

# EXTRAÇÃO, PRECIPITAÇÃO E RETICULAÇÃO DA MUCILAGEM DE JARACATIÁ (*CARICA QUERCIFOLIA* (A. ST.-HIL) HIERON) PARA USO COMO ADSORVENTE DE PROTEÍNAS

H. M. HEIDEMANN<sup>1</sup>, C. FACCIO<sup>1</sup>, M. G. N. QUADRI<sup>1</sup>, R. C. ALVES<sup>1</sup> e S. R. ZOLDAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

<sup>2</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - EPAGRI, Campos Novos/SC

E-mail para contato: [mara@enq.ufsc.br](mailto:mara@enq.ufsc.br)

**RESUMO** - A mucilagem é composta quimicamente por água, pectinas, açúcares e ácidos orgânicos, tornando-se viscosa na presença de água. O objetivo deste estudo foi a reticulação da mucilagem de jaracatiá (*Carica quercifolia* (A. St.-Hil.) Hieron) precipitada, a qual é composta por polissacarídeos naturais, para uso como adsorvente de proteínas, aproveitando assim os produtos da biodiversidade brasileira. Após a extração e precipitação com etanol, a mucilagem foi reticulada com epícloridrina. O rendimento da mucilagem de jaracatiá precipitada e da reticulação, os grupos funcionais antes e após a reticulação e a capacidade de adsorção do reticulado utilizando papaína foram avaliados. O rendimento da mucilagem precipitada em relação a massa de polpa do fruto foi de 1-1,5% e, após a reticulação o rendimento ficou em torno de 20% de mucilagem reticulada em relação à massa inicial de mucilagem precipitada. Os espectros FTIR mostraram que houveram mudanças nas bandas características com a reticulação. A capacidade da adsorção de papaína mostrou-se satisfatória, em torno de 50%.

## 1. INTRODUÇÃO

A cromatografia de afinidade é uma técnica tradicional para purificação de proteínas. A utilização de suportes do tipo membrana, utilizando polímeros sintéticos ou naturais, tais como celulose, quitosana, poliamida, poli (álcool vinílico), poli (metacrilato de hidroxietila) e polisulfona têm sido investigadas (Gebauer *et al.*, 1996; Gan *et al.*, 2000; Guo; Ruckenstein, 2001; Garipcan *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2001; Vyas *et al.*, 2001; Srivastava *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2013).

Os polímeros sintéticos, apesar da alta produção, têm algumas desvantagens tais como elevado custo, toxicidade, promovem a poluição ambiental durante a síntese e geralmente são obtidos de fonte não renovável (Jani *et al.*, 2009; Deogade *et al.*, 2012). Já as gomas e mucilagens são naturais, biodegradáveis, biocompatíveis, atóxicas e apresentam boa relação custo-benefício (Bhardwaj *et al.*, 2000; Yeole *et al.*, 2006; Deogade *et al.*, 2012).

Algumas plantas possuem a mucilagem como uma fração da composição polissacarídica que, *in vivo* atua como um reservatório de água, pois é um produto do metabolismo interno das

células vegetais (Qadry, 2008), e após extração e processamento é capaz de se tornar viscosa na presença de água (Cárdenas *et al.*, 1998). Fisicamente é um sistema coloidal líquido, liofílico, sendo, portanto, um hidrogel; quimicamente é constituída por água, pectinas, açúcares e ácidos orgânicos (Misaki *et al.*, 1972). É uma substância translúcida, amorfa e heteropolimérica, formada por monossacarídeos ou mistura de monossacarídeos. Muitas mucilagens possuem a cadeia monossacarídica combinada com ácidos urônicos (Jani *et al.*, 2009).

A reticulação consiste na formação de uma rede, onde as várias cadeias de um polissacarídeo são ligadas por ligações covalentes, tornando essas cadeias mais rígidas (Ganji; Vasheghami-Farahani, 2009) e em geral são promovidas por agentes de reticulação, os quais são substâncias que apresentam baixa massa molar e grupos funcionais reativos capazes de permitir a formação de ligações inter ou intracadeias poliméricas (Berger *et al.*, 2004). Na reticulação química um número pequeno de ligações cruzadas entre as cadeias é suficiente para impedir sua separação e passagem para a solução, tornando assim o polímero insolúvel; observa-se que apenas uma ligação entre duas cadeias já é suficiente para que isso ocorra (Lucas *et al.*, 2001).

Sendo a cromatografia uma das técnicas mais utilizadas para purificação de proteínas, há perspectivas para o desenvolvimento de suportes cromatográficos com o surgimento de novos materiais adsorventes. O objetivo do presente estudo foi avaliar a reticulação da mucilagem de jaracatiá precipitada e sua capacidade de atuar como adsorvente de proteínas.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

Os jaracatiás (*Carica quercifolia* (A. St.-Hil.) Hieron) foram obtidos através da EPAGRI – Campos Novos/SC e enviados ao LASIPO/ENQ/UFSC, os quais permaneceram congelados até o momento da extração. Uma exsiccata da espécie (*Carica quercifolia* (A. St.-Hil.) Hieron) foi depositada no Herbário do Instituto de Biociências (Herbário ICN) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob o número de tombo ICN 173708. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

### **2.2 Métodos**

**Extração e precipitação:** A mucilagem (proporção polpa/água de 1:1,25) foi extraída manualmente do jaracatiá descascado e triturado brevemente em liquidificador. A suspensão foi filtrada em malha de poliéster com auxílio de vácuo e precipitada com etanol 92,8° (1:3). O precipitado foi seco em estufa 40 °C por 48 horas.

**Reticulação:** A reticulação seguiu a metodologia de Teixeira-Sá *et al.* (2009), onde usou-se 1 g de mucilagem precipitada, 0,3 mL de epícloridrina e 3 mL de solução de hidróxido de sódio 3 M. A mistura foi deixada em estufa por 24 horas a 40 °C, e por 12 horas a 70 °C. O reticulado foi lavado com água destilada até atingir pH neutro e armazenado em solução de NaCl 0,15 N, ácido ascórbico e azida sódica, sob refrigeração até o momento do uso.

**Rendimento:** Os jaracatiás (*Carica quercifolia* (A. St.-Hil.) Hieron) foram descascados e avaliado o percentual de casca e polpa. O rendimento da mucilagem precipitada em relação à polpa, foi avaliado a partir da massa de mucilagem precipitada obtida após a extração, precipitação e secagem. Para o rendimento da reticulação, foi avaliada a massa de mucilagem precipitada reticulada em relação à massa inicial de mucilagem utilizada após a reticulação e secagem.

**Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR):** As amostras foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), em um espectrofotômetro FTIR Shimadzu modelo IRP Prestige-21 com detector DLATGS, com faixa espectral de  $400\text{ cm}^{-1}$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$  e resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$ , por transmissão em pastilhas de KBr de 7 mm de diâmetro (200-300 mg).

**Ponto de carga zero:** A metodologia proposta por Ferro-García *et al.* (1998), com algumas modificações, foi utilizada na determinação do ponto de carga zero,  $\text{pH}_{\text{pcz}}$ , onde 50 mL de solução de NaCl  $0,01\text{ mol.L}^{-1}$ , foram adicionados em frascos erlenmeyers, e quantidades pré-estabelecidas de solução de HCl  $0,1\text{ M}$  ou NaOH  $0,1\text{ M}$  foram adicionados para se obter valores de pH entre 1 e 12. Em seguida  $0,10\text{ g}$  de mucilagem precipitada reticulada foi adicionada em cada frasco e os mesmos agitados em shaker a temperatura ambiente, por 24 horas. Após esse período, o pH de equilíbrio foi medido.

**Capacidade de adsorção:** Foi preparada uma solução de papaína  $0,5\%$ , a qual foi deixada em contato com a mucilagem de jaracatiá (*Carica quercifolia* (A. St.-Hil.) Hieron) precipitada e reticulada com epicloridrina ( $1,5\text{ g}$  em  $50\text{ mL}$  de solução) em tempos pré-estabelecidos sob agitação leve e temperatura ambiente. O processo foi acompanhado ao longo do tempo para obtenção da cinética de adsorção; as medidas de variação do teor proteico foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de onda  $290\text{ nm}$ . A concentração foi calculada de acordo com uma curva padrão de papaína.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Rendimento

Para os experimentos foram utilizadas  $300\text{ g}$  de jaracatiás (*Carica quercifolia* (A. St.-Hil.) Hieron). Depois de descascados, a massa total de polpa/sementes foi de  $200\text{ g}$ , apresentando, assim, um rendimento de  $66,67\%$  de polpa/sememente e  $33,33\%$  de casca. Na precipitação o rendimento ficou em torno de  $1-1,5\%$ . O rendimento da mucilagem reticulada em relação à massa inicial de mucilagem precipitada foi de  $25\%$ .

#### 3.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho obtidos das mucilagens de jaracatiá precipitada e reticulada com epicloridrina são mostrados na Figura 1.

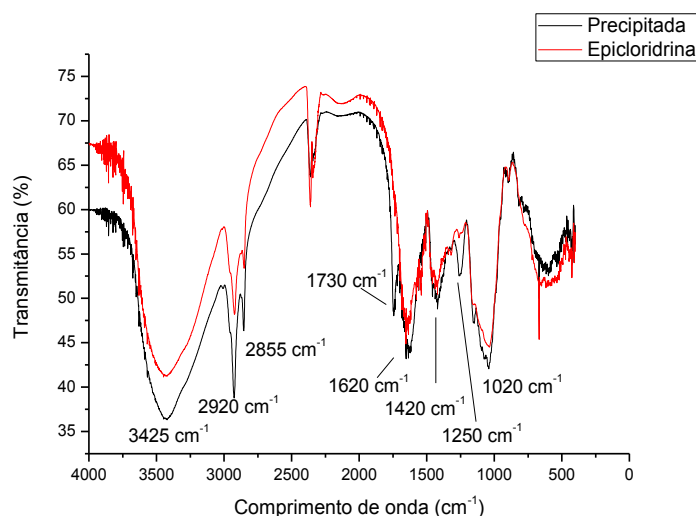


Figura 1 – Espectro de FTIR da mucilagem de jaracatiá precipitada e reticulada com epicloridrina.

Ambas as mucilagens, reticulada e não reticulada, apresentaram uma banda forte e larga em  $3425\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída ao estiramento vibracional do grupo O-H de água e álcoois (Silverstein *et al.*, 2006; Pavia *et al.*, 2008; Yuen *et al.*, 2009). Houve uma redução na intensidade das bandas  $2920\text{ cm}^{-1}$  e  $2855\text{ cm}^{-1}$ , as quais são atribuídas às vibrações simétricas e assimétricas do grupamento C-H (Silverstein *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2011) quando a amostra foi reticulada. A banda característica de grupos carbonila (C=O) de éster, em  $1730\text{ cm}^{-1}$ , e a banda de estiramento do grupo C-O, em  $1250\text{ cm}^{-1}$  desapareceram, enquanto que a banda em  $1620\text{ cm}^{-1}$  teve uma leve diminuição na intensidade, sendo esta atribuída ao grupo C=O de ácido (Pavia *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2011). A banda em  $1020\text{ cm}^{-1}$  também teve uma leve diminuição na intensidade, e está relacionada à deformações simétricas e assimétricas do grupo C-OH (Tavares *et al.*, 2011). De acordo com Gonsalves e Araújo (2011), a epicloridrina é considerada um reticulante ligante de -OH.

### 3.3 Ponto de carga zero ( $\text{pH}_{\text{pcz}}$ )

A Figura 2 mostra os pontos experimentais utilizados na obtenção do  $\text{pH}_{\text{pcz}}$  da mucilagem de jaracatiá precipitada e reticulada com epicloridrina.

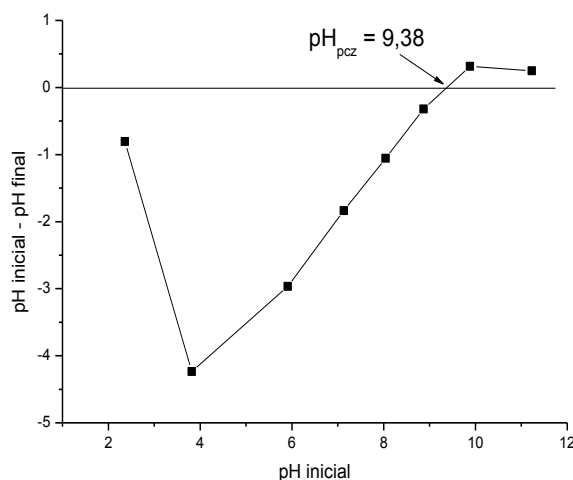


Figura 2 – Resultados experimentais obtidos na determinação do  $\text{pH}_{\text{pcz}}$  da mucilagem de jaracatiá precipitada e reticulada com epícloridrina.

O ponto de carga zero ( $\text{pH}_{\text{pcz}}$ ) é o pH no qual a superfície é neutra (Guilarduci *et al.*, 2006). Na solução de mucilagem de jaracatiá (*Carica quercifolia* (A. St.-Hil.) Hieron) precipitada e reticulada com epícloridrina, em pH abaixo de 9,38 a superfície atrairá preferencialmente ânions por estar protonada e carregada positivamente. De maneira oposta, acima de pH 9,38, a superfície da mucilagem encontra-se desprotonada e negativamente carregada, exercendo atração preferencial sobre cátions.

### 3.4 Capacidade de adsorção

Os dados obtidos da adsorção estão na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados obtidos na adsorção da solução de papaína.

Tempo (min)	Reticulada com epícloridrina	
	Concentração ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Adsorção (%)
0	1,66	0
15	1,03	37,95
30	0,93	43,97
45	0,81	51,20
60	0,80	51,81

Os testes de adsorção mostraram que a mucilagem de jaracatiá (*Carica quercifolia* (A. St.-Hil.) Hieron) precipitada e reticulada com epícloridrina pode ser utilizada na purificação de proteínas, pois como pode ser observado na Tabela 1, em 60 minutos em torno de 50% da papaína foi adsorvida. A capacidade da adsorção de papaína mostrou-se satisfatória, pois mesmo com tempo de contato baixo e uso de uma quantidade pequena de adsorvente, teve-se

uma quantidade razoável de papaína adsorvida, mostrando assim a boa afinidade entre o adsorvente e o adsorbato.

Benhura e Mavhudzi (1996), utilizaram a mucilagem de ruredzo (*Dicerocaryum zanguebarium*) reticulada com epicloridrina para purificar a poligalacturonase extraída do tomate. Como podemos verificar houve ótima afinidade entre a mucilagem reticulada e a proteína, pois obtiveram um rendimento na purificação de 100% (5,2 mg.g<sup>-1</sup>).

Teixeira-Sá *et al.* (2009), purificaram a lectina por cromatografia de afinidade, onde reticularam com epicloridrina os polissacarídeos extraídos de *Mucuna sloanei* e utilizaram como adsorvente, com isso obtiveram um rendimento na purificação da lectina de 5.4 mg.g<sup>-1</sup>.

#### 4. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais em que foi realizado o presente trabalho, os resultados obtidos permitiram concluir que:

- Os grupos funcionais encontrados na mucilagem de jaracatiá (*Carica quercifolia* (A. St.-Hil.) Hieron) precipitada e reticulada mostraram mudanças na intensidade e/ou o não aparecimento de algumas bandas características, quando comparadas.
- O estudo do ponto de carga zero das soluções de mucilagens de jaracatiá (*Carica quercifolia* (A. St.-Hil.) Hieron) precipitada e reticulada com epicloridrina obteve pH<sub>pcz</sub> de 9,38.
- Os testes de adsorção mostraram que a mucilagem reticulada com epicloridrina pode ser utilizada na purificação de proteínas (em 60 minutos em torno de 50% da solução de papaína foi adsorvida).
- O rendimento médio da mucilagem de jaracatiá (*Carica quercifolia* (A. St.-Hil.) Hieron) precipitada e reticulada em relação à massa inicial de mucilagem precipitada foi de 25%.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - EPAGRI, Campos Novos/SC.

Laboratório de Controle de Processos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### 6. REFERÊNCIAS

BENHURA, M. A. N.; MAVHUDZI, I. Use of crosslinked mucilage prepared from ruredzo (*Dicerocaryum zanguebarium*) in the purification of polygalacturonase extracted from tomato. *Food Chem.*, v. 56, p. 433-437, 1996.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 57, p. 19-34, 2004.

BHARDWAJ, T. R.; KANWAR, M.; LAL, R.; GUPTA, A. Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 26, p. 1025-1038, 2000.



CÁRDENAS, A.; ARGUELLES, W. M.; GOYCOOLEA, F. On the possible role of *Opuntia ficus-indica* Mucilage in Lime Mortar Performance in the Protection of Historical Buildings. *J. Profess. Assoc. Cactus Developm.*, v. 3, 1998.

DEOGADE, U. M.; DESHMUKH, V. N.; SAKARKAR, D. M. Natural Gums and Mucilage's in NDDS: Applications and Recent approaches. *Int. J. PharmTech Res.*, v.4, p 799-814, 2012.

FERRO-GARCÍA, M. A.; RIVERA-UTRILLA, J.; BAUTISTA-TOLEDO, I.; MORENO-CASTILLA, C. Adsorption of humic substances on activated carbon from aqueous solutions and their effect on the removal of Cr (III) ions. *Langmuir*, v. 14, p. 1880-1886, 1998.

GAN, H. Y.; SHANG, Z. H.; WANG, J. D. New affinity nylon membrane used for adsorption of g-globulin. *J. Chromatogr.A*, v. 867, p. 161-168, 2000.

GANJI, F.; VASHEGHAMI-FARAHANI, E. Hydrogels in controlled drug delivery systems. *Iran. Polym. J.*, v. 18, p. 63-88, 2009.

GARIPCAN, B.; BERELI, N.; PATIR, S.; ARICA, M. Y.; DENIZLI, A. Synthesis of poly[(hydroxyethyl methacrylate)-co-(methacrylamidoalanine)] membranes and their utilization as an affinity sorbent for lysozyme adsorption. *Macromol. Biosci.*, v. 1, p. 332-340, 2001.

GEBAUER, K. H.; THÖMMES, J.; KULA, M. R. Breakthrough performance of high-capacity membrane adsorbers in protein chromatography. *Chem. Eng. Sci.*, v. 52, p. 405-419, 1996.

GONSALVES, A. DE A.; ARAÚJO, C. R. M. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. *Quim. Nova*, v. 34, p. 1215-1223, 2011.

GUILARDUCI, V. V. S.; MESQUITA, J. P.; MARTELLI, P. B.; GORGULHO, H. F. Adsorção de fenol sobre carvão ativado em meio alcalino. *Quím. Nova*, v. 29, p. 1226-1232, 2006.

GUO, W.; RUCKENSTEIN, E. A new matrix for membrane affinity chromatography and its application to the purification of concanavalin A. *J. Membr. Sci.*, v. 182, p. 227-234, 2001.

JANI, G. K.; SHAH, D. P.; PRAJAPATI, V. D.; JAIN, V. C. Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. *Asian J Pharm Sci.*, v. 4, p. 309-323, 2009.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. *Caracterização de Polímeros – Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica*. Série Instituto de Macromoléculas. Ed. e-papers, Rio de Janeiro, 2001, 366 p.

LV, Y.; BAO, X.; LIU, H.; REN, J.; GUO, S. Purification and characterization of calcium-binding soybean protein hydrolysates by  $\text{Ca}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  immobilized metal affinity chromatography (IMAC). *Food Chem.*, v. 141, p. 1645-1650, 2013.

MISAKI, A.; ITO, T.; HARADA, T. Constitutional Studies on the Mucilage of “Yamanoimo” *Dioscorea batatas* Decne, forma Tsukune: isolation and structure of a mannan. *Agric. Biol. Chem.*, v. 36, p. 761-771, 1972.

PAVIA, D. L.; KRIZ, G. S.; LAMPMAN, G. M. *Introduction to Spectroscopy*. Fourth Edition. Brooks Cole, 2008.

QADRY, J. S. Shah and Qadry's Pharmacognosy. Ahmedabad, Índia: B S Shah Prakashan, 2008.

RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de Isolamento de Gomas Naturais: Comparação através da goma do Cajueiro (*Anacardium occidentale* L). *Polímeros*, Jan/Mar, p. 31-36, 1993.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos*. 7ª edição, Rio de Janeiro: LTC, 2006.

SRIVASTAVA, P.; RAUT, H. N.; WAGH, R. S.; PUNTAMBEKAR, H. M.; KULKARNI, M. J. Purification and characterization of an antioxidant protein (~16 kDa) from *Terminalia chebula* fruit. *Food Chem.*, v. 131, p. 141-148, 2012.

TAVARES, S. A.; PEREIRA, J.; GUERREIRO, M. C.; PIMENTA, C. J.; PEREIRA, L.; MISSAGIA, S. V. Physical and chemical characteristics of the mucilage of lyophilized yam. *Ciênc. Agrotec.*, v. 35, p. 973 -979, 2011.

TEIXEIRA-SÁ, D. M. A.; REICHER, F.; BRAGA, R. C.; BELTRAMINI, L. M. Isolation of a lectin and a galactoxyloglucan from *Mucuna sloanei* seeds. *Phytochem.*, v. 70, p. 1965-1972, 2009.

VYAS, P. V.; SHAH, B. G.; TRIVEDI, G. S.; RAY, P.; ADHIKARY, S. K.; RANGARAJAN, R. Characterization of heterogeneous anion-exchange membrane. *J. Membr. Sci.*, v. 187, p. 39-46, 2001.

YEOLE, P. G.; NAKHAT, P. D.; GALGATTE, U. C.; BABLA, I. C. Design and evaluation of xanthan gum-based sustained release matrix tablets of diclofenac sod. *Indian J. Pharm. Sci.*, v. 68, p. 185-189, 2006.

YUEN, S.-N.; CHOI, S.-M.; PHILLIPS, D. L.; MA, C.-Y. Raman and FTIR spectroscopy study of carboxymethylated non-starch polysaccharides. *Food Chem.*, v. 114, p. 1091–1098, 2009.

ZOU, H. F.; LUO, Q. Z.; ZHOU, D. M. Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins. *J. Biochem. Bioph. Methods*, v. 49, p. 199–240, 2001.