos através da leitura do índice de refração, em refratômetro, enquanto os açúcares redutores e carboidratos totais foram determinados pelo método proposto por Somogyi (1945) e Nelson (1944). Para determinar os tamanhos médios dos polissacarídeos coletados nas frações, calculou-se a razão entre a concentração de carboidratos totais pela concentração de açúcares redutores.

As frações que apresentavam maiores índices de refração foram analisadas no TOC e os resultados foram convertidos de ppm de carbono para g/L de carboidrato, através da equação estequiométrica:

$$\text{Carboidrato (g/L)} = \frac{\text{TOC (ppm C)} \times 2,25}{1000}$$

onde: 2,25 = fator estequiométrico para transformar de ppm de carbono para mg de carboidrato;

1000 = fator para transformar de mg para grama.

O equipamento analisador de carbono (TOC) foi programado para aspirar 16 µL da

amostra homogeneizada e um fluxo de ar sintético arrastava a amostra para um forno de alumina aquecido a 680°C, o que fazia com que todos os átomos de carbono originários de compostos orgânicos fossem oxidados a CO<sub>2</sub>, sendo este em seguida detectado e quantificado em um espectrômetro de infra-vermelho previamente calibrado mediante uma curva com soluções-padrão de hidrogenofalato de potássio de concentrações conhecidas.

As leituras no TOC foram realizadas em triplicata e o próprio *software* do equipamento já apresentava o resultado médio do teor de carbono, em mg/L ou p.p.m.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os gráficos das Figuras 1, 2 e 3 apresentam os perfis da amilose, amilopectina e amilopectina desramificada que foram permeadas, além dos valores de comprimento de onda de máxima absorção do complexo de iodo-biopolímero.

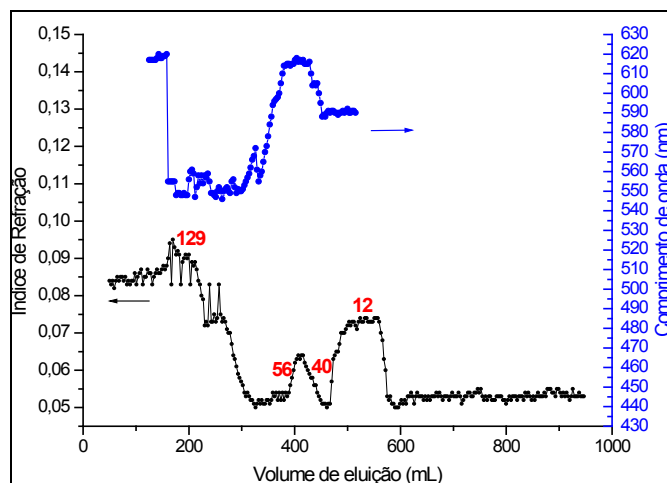


Figura 1. Perfil cromatográfico da amilose.

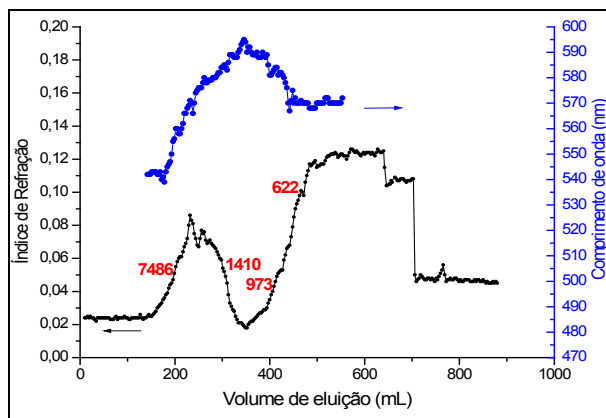


Figura 2. Perfil cromatográfico da amilopectina.

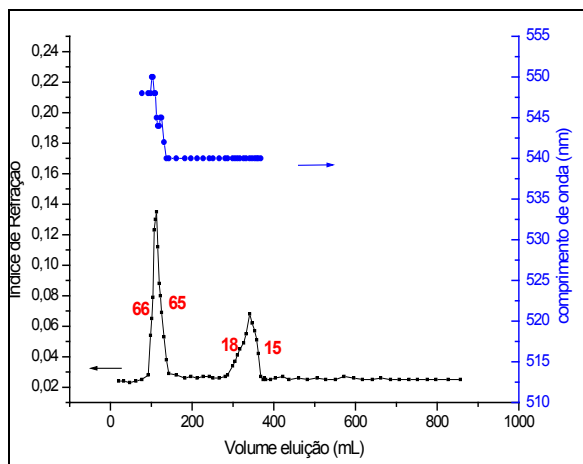


Figura 3. Perfil cromatográfico da amilopectina tratada com isoamilase.

Os números expressos acima da linha preta pontilhada indicam os tamanhos médios das cadeias poliméricas (GP ou grau de polimerização) naquela região da eluição.

Se os biopolímeros não tivessem sido previamente separados, as amilopectinas teriam eluído primeiro, devido aos seus maiores raios hidrodinâmicos; Segundo Ring et al. (1985) o raio de giração das amilopectinas estariam em torno de 21 a 79 nm e em comparação com o das amiloses que situam-se

na faixa de 7 a 22 nm, esperava-se que as amilopectinas fossem eluídas antes das amiloses.

Segundo Mua e Jackson (1997) as cadeias poliméricas das amiloses apresentam peso molecular numa faixa de  $1,03$  a  $4,89 \times 10^5$  Daltons, em média, contra  $7,08$  a  $9,88 \times 10^7$  Daltons apresentados pelas amilopectinas. Portanto, teoricamente as amilopectinas deveriam eluir em primeiro lugar devido ao seu maior peso molecular.

Nota-se como foi previsto teoricamente, que as moléculas de maiores pesos e tamanhos moleculares eluíram primeiro em relação às menores.

Gérard et al. (2001) utilizaram um sistema de cromatografia com altura de leito de 200 cm e vazão de 10 mL/h, ou seja, o leito foi o triplo e a vazão foi a metade da utilizada neste trabalho e mesmo assim a separação não atingiu a resolução daquela observada em outros trabalhos que utilizam a desramificação das amilopectinas de modo a facilitar a permeação.

No trabalho de Gérard et al. (2001) também se correlacionaram os valores de absorção máxima de cada fração de carboidrato coletada e complexada com iodo, de modo que num perfil de eluição foi possível ver as transições dos tipos de biopolímeros que estavam sendo eluídos.

A distribuição do tamanho das cadeias ramificadas foi mensurada utilizando-se enzima isoamilase que hidrolisa ligações tipo  $\alpha$ -1,6 e, deste modo, somente cadeias lineares ficaram presentes na solução.

Sendo assim, aproximações podem ser

inferidas para observar semelhanças entre os materiais analisados, quais sejam: para as frações de peso molecular maior, em torno de  $9 \times 10^5$  Da, a absorção máxima ocorre em torno de 550 a 570 nm, característico de amilopectina e amilose de baixo peso molecular; e para as frações de peso molecular menor, em torno de  $4 \times 10^4$  Da, a absorção máxima ocorre na faixa de 575 a 610 nm que é característica de cadeias mais lineares de amilose e amilopectina.

Hizukuri (1985) demonstrou que moléculas de amilopectinas contêm vários tipos de cadeias (A, B e C) com diferenças estruturais. As do tipo A não possuem ramificações e são ligadas às cadeias tipo B e não formam outras cadeias; as do tipo B são classificadas ainda em B1 a B4 ligadas a outras do tipo A ou B; e cadeias do tipo C que têm a extremidade redutora das moléculas. O comprimento das cadeias A e B1 são de 14 a 18 unidades glicose; da B2 à B4 são de 45 a 55 unidades. A relação molar entre as cadeias longas e curtas é influenciada pela fonte e variedade das matérias-primas vegetais dos amidos e variam entre 3:1 e 2:1.

Hizukuri (1985) também mostrou que o amido das tuberosas contém poucas cadeias curtas e maior quantidade de cadeias longas em relação às amilopectinas dos cereais, o que pode ser observado nos ensaios realizados, pela área dos picos nos gráficos.

Ong et al. (1994) verificaram o grau de polimerização de amilose de mandioca em torno de 3.642 unidades e concluíram que a distribuição das cadeias de amilose e amilopectina depende criticamente do método

analítico empregado. Utilizaram a cromatografia de alta resolução com coluna de exclusão por tamanho molecular e dois detectores: i) MALLS (*multi-angle-laser-light-scattering*) e, ii) RI (detector refratométrico diferencial) para avaliar as massas moleculares da amilose e o tamanho das cadeias da amilopectina simultaneamente, ou seja, sem isolamento prévio destes biopolímeros. Verificaram também que as massas moleculares da amilose nos amidos que não tinham sido fracionados para separar amilose da amilopectina, eram significativamente maiores que os valores relatados na literatura para amilose previamente fracionada.

## CONCLUSÕES

Esta pesquisa demonstrou que a metodologia de permeação em gel é uma ferramenta analítica de operação simples e os resultados obtidos permitiram verificar a separação das macromoléculas presentes no amido estudado, bem como a determinação dos graus de polimerização de cada grupo de frações obtidas.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela aquisição do sistema completo de permeação em gel;

Ao CERAT – Centro de Raízes e Amidos Tropicais, por permitir o uso de toda a infraestrutura para a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1989. p. 11-70.
- CHEN, Y.; FRINGANT, C.; RINAUDO, M. Molecular characterization of starch by SEC: dependance of the performance on the amylopectin content. **Carbohydrate Polymers**, 33, p.73-78, 1997.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos Cromatográficos**. 4<sup>a</sup> ed. rev. e amp. Campinas: Editora da Unicamp, 1990. p. 95-115.
- FREDRIKSSON, H.; ANDERSSON, R.; KOCH, K.; AMAN, P. Calibration of a size-exclusion chromatography system using fractions with defined amylopectin unit chains. **Journal of Chromatography A**, 768, p. 325-328, 1997.
- GÉRARD, C.; BARRON, C.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V. Amylose determination in genetically modified starches. **Carbohydrate Polymers**, 44, p. 19-27, 2001.
- HIZUKURI, S. Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. **Carbohydrate Research**, v. 141, p. 295-306, 1985.
- IKAWA, Y.; GLOVER, D. V.; SUGIMOTO, Y.; FUWA, H. Some structural characteristics of starches of maize having a specific genetic background. **Starch**, 33 (1981), 9-13.
- MUA, J. P.; JACKSON, D. S. Relationships between functional attributes and molecular structures of amylose and amylopectin fractions from corn starch. **J.Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 3848-3854, 1997.
- NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.**, 153, p. 375-380, 1944.
- ONG, M. H.; JUMEL, K.; TOKARCZUK, P. F.; BLANSHARD, J. M. V.; HARDING, S. E. Simultaneous determinations of the molecular weight distributions of amyloses and the fine structures of amylopectins of native starches. **Carbohydrate Research**, v. 260, p. 99-117, 1994.
- RING, S. G.; I'ANSON, K. J.; MORRIS, V. J. Static and dynamic light scattering studies of amylose solutions. **Macromolecules**, v. 18, p. 182-188, 1985.
- SOMOGYI, M. Determination of blood sugar. **J.Biol.Chem.**, Baltimore, n. 160, p. 69-73, 1945.
- SONG, Y.; JANE, J. Characterization of barley starches of waxy, normal, and high amylose varieties. **Carbohydrate Polymers**, 41, (2000), 365-377.
- WHISTLER, R. L. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, Academic Press, New York, 1964. p. 28-29.