

Monitorização do Processo de Purificação de Gomas Naturais: Goma do Cajueiro

Sônia M.O. Costa, Judith F. Rodrigues e Regina C.M. de Paula

Resumo: Na tentativa de obtenção de uma goma de elevado grau de pureza e totalmente na forma de sal de sódio, foi desenvolvido um método de purificação envolvendo quatro estágios. O primeiro desses estágios, o isolamento, seguiu o procedimento desenvolvido por Rodrigues *et al.*¹. Os dois seguintes, denominados primeira e segunda purificações, envolveram repetidas dissoluções em H₂O, a primeira delas em presença de NaCl, com subseqüentes precipitações com etanol. No último deles, utilizou-se troca iônica e liofilização. Os vários estágios foram monitorados pelo teor de cinzas, umidade, proteína e de cátions presentes. O teor de ácidos urônicos, a viscosidade intrínseca e a distribuição de massa molar por GPC foram também determinados ao longo das purificações. A goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) foi utilizada como substância-teste.

Palavras-chave: Goma, polissacarídeo, purificação, cajueiro, *Anacardium occidentale*

Introdução

Gomas naturais são polissacarídeos que sofrem hidratação em água fria ou quente, formando dispersões coloidais, soluções altamente viscosas ou até mesmo géis. Elas podem ser obtidas de exsudatos de árvore, de sementes, de algas ou por fermentação microbiológica. Suas impurezas mais freqüentes são os sais inorgânicos e outras substâncias de baixa massa molar, além de proteínas, ligninas e ácidos nucléicos^{2,3}. A retirada dessas impurezas é inicialmente feita por meio de um processo denominado isolamento.

Rodrigues *et al.*¹ compararam dois métodos de isolamento de gomas naturais, o de Anderson⁴, que é efetuado pela trituração, dissolução em H₂O fria,

filtrações, diálise e liofilização e o outro de Rinaudo e Milas⁵, que utiliza trituração, dissolução em H₂O com ajuste de pH e à temperatura ambiente, filtração e precipitação com etanol. O método Rinaudo e Milas foi considerado o melhor por apresentar maior rapidez do processo, maior rendimento, menor possibilidade de contaminação e maior homogeneidade do material isolado.

Rinaudo e Milas⁵ aconselham a utilização de mais dois estágios (primeira e segunda purificações) para tornar completa a purificação de gomas, transformando-as totalmente em sal de Na. Um processo global de purificação de gomas, incluindo o isolamento, os dois estágios de purificação e um último de liofilização, será testado e monitorado por meio do teor de cinzas, umidade, proteína e de cátions

Sônia M.O. Costa, Centro de Ciências Exatas, Tecnológicas e Agrárias, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Av. da Universidade, 850, C.P. D-3, CEP 62040-370, Sobral - CE; **Judith F. Rodrigues e Regina C.M. de Paula**, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, CP 12.200, CEP 60455-760, Fortaleza - CE.

presentes. O teor de ácidos urônicos, a viscosidade intrínseca e a distribuição de massa molar também serão determinados ao longo das purificações. A goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) foi utilizada como substância-teste.

A goma do cajueiro é um heteropolissacarídeo ácido ramificado contendo os seguintes constituintes principais: galactose, arabinose, ramnose, glicose, ácido glicurônico, além de pequenas quantidades de manose, xilose e ácido metilglicurônico⁶. A sua composição percentual depende da origem. As gomas indiana e papuana contêm aproximadamente 60% de galactose, 15 % de arabinose, 9% de glicose e 7% de ramnose⁴. Já a goma brasileira contém em torno de 70% de galactose, apenas 5% de arabinose, 11% de glicose e 4% de ramnose⁷. O teor de ácido glicurônico é aproximadamente o mesmo (~6%), independentemente da origem da goma^{4,7}.

Experimental

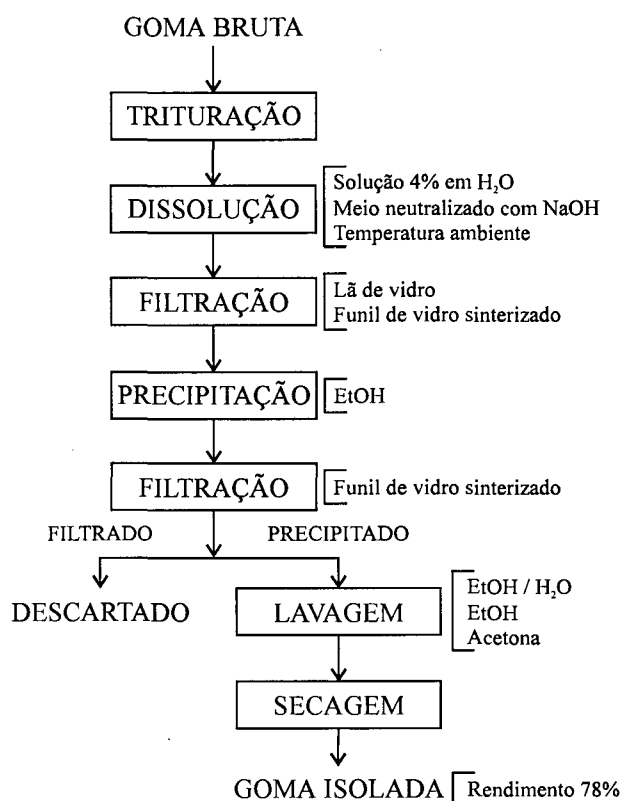
Processo de purificação

A goma bruta foi coletada em julho de 1990 de exsudatos naturais de cajueiros do tipo comum, produtores de fruto de cor laranja. A plantação experimental é proveniente da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e está localizada no município de Pacajus (Ceará). No estágio de isolamento, como sugerido por Rodrigues *et al.*¹, a goma bruta foi separada da maior parte das suas impurezas e seus constituintes ácidos neutralizados (Fluxograma 1).

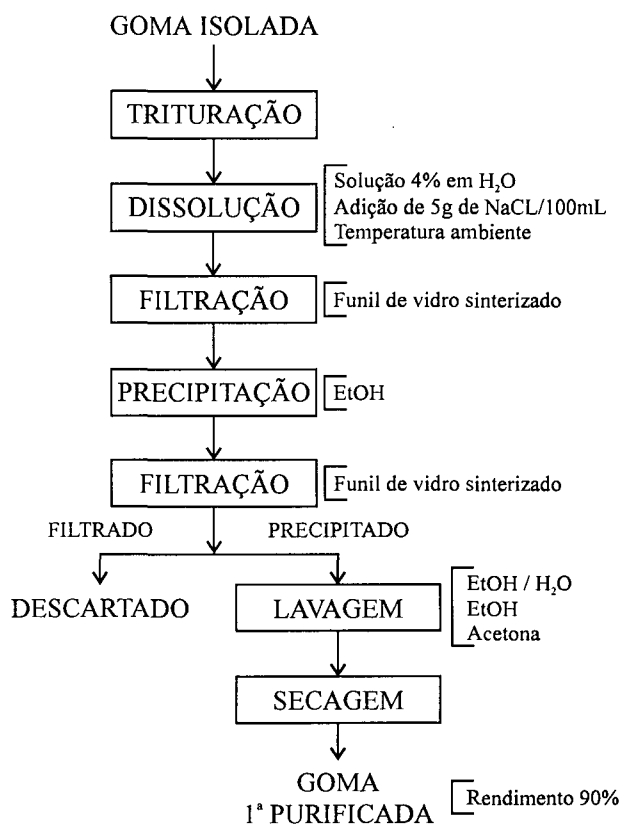
A primeira purificação teve como objetivo substituir os cátions presentes na goma (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}) por Na^+ , por meio da adição de excesso de cloreto de sódio, e retirar as impurezas ainda presentes. Nesse estágio, foram dissolvidos 4 g da goma isolada em 100 mL de H_2O , na presença de 5 g de NaCl, e o sistema foi submetido às seguintes etapas: filtração, precipitação, nova filtração e lavagem do precipitado (Fluxograma 2).

O excesso de NaCl que precipitou com a goma na primeira purificação foi eliminado na segunda purificação (Fluxograma 3). Para realizar essa segunda purificação, cada alíquota de 3 g foi dissolvida em 100 mL de H_2O e submetida às mesmas etapas citadas na primeira purificação.

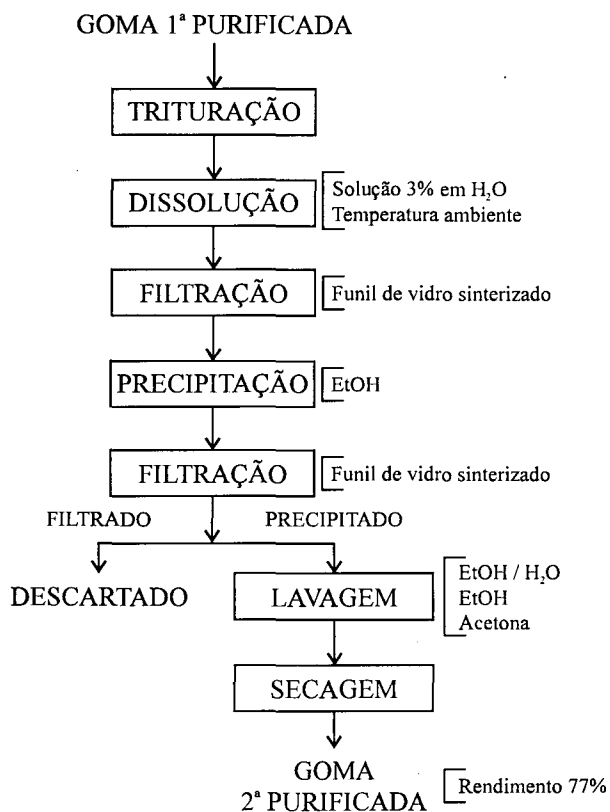
Para garantir a goma totalmente na forma de sal de Na, foi feita uma eluição em uma coluna de troca iônica tipo amberlite IR-120H⁺. A troca dos íons H^+ por Na^+ da coluna foi previamente feita pela eluição



Fluxograma 1. Etapas do isolamento da goma do cajueiro.



Fluxograma 2. Etapas da primeira purificação da goma do cajueiro.



Fluxograma 3. Etapas da segunda purificação da goma do cajueiro.

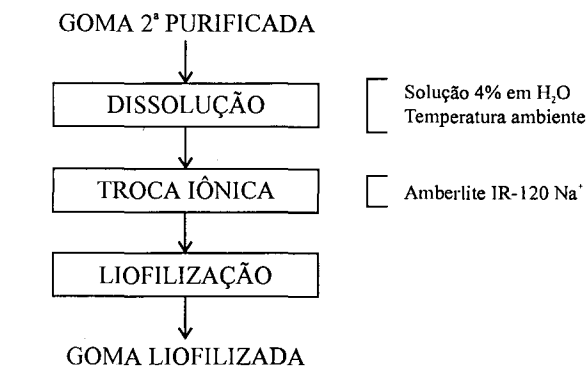
de uma solução de NaCl 1M. A solução de goma na forma de sal, oriunda da coluna, foi liofilizada em três alíquotas de 200 mL em um liofilizador modelo L4KR, Edwards de alto vácuo (Fluxograma 4). O material oriundo de cada liofilização foi misturado aos demais para homogeneização.

Métodos de análise

As amostras de goma obtidas nos quatro estágios de purificação foram analisadas no que se refere a seus teores de umidade, cinza e N (proteína). Foram determinados ainda os teores de cátions e de grupamentos carboxílicos e a viscosidade intrínseca.

O teor de umidade foi obtido por diferença de peso após aquecimento a 105 °C e o teor de cinza por aquecimento em mufla a 700 °C, ambos efetuados até peso constante. O teor de proteína foi calculado a partir do resultado da análise elementar de N, fazendo-se uso da relação %N x 6,25⁸.

Para possibilitar a análise dos cátions, foi feita inicialmente a digestão das várias amostras de goma em uma mistura de ácido nítrico e ácido perclórico na proporção 2:1 (v/v). Para a determinação de Na⁺ e K⁺ foi utilizado um fotômetro de chama B 262 da Micronal e para análise de Ca²⁺, Mg²⁺ e Fe³⁺, um espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer 3030 B.



Fluxograma 4. Etapas do estágio de liofilização da goma do cajueiro.

A porcentagem de grupamentos carboxílicos (ácidos urônicos) na forma neutralizada (sal de Na) e na forma ácida foi obtida por titulações condutométricas com HCl 0,01 M e NaOH 0,01 M, respectivamente, como utilizado por Rodrigues *et al.*¹. Empregou-se um condutivímetro LF 521 WTW com eletrodo de platina platinizado de constante 1,000 cm⁻¹, à temperatura de 25 ± 0,1 °C.

Todas as análises foram feitas, no mínimo, em duplicata.

As medidas de viscosidade foram efetuadas em NaCl 1 M, utilizando-se um viscosímetro tipo Ubbelohde com diâmetro capilar 0,3 mm. O tempo de escoamento do solvente foi de 293 s a 25,0 ± 0,1 °C. Foram determinadas as viscosidades intrínsecas das gomas obtidas nos quatro estágios. Os tempos de escoamento foram medidos para as diversas concentrações de goma após cada diluição no viscosímetro, partindo-se da concentração em torno de 0,5 g/dL e finalizando com aproximadamente 0,1 g/dL. Todos os tempos de escoamento foram repetidos no mínimo três vezes.

As massas molares médias foram estimadas através de um cromatógrafo líquido HPLC da Pharmacia, acoplado a um detector UV-1 (em 280 nm) e interligado com um medidor de densidade (PAAR-DMA-60/602). Para minimizar o efeito da carga iônica dos polieletrólitos, todos os experimentos foram realizados em NaCl 1M. Amostras de dextrana e goma arábica foram usadas como padrão.

Resultados e Discussão

Controle dos estágios de isolamento e purificação da goma do cajueiro

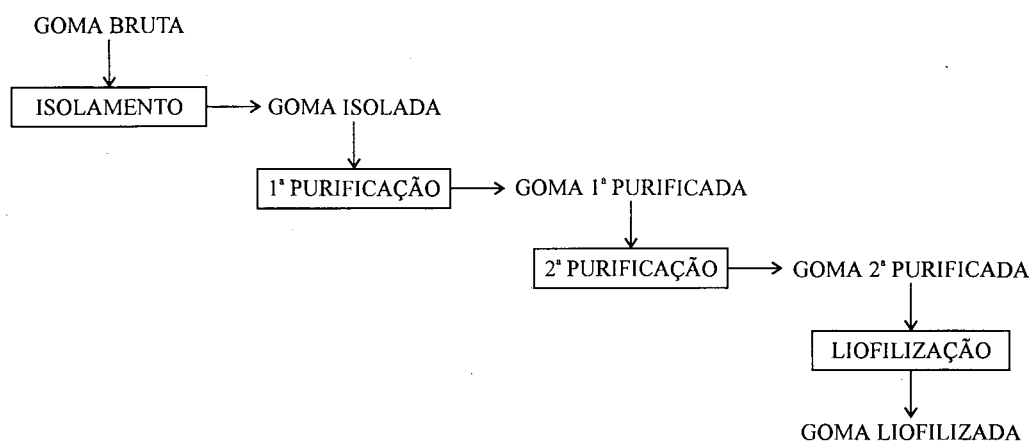
No estágio de isolamento, foram utilizadas as condições determinadas por Rodrigues *et al.*¹, sem nenhuma modificação ou ajuste.

Para encontrar as condições ideais de cada estágio de purificação, foram realizados vários testes variando-se a concentração da solução de goma (entre 2, 3 e 4 %), a proporção etanol / solução aquosa de goma (entre 70/30 e 80/20) e a quantidade de NaCl (entre 5 e 10 g/100 mL de solução). Essas condições ideais são aquelas que venham a fornecer um material solúvel (baixa turbidez da solução), com pouca precipitação de NaCl (baixa condutância da solução) e por meio de um processo com um bom rendimento.

As condições ideais para cada etapa foram descritas na parte experimental e constam dos Fluxogramas 2, 3 e 4. O processo como um todo pode ser visualizado no Esquema 1.

Análise das amostras de goma de cajueiro

A Tabela 1 apresenta alguns dados característicos das gomas bruta, isolada, 1ª e 2ª purificadas e liofilizada.



Esquema 1. Seqüenciamento dos estágios de purificação de gomas.

Tabela 1. Características da goma do cajueiro em vários estágios de purificação.

| Característica | Goma | | | | |
|-------------------------------|----------------|---------|---------------|---------------|-------------|
| | bruta | isolada | 1ª purificada | 2ª purificada | liofilizada |
| Cor do sólido | âmbar | branco | branco | branco | branco |
| Aspecto do sólido | | pó | pó | pó | flocos |
| Aspecto da solução | escura e turva | límpida | límpida | límpida | límpida |
| Rendimento (%) | - | 78 | 90 | 77 | - |
| Umidade (%) | 13,0 | 15,0 | 10,2 | 9,0 | 4,3 |
| Cinza (%) | 0,92 | 1,10 | 2,36 | 0,98 | 0,92 |
| % N | 0,28 | 0,19 | - | - | 0,17 |
| Proteína (%) | 1,75 | 1,19 | - | - | 1,06 |
| Ácidos urônicos (%) | | | | | |
| Forma salina | - | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 |
| Forma ácida | - | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| [η] em NaCl 1 M (mL/g) | - | 8,6 | 8,1 | 8,0 | 7,3 |

O teor de umidade foi utilizado para correção de massa. Os teores de cinza registrados para as gomas bruta, isolada, 2ª purificada e liofilizada são próximos e suas variações estão dentro da faixa do erro experimental. A goma 1ª purificada, no entanto, apresenta um valor superior ao das demais. Pressupõe-se que tenha havido uma coprecipitação do NaCl, já que nesta etapa de purificação 50 g deste sal foram adicionados por litro de solução de goma e a evaporação do NaCl só é registrada a partir de 700 °C⁹.

A porcentagem de proteína foi determinada para a goma bruta, isolada e liofilizada. O maior valor foi registrado para a goma bruta. Isto pode ser explicado não só pela maior quantidade de proteína mas também pela presença de outros compostos nitrogenados tais como aminoácidos, que foram também computados quando a porcentagem de proteína foi calculada por %N x 6,25. Observa-se que mesmo a goma considerada pura — a liofilizada —, contém ainda

proteína residual, provavelmente na forma de um complexo arabinogalactano-proteína (AGP). Na goma de cajueiro isolada foi detectada a presença de 6% deste complexo⁷, que existe também na goma arábica^{10,11,12}.

Os ácidos urônicos presentes na goma do cajueiro foram identificados por Anderson⁶ como ácidos glicurônicos. O teor destes ácidos permanece constante ao longo dos estágios de purificação e é semelhante ao determinado por Rodrigues *et al.*¹ para a goma de cajueiro isolada (6,3%). Consta-se, também, que todos os grupamentos RCOOH presentes inicialmente no polissacarídeo foram neutralizados, tendo-se apenas a goma na forma de sal.

Verifica-se na Fig. 1 que os cátions presentes na goma bruta são principalmente Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺. Consta-se, também, uma diminuição nos teores de K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ ao longo das purificações, cátions estes que estariam sendo substituídos por Na⁺. A goma 1^a purificada, no entanto, apresenta um percentual de Na⁺ anormalmente elevado, mas condizente com a co-precipitação de NaCl, já indicada pelo alto teor de cinzas desta goma. Na goma 2^a purificada, o teor de Na⁺ decresce, confirmando assim a retirada do excesso de Na⁺ presente.

Observa-se, como previsto, que o percentual de Na⁺ com relação ao total de cátions presentes aumenta com os estágios de purificação. Nas gomas bruta e isolada, ele fica em torno de 70%. Sobem para 94,7% na goma 2^a purificada. Na goma liofilizada, apenas 0,2% dos íons presentes (Ca²⁺ e Mg²⁺) não foram substituídos por Na⁺, o que indica eles estarem fortemente ligados à goma.

Para determinação da viscosidade intrínseca das gomas purificadas em cada estágio foram feitos gráficos da viscosidade reduzida (η_{esp}/c) vs. concentração do polímero, mostrados na Fig. 2. Observa-se um decréscimo nos valores da viscosidade intrínseca ao longo das purificações que pode estar associado à variação na massa molar média. Por outro lado, as constantes de Huggins (*k*, obtidas da inclinação das retas) não variam uniformemente. O comportamento anômalo para a goma isolada pode estar relacionado com diferença de solubilidade.

Os cromatogramas de GPC para a goma do cajueiro purificada nas quatro etapas estão mostrados na Fig. 3. Três picos principais (A, B, C) foram detectados pela densidade. Somente um pico, correspondente ao A, foi detectado por absorção na região do ultravioleta. Segundo Paula e Rodrigues⁷, na go-

ma de cajueiro isolada o pico A corresponde ao complexo polissacarídeo-proteína, de massa molar em torno de 10⁶ e os picos B e C a polissacarídeos de massas molares, respectivamente 3,2 x 10⁴ e 1,6 x 10⁴. Assumindo a quantidade de material como proporcional às diferenças de densidade, os autores iden-

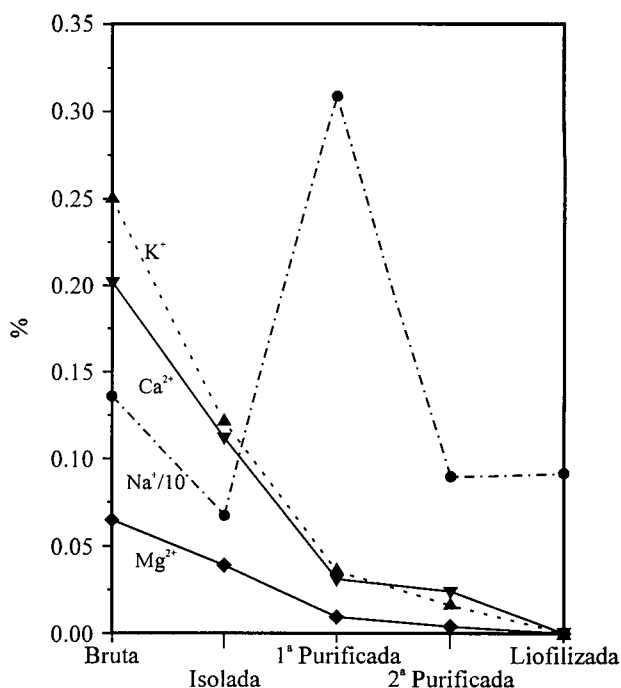


Figura 1. Distribuição do teor de Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ nas amostras de goma obtidas nos vários estágios de purificação. O teor de Na⁺ foi dividido por um fator de 10 para facilitar a comparação.

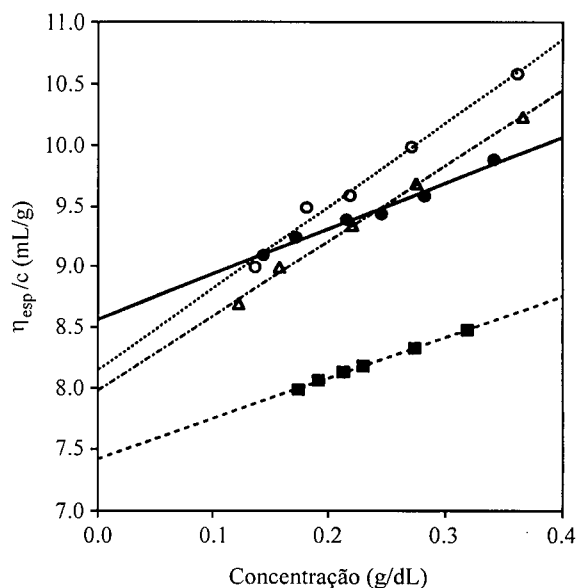


Figura 2. Viscosidade reduzida versus concentração de goma do cajueiro nos vários estágios de purificação. Solvente NaCl 1M e temperatura 25 °C. Goma: (●) isolada, (○) 1^a purificada, (Δ) 2^a purificada, (■) liofilizada.

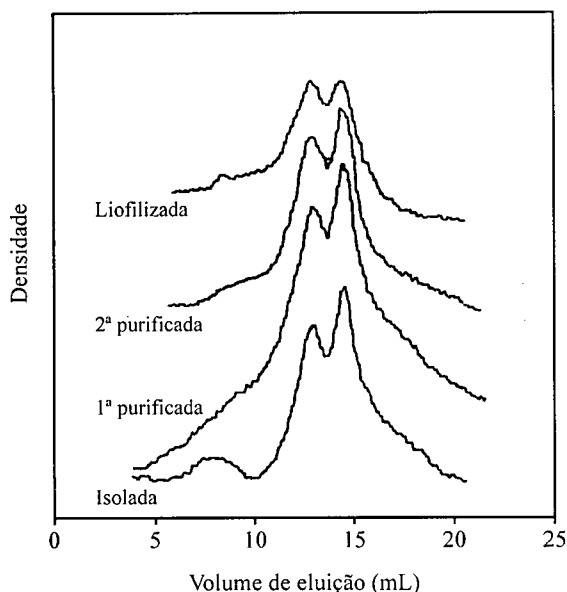


Figura 3. Cromatogramas GPC de soluções de goma do cajueiro nos vários estágios de purificação. Solvente NaCl 1 M.

tificaram a goma de cajueiro isolada como formada por 6% do complexo polissacarídeo-proteína, 42% do polissacarídeo B e 52% do polissacarídeo C.

Comparando-se os quatro cromatogramas, observa-se que ao longo das purificações ocorre uma diminuição da fração A, correspondente ao complexo protéico, o que é compatível com a diminuição do teor de proteína (1,6% na goma isolada e 1,1% na goma liofilizada). Verifica-se, também, uma maior proporção da fração B em relação a fração C.

A manutenção do volume de eluição correspondente aos picos B e C mostram que os correspondentes polissacarídeos não foram degradados. A redução da quantidade de complexo proteína-polissacarídeo durante as etapas de purificação indica que a amostra como um todo foi fracionada. Adotando-se a mesma sistemática de cálculo de Paula e Rodrigues⁷, pode-se identificar a goma liofilizada como constituída por 3% do complexo polissacarídeo-proteína, 48% do polissacarídeo de massa molar $3,2 \times 10^4$ e 49% do polissacarídeo de massa molar $1,6 \times 10^4$. A partir destes valores, a massa molar ponderal média da goma liofilizada pode ser estimada, obtendo-se o valor de $5,0 \times 10^4$. A goma isolada apresenta uma massa molar ponderal média estimada em $6,5 \times 10^4$. A diminuição na massa molar média ao longo das purificações confirma a justificativa anteriormente feita para explicar a diminuição da viscosidade intrínseca.

Conclusões

A utilização dos quatro estágios seqüenciados para a purificação da goma proporcionou as seguintes características:

- a) substituição paulatina dos cátions Mg^{2+} , Ca^{2+} e K^+ por Na^+ ;
- b) diminuição do teor de proteína, apesar de permanecer uma porcentagem de proteína residual, provavelmente devido ao complexo arabino-galactano-proteína;
- c) manutenção do teor de ácidos urônicos;
- d) redução da viscosidade intrínseca;
- e) não ocorrência de degradação dos polissacarídeos;
- f) fracionamento da amostra como um todo, devido a redução da quantidade do complexo arabino-galactano-proteína, o que é desejável no processo de purificação;
- g) pequena diminuição da massa molar média ao longo dos estágios de purificação.

A goma submetida a esses processos apresentou alto teor de pureza, boa solubilidade e, como desejado, foi transformada predominantemente em sal de sódio. As outras características inerentes ao polissacarídeo foram preservadas. Essa sistemática de purificação de gomas, apesar de demandar tempo, é essencial para a obtenção de um material de elevado grau de pureza, necessário para estudos mais refinados, como os de caracterização ou espectroscópicos, por exemplo.

Agradecimentos

À Embrapa, CE, pelo fornecimento da goma bruta; ao Prof. Fernando Galembeck, pela obtenção dos cromatogramas de GPC, e ao CNPq e CAPES pelas bolsas concedidas.

Os autores agradecem ainda aos consultores *ad hoc* pelas valiosas sugestões.

Referências Bibliográficas

1. Rodrigues, J.F.; Paula, R.C.M.; Costa, S.M.O. - Polímeros: Ciência e Tecnologia - nº 1, 31-36 (1993).

2. Kennedy, J.F.; White, C.A. - "Bioactive Carbohydrates: In Chemistry, Biochemistry and Biology", Ellis Horwood Ltda, Inglaterra (1983).
3. Aspinall, G.O. - "The polysaccharides", G.O. Aspinall (ed.), Academic Press, Nova York (1982).
4. Anderson, D.M.W.; Bell, P.C.; Millar, J.R. - *Phytochemistry*, 13, 2189-2193 (1974).
5. Milas, M. - "Polieletrólitos", R.A.M.C. Groote, A.A.S. Curvelo (ed.), USP, São Carlos (1991);
b) Rinaudo, M., CNRS, Comunicação Pessoal.
6. Anderson, D.M.W.; Bell, P.C. - *Anal. Chim. Acta*, 79, 185-197 (1975).
7. Paula, R.C.M.; Rodrigues, J.F. - *Carbohydr. Polym.*, 26, 177-182 (1995).
8. Marks, D.L.; Baum, R.B.; Swain, T. - *Analytical Biochem.* 147, 136-14 (1985).
9. Plitay, G. (ed.) "Atlas of Thermoanalytical Curves", Heyden e Son Ltda, Hungria, vol. (1973).
10. Fincher, G.B.; Stone, B.A.; Clarke, A.E - *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 34, 47-70 (1983).
11. Vandavelde, M.C.; Fenyó, J.C. - *Carbohydr. Polym.*, 5, 251-273 (1985).
12. Duvallet, S.; Fenyó, J.C.; Vandavelde, M.C. - *Polym. Bull.*, 21, 517-521 (1989).