



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
DOUTORADO ACADÊMICO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LÍLLIAN VASCONCELLOS BRANDÃO

**GOMA XANTANA OBTIDA POR FERMENTAÇÃO DA
GLICERINA BRUTA RESIDUAL DO BIODIESEL:
PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO PARA
FLUIDO DE PERFURAÇÃO DE POÇOS DE PETRÓLEO**

Salvador – Bahia
2012

LÍLLIAN VASCONCELLOS BRANDÃO

**GOMA XANTANA OBTIDA POR FERMENTAÇÃO DA
GLICERINA BRUTA RESIDUAL DO BIODIESEL:
PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO PARA
FLUIDO DE PERFURAÇÃO DE POÇOS DE PETRÓLEO**

Orientadora: Prof^a. Dra. Janice Izabel Druzian

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal da Bahia, Doutorado em Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Salvador – Bahia
2012

B817 Brandão, Lílian Vasconcellos

Goma xantana obtida por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel: produção, caracterização e aplicação para fluido de perfuração de poços de petróleo / Lílian Vasconcellos Brandão. – Salvador, 2012.

185f. : il. color.

Orientadora: Prof. Doutora Janice Izabel Druzian

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Escola Politécnica, 2012.

1. Goma xantana - Viscosidade. 2. Poços de Petróleo-Fluidos de perfuração I. Druzian, Janice Izabel. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDD : 660.2

TERMO DE APROVAÇÃO

LÍLLIAN VASCONCELLOS BRANDÃO

GOMA XANTANA OBTIDA POR FERMENTAÇÃO DA GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO EM FLUIDO DE PERFURAÇÃO DE POÇOS DE PETRÓLEO

TESE APROVADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, PELA SEGUINTE BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dra. Janice Izabel Druzian – Orientadora _____
Doutora em Ciência dos Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Prof. Dr. Enio Nazaré de Oliveira Junior _____
Doutor em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal de São João Del Rei – MG (UFSJ)

Prof. Dr. Giovani Brandão Mafra de Carvalho _____
Doutor em Biotecnologia Industrial, Universidade São Paulo (USP)
Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Prof. Dr. Samuel Luporini _____
Doutor em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Prof^a. Dra. Maria Cecília Azevedo Esperidião _____
Doutora em Ciências Naturais, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Salvador, 20 de dezembro de 2012.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais, Raimundo e Lindacy, companheiros incansáveis de todas as horas e que me proporcionaram a fazê-lo com e por amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, o mestre da vida.

Aos meus queridos pais e minha irmã Carla, pelo amor, carinho, compreensão e força em não me deixar esmorecer nunca.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPEQ) da Universidade Federal da Bahia pela oportunidade concedida de aprimoramento profissional.

À minha orientadora Prof^a. Janice Izabel Druzian por acreditar em mim e pela orientação, além do exemplo de profissionalismo, amor e dedicação à pesquisa.

Ao Prof. Enio Nazaré pelo apoio, troca de conhecimento além da amizade.

À Prof^a Maria Cecília Espiridião pelo auxílio nos ensaios e empréstimo do reômetro além da confiança e respeito.

Ao Prof. Samuel Luporini pelo apoio e colaboração profissional.

Ao Prof. Giovani Brandão por ter aceitado participar da banca e pelo conhecimento vasto na área de biotecnologia.

Ao Prof. e amigo Jorge López pelo apoio imprescindível e aprendizado.

Aos meus amados amigos conquistados no PPEQ, Tatiana Barreto, Gleice Pacheco, Larissa Costa, Marcio Inomata e Denilson Assis pela amizade, apoio e persistência do trabalho realizado, constante troca de experiências além de momentos únicos que levarei para toda a minha vida.

A todos os colegas do Lapesca, em especial Luciene, Carol e Jaff pelo apoio, disponibilidade e amizade.

A empresa Carboflex, por acreditar em mim e nos trabalhos desenvolvidos de parceria com a UFBA, em especial a Emiliano, Eduardo, Keila Priscila, Manoel Cidreira e aos diretores, Mario Echevarria, Sergio Moreira e Eudalio Moreira.

A CAPES e FAPESB pelo apoio financeiro.

Agradeço aos demais, os quais é difícil citar todos, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu amadurecimento profissional e espiritual. A vocês, todo o meu amor.

*“Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem à
inteligência e o entendimento.”
(Salmo 2:6)*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVO ESPECIFICO.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 GOMA XANTANA.....	5
3.1.1 Mercado de goma xantana.....	8
3.2 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA.....	12
3.2.1 Bactérias <i>Xanthomonas</i>.....	14
3.2.2 Inóculo.....	15
3.2.3 Produção e biossíntese de goma xantana.....	16
3.2.3.1 Condições operacionais e escalas fermentativas.....	23
3.2.4 Glicerina como substrato alternativo.....	27
3.2.5 Recuperação da Goma Xantana.....	30
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA GOMA XANTANA.....	32
3.3.1 Reologia.....	32
3.3.2 Análise Termogravimétrica (TG).....	35
3.3.3 Massa Molar.....	37
3.3.4 Composição monomérica da goma xantana.....	39
3.4 APLICAÇÃO DE GOMA XANTANA NA ÁREA PETROLÍFERA.....	41
3.4.1 Recuperação Avançada de Petróleo (EOR).....	42
3.4.2 Fluido de perfuração para poços de petróleo.....	43
3.4.2.1 Classificação dos fluidos de perfuração.....	44
3.4.2.2 Composição dos fluidos de perfuração base água.....	45
3.4.2.3 Propriedades dos fluidos de perfuração.....	48
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 MATERIAL.....	53
4.1.1 Equipamentos.....	54
4.1.2 Microrganismos.....	55
4.2 MÉTODOS.....	55
4.2.1 Composição centesimal da glicerina bruta residual do biodiesel como substrato para a produção de goma xantana.....	55
4.2.2 Manutenção dos microrganismos.....	56
4.2.3 Preparo do inóculo.....	57
4.2.3.1 Curva de crescimento microbiano do inóculo.....	57

4.2.4 Produção de goma xantana por fermentação em batelada – Shaker.....	57
4.2.4.1 Testes preliminares de produção de goma.....	57
4.2.4.2 Otimização das condições de produção de goma xantana.....	59
4.2.5 Produção de goma xantana por fermentação em batelada – Bioreator 4,5L.....	60
4.2.6 Recuperação da goma xantana.....	61
4.2.7 Consumo de substrato e estudo preliminar da cinética do processo fermentativo do ponto otimizado.....	61
4.2.8 Caracterização das gomas xantana.....	62
4.2.8.1 Avaliação da viscosidade aparente.....	62
4.2.8.2 Análise Térmica.....	64
4.2.8.3 Massa molar média ponderada.....	64
4.2.8.4 Composição monomérica da goma xantana.....	65
4.2.8.4.1 Determinação de açúcares	65
4.2.8.4.2 Determinação de ácidos urônicos.....	65
4.2.9 Comportamento reológico e aplicação das gomas na área petroquímica.....	66
4.2.10 Goma xantana como viscosificante polimérico em fluido de perfuração.....	66
4.2.10.1 Avaliação da goma xantana em solução salina segundo Norma Petrobras.....	66
4.2.10.2 Formulação e caracterização do fluido de perfuração base água composto de goma xantana e glicerina bruta.....	67
4.2.11 Tratamento estatístico dos dados experimentais.....	69
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS ALTERNATIVOS.....	71
5.2 SELEÇÃO DE CEPAS DE <i>XANTHOMONAS</i>	72
5.2.1 Comportamento reológico das gomas xantana produzidas pelas cepas 356 e 2103 em Shaker.....	77
5.2.2 Influência da concentração da goma, temperatura e taxa de cisalhamento no comportamento reológico da xantana sintetizada pela cepa 2103 em shaker e aplicação na área petroquímica.....	79
5.3 ESTUDO DE FERMENTAÇÃO DA GLICERINA BRUTA COM AS CEPAS SELECIONADAS.....	84
5.3.1 Curvas de crescimento bacteriano.....	84
5.3.2 Influência da concentração de glicerina bruta e do inóculo do meio fermentativo na produção e viscosidade aparente de xantana pela cepa 356.....	86
5.3.2.1 Influência da fermentação em bioreator na produção de xantana, massa celular e viscosidade aparente do polímero pela cepa 356.....	90
5.3.3. Influência da fermentação em bioreator na produção de xantana, massa celular e viscosidade aparente do polímero pela cepa 2103.....	93
5.3.3.1 Respostas ao longo da fermentação.....	93
5.3.3.2 Respostas de todos os ensaios fermentativos a 120 horas de fermentação..	96
5.3.3.3 Respostas a 120 horas de fermentação no ponto otimizado.....	102

5.3.4 Resposta a 120 horas de fermentação - consumo de substrato e crescimento de goma xantana durante a fermentação do ensaio do ponto otimizado.....	104
5.3.4.1 Cinética de consumo de glicerina bruta e formação de goma xantana no ponto otimizado.....	106
5.4 CARACTERIZAÇÃO DA GOMA XANTANA OBTIDA NO PONTO OTIMIZADO: ANÁLISE TÉRMICA, MASSA MOLECULAR E COMPOSIÇÃO MONOMÉRICA.....	108
5.4.1. Análise Térmica.....	108
5.4.2. Massa Molecular.....	111
5.4.3. Composição Monomérica.....	117
5.5 CARACTERIZAÇÃO DA GOMA XANTANA PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO DA GLICERINA BRUTA PELA CEPA 2103 PARA FLUIDOS DE PERFURAÇÃO.....	119
5.5.1 Caracterização da goma xantana produzida pela cepa 2103 em bioreator como viscosificante polimérico em fluido de perfuração.....	120
5.6 FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FLUIDO DE PERFURAÇÃO BASE ÁGUA COMPOSTO DE GOMA XANTANA E GLICERINA BRUTA COMO LUBRIFICANTE.....	121
6 CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES.....	130
6.1 CONCLUSÕES.....	130
6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	132
7 REFERÊNCIAS.....	133
ANEXO.....	150

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura do monômero polimérico de goma xantana (PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011)..... 6
- Figura 2.** Evolução anual de depósitos, por unidade, de patentes 1970 a 2010 (A), depósitos, por unidade, de patentes por país de origem/organização (B), depósitos, por percentual, de patentes por empresa (C) e depósitos, por percentual, de patentes por setor industrial (D) (MACHADO *et al.*, 2012)..... 9
- Figura 3.** Etapas de processo para produção de goma xantana em escala laboratorial..... 13
- Figura 4.** Ilustração da bactéria *Xanthomonas campestris* (A) e folha infectada pela bactéria (B) (García-Ochoa *et al.*, 2000)..... 14
- Figura 5.** Biossíntese dos monossacarídeos e substituintes que compõem a goma xantana via caminho *Entner-Doudoroff* (ROSALAM; ENGLAND, 2006; PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011)..... 20
- Figura 6.** Caminho proposto para a biossíntese e excreção do exopolissacarídeo de goma xantana (KRANENBURG *et al.*, 1999)..... 21
- Figura 7.** Fluxo de produção de goma xantana em reator convencional em escala industrial (ROSALAM; ENGLAND, 2006)..... 24
- Figura 8.** Reação de transesterificação para produção do biodiesel (CASTELLANELLI *et al.*, 2007; GONÇALVES, 2006)..... 28
- Figura 9.** Esquema do efeito da taxa de cisalhamento na rede do biopolímero goma xantana (Adaptado de KI-WON *et al.*, 2006)..... 35
- Figura 10.** Ilustração do *shaker* utilizado nas etapas de produção de células (inóculo) e de produção de goma xantana..... 58
- Figura 11.** Ilustração do bioreator utilizado para realizar a etapa de produção de xantana... 60
- Figura 12.** Aspectos das gomas xantana sintetizadas pela cepa 2103 por fermentação de sacarose (A) e de glicerina bruta (B) depois de precipitadas com álcool etílico, secas e trituradas..... 72
- Figura 13.** Comportamento da viscosidade aparente das soluções aquosas a 0,5% de gomas xantana obtidas por diversas cepas de *Xanthomonas* a partir de glicerina bruta, fixando-se a temperatura em 25°C e variando-se as cepas e a taxa de cisalhamento de 25 a 1000 s⁻¹..... 76
- Figura 14.** Variação da viscosidade aparente das soluções aquosas a 0,5% de gomas xantana obtidas por fermentação de sacarose (A) e glicerina bruta (B) pelas cepas de *Xanthomonas* fixando-se a taxa de cisalhamento em 25s⁻¹ em diferentes temperaturas..... 77

- Figura 15.** Variação da viscosidade aparente das soluções aquosas a 0,5% das gomas xantana obtidas por fermentação de sacarose (A) e glicerina bruta (B) em diferentes cepas de *Xanthomonas* na temperatura de 25°C em diferentes taxas de cisalhamento..... 78
- Figura 16.** Variação da viscosidade aparente da goma xantana produzida pela cepa 2103 a partir da sacarose em função da taxa de cisalhamento de 25s⁻¹ a 1000s⁻¹ fixando a temperatura em 25°C (A) e 85°C (B) e em diferentes concentrações..... 79
- Figura 17.** Variação da viscosidade aparente da goma xantana produzida pela cepa 2103 a partir da glicerina bruta em função da taxa de cisalhamento de 25s⁻¹ a 1000s⁻¹ fixando a temperatura em 25°C (A) e 85°C (B) e em diferentes concentrações..... 80
- Figura 18.** Variação da viscosidade aparente da goma xantana produzida pela cepa 2103 a partir da glicerina comercial em função da taxa de cisalhamento de 25s⁻¹ a 1000s⁻¹ fixando a temperatura em 25°C (A) e 85°C (B) e em diferentes concentrações..... 80
- Figura 19.** Curva de crescimento bacteriano da *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* 356, em meio YM, 28°C, 180 rpm, shaker..... 85
- Figura 20.** Curva de crescimento bacteriano da *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, em meio YM, 28°C, 180 rpm, shaker..... 85
- Figura 21.** Superfície de resposta com o comportamento da produção (g.L⁻¹) e viscosidade aparente (mPa.s) da goma xantana pela cepa 356 em relação à concentração (%) de glicerina bruta e inoculo..... 88
- Figura 22.** Efeito do tempo de fermentação em relação à produção (g.L⁻¹) e viscosidade (mPa.s) de goma xantana obtida pela cepa 356 nas condições do ensaio 2 (Tabela 14)..... 90
- Figura 23.** Comportamento da produção de goma xantana e da viscosidade aparente da solução aquosa de xantana (0,5% m/v, 25°C, 25s⁻¹) e do caldo de fermentação ao longo do tempo fermentativo de 120 horas da glicerina bruta pela cepa 356 em bioreator, com aeração fixa de 1,0 vvm e rotação de 400 rpm..... 91
- Figura 24.** Perfil do tempo da produção de massa celular e de goma xantana durante a fermentação do meio contendo glicerina bruta com *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 em bioreator em diferentes taxas de agitação e aeração..... 94
- Figura 25.** Perfil da variação do oxigênio dissolvido e do pH durante a fermentação do meio contendo a glicerina bruta com *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 em bioreator com taxa de aeração de 1,0vvm e agitação de 500 rpm..... 95
- Figura 26.** Comportamento pseudoplástico das gomas xantana dos 11 ensaios com a variação da temperatura 25°C (A) e 85°C (B)..... 99
- Figura 27.** Comportamento da distribuição experimental entre os valores previstos x valores observados pelo modelo matemático da massa celular, produção da goma xantana e viscosidade aparente..... 101

- Figura 28.** Superfície de resposta (a) e gráfico de Pareto (b) com o comportamento da produção, g.L^{-1} , de goma xantana (cepa 2103) em relação à agitação (rpm) e aeração (vvm)..... 103
- Figura 29.** Superfície de resposta (a) e gráfico de Pareto (b) com o comportamento da massa celular, g.L^{-1} , (cepa 2103) em relação à agitação (rpm) e aeração (vvm)..... 103
- Figura 30.** Superfície de resposta (a) e gráfico de Pareto (b) com o comportamento da viscosidade aparente de goma xantana (cepa 2103) em relação à agitação e aeração.....104
- Figura 31.** Cromatogramas da solução aquosa da glicerina bruta antes da fermentação com tempo de retenção de 23,55 minutos (----) e após 120 h de fermentação com tempo de retenção de 43,0 minutos (—)..... 105
- Figura 32.** Comportamento do consumo da glicerina bruta, concentração de biomassa e produção de goma xantana pela cepa de *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103. (■) glicerina bruta (100% corresponde a 20 g.L^{-1}), (□) concentração de biomassa, e (●) goma xantana, a 500 rpm e 1,0 vvm (ponto otimizado)..... 105
- Figura 33.** Curvas TGA e derivada (DTG) para as gomas xantana obtidas com a cepa 2103 por fermentação da sacarose (controle), glicerina bruta e xantana comercial..... 109
- Figura 34.** Cromatograma do perfil de eluição de padrões de dextranas com diferentes pesos moleculares em GPC CLAE-IR usando as colunas Shodex SB 803, 804, 805 e 806 conectadas em série..... 112
- Figura 35.** Cromatogramas GPC CLAE-IR separados em colunas Shodex SB 803, 804, 805 e 806 conectadas em série, das soluções aquosas da goma xantana obtida com sacarose (A) com glicerina bruta e goma xantana comercial..... 113
- Figura 36.** Correlação entre viscosidade aparente das gomas xantanas (mPa.s) e massa molar ($\times 10^6 \text{ Da}$)..... 114
- Figura 37.** Cromatogramas dos padrões de açúcares (A) e ácidos (B) separados por CLAE-IR e UV, respectivamente..... 115
- Figura 38.** Curvas de calibração (área x concentração) dos açúcares (CLAE-IR) e dos ácidos (CLAE-UV)..... 116
- Figura 39.** Cromatogramas dos açúcares (A) e ácidos (B) da goma xantana obtida pela fermentação da glicerina bruta com a cepa 2103 (ponto otimizado)..... 120
- Figura 40.** Comportamento dos fluidos após o envelhecimento, avaliados segundo a variação da tensão de cisalhamento em diferentes taxas de cisalhamento..... 122
- Figura 41.** Composição percentual dos componentes sólidos dos fluidos de perfuração formulados com quantidades variáveis de gomas xantana e com glicerina bruta do biodiesel como lubrificante..... 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de goma xantana por fermentação de diferentes meios de cultura formulados e de substratos alternativos em diferentes escalas.....	18
Tabela 2. Composição química (%) de biopolímero produzido por diferentes cepas de <i>Xanthomonas</i>	40
Tabela 3. Principais aditivos de fluido de perfuração a base de água e respectivas funções.	46
Tabela 4. Equipamentos utilizados nos procedimentos experimentais.....	54
Tabela 5. Cepas de <i>Xanthomonas</i> utilizadas na produção de goma xantana.....	55
Tabela 6. Planejamento experimental para avaliar a influência de variáveis independentes da composição do meio fermentado sobre a produção de xantana e viscosidade aparente.....	59
Tabela 7. Planejamento experimental variando aeração e agitação para a produção de biomassa e goma xantana.....	61
Tabela 8. Formulação dos fluidos base água de goma xantana preparados segundo a norma Petrobras (2003).....	67
Tabela 9. Composição dos fluidos de perfuração base água contendo diferentes quantidades de gomas xantana como viscosificante e glicerina bruta como lubrificante.....	68
Tabela 10. Caracterização físico-química da glicerina bruta residual do biodiesel e da glicerina comercial utilizadas na etapa de fermentação para produção de goma xantana....	71
Tabela 11. Produção de goma xantana (g.L^{-1}) em meio fermentativo controle e alternativos com diferentes cepas nativas de <i>Xanthomonas</i> a 28°C, 250rpm por 120h (<i>shaker</i>) e as respectivas viscosidades aparentes.....	74
Tabela 12. Parâmetros reológicos que caracterizam a pseudoplasticidade do biopolímero sintetizado pela cepa <i>Xanthomonas campestris mangiferaeindicae</i> 2103 sintetizada em meio fermentativo contendo sacarose, glicerina bruta e glicerina comercial.....	82
Tabela 13. Parâmetros reológicos obtidos pela solução de goma xantana obtida da fermentação da sacarose e da glicerina bruta pela cepa 2103 comparados com o da goma comercial, numa concentração de 0,5%, a 25°C e 400s ⁻¹	83
Tabela 14. Matriz do planejamento experimental (valores codificados e reais) com respostas de produção de xantana e viscosidade aparente obtida por fermentação glicerina bruta por 120 horas pela cepa 356 em <i>Shaker</i>	87
Tabela 15. Produção de xantana, massa celular e sua viscosidade aparente a 0,5% (m/v), 25°C e 25s ⁻¹ sintetizada pela cepa 356 em bioreator a 200, 300 e 400 rpm e com aeração fixa de 1,0 vvm por 72 horas de fermentação.....	92

Tabela 16. Matriz do planejamento experimental com valores reais e codificados de aeração e agitação (variáveis independentes), e as respectivas respostas (variáveis dependentes) após 120 h do processo, pela cepa 2103 em bioreator.....	97
Tabela 17. Resultados dos parâmetros n e K com variação da temperatura.....	98
Tabela 18. Rendimentos ao longo de 120 horas de fermentação do ponto otimizado.....	107
Tabela 19. Evento térmico, percentagens de perda de massa e intervalos de temperatura referente às gomas xantana GX Sacarose, GX Glicerina bruta e GX Comercial.....	110
Tabela 20. Tempos de retenção (T_r) dos padrões de dextranas com diferentes pesos moleculares obtidos por GPC CLAE-IR usando as colunas Shodex SB 803, 804, 805 e 806 conectadas em série.....	112
Tabela 21. Tempo de retenção (T_r), peso molecular (PM) e da viscosidade aparente (μ) da goma xantana obtida da fermentação da sacarose e da glicerina bruta pela <i>Xanthomonas campestris mangiferaeindicae</i> 2103, comparada com a xantana comercial.....	114
Tabela 22. Composição monomérica das gomas xantana obtidas no ponto otimizado de acordo com o planejamento experimental com valores reais e com variação da aeração e agitação conforme a Tabela 16.....	118
Tabela 23. Índices reológicos exigidos pela norma Petrobras para aplicação da goma xantana como viscosificante polimérico em fluidos de perfuração.....	120
Tabela 24. Valores dos géis inicial (G_0), 10 minutos (G_{10}) e 30 minutos (G_{30}) exigidos pela norma Petrobras (2009) para aplicação da goma xantana como viscosificante polimérico em fluidos de perfuração após o envelhecimento dos fluidos.....	121
Tabela 25. Valores dos índices reológicos K (mPa.s) e n após o envelhecimento dos fluidos a 50°C por 16 horas.....	122
Tabela 26. Desempenho dos fluidos de perfuração contendo quantidades variáveis de goma xantana comercial (GX_{com}) ou a obtida por fermentação da glicerina bruta (GX_{gli}) com a cepa 2103 em bioreator 4,5L e de glicerina bruta como lubrificante.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância Simples
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
API	American Petroleum Institute
ATP	Adenosina Trifosfato
CMC	Carboximetilcelulose
CMC LV	Carboximetilcelulose Low Vis
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
EOR	Enhanced Oil Recovery
EPS	Exopolissacarídeos
FDA	Food and Drug Administration
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
LAPESCA	Laboratório de Pescado e Cromatografia Aplicada da UFBA
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NITs	Núcleos de Inovação Tecnológica
NRRL	Northern Regional Research Laboratories
PAC	Celulose Polianiônica
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PHPA	Poliacrilamida parcialmente hidrolisada
SENAI – BA	Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial da Bahia
YM	Yeast Malt

RESUMO

A goma xantana é um exopolissacarídeo sintetizado por bactérias *Xanthomonas* e de extrema importância no aspecto comercial devido às suas propriedades, principalmente por formar soluções viscosas em baixas concentrações com ampla faixa de estabilidade de pH e temperatura, sendo aplicado na indústria de alimentos, farmacêutica e petroquímica. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de gomas xantana em diferentes escalas fermentativas (shaker e bioreator) a partir da fermentação de substrato alternativo (glicerina bruta residual do biodiesel) usando cepas nativas de *Xanthomonas*, visando à caracterização do polímero obtido e o potencial de aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo. As xantanas obtidas foram avaliadas quanto à produção, viscosidade aparente, peso molecular médio (PM), termogravimetria (TGA), composição de açúcares e ácidos, e nos fluidos de perfuração base água. As 12 cepas de *Xanthomonas* foram mantidas em YM-Agar, repicadas periodicamente e 20% do inóculo preparado em meio YM foi transferido para o meio fermentativo. Inicialmente os meios fermentativos, controle e alternativo (2,0%, m/v), suplementado com KH_2PO_4 (0,1% m/v) e uréia (0,01% m/v) foram testados em shaker. As cepas *X. campestris mangiferaeindicae* 2103 e *X. axonopodis* pv *manihotis* 356 foram selecionadas em função da produção de xantana ($5,5\text{g.L}^{-1}$ e $1,24\text{g.L}^{-1}$) e viscosidade aparente (69,50mPa.s e 67,16mPa.s), respectivamente. Para aumentar a produção de goma da cepa 356, foram testadas: variação da concentração de glicerina bruta e de inóculo em shaker e em bioreator de 4,5L com variação de agitação. Os resultados máximos obtidos de produção foram de $1,38\text{g.L}^{-1}$ (shaker) e $2,13\text{g.L}^{-1}$ (bioreator). Com base nesses resultados, foi realizada a otimização da produção de goma xantana por fermentação da glicerina bruta com a cepa 2103, através de um planejamento estatístico em estrela DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) fracionado 2^2 com 4 pontos axiais e triplicata no ponto central, totalizando 11 ensaios. Duas variáveis independentes (agitação e aeração) foram avaliadas durante a fermentação em bioreator por 120 horas, sobre as respostas (produção de xantana, massa celular e viscosidade aparente). A agitação e aeração apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) na produção de massa celular e na viscosidade, e para a produção de xantana, apenas a agitação foi significativa. O ensaio 9 (1,0vvm de aeração e 500 rpm de agitação) resultou em maior produção de goma ($6,34\text{g.L}^{-1}$) aliada a maior viscosidade aparente de 252,38mPa.s (0,5%, 25°C e 25s⁻¹), e massa celular de $3,13\text{g.L}^{-1}$. As condições melhores controladas em bioreator resultaram no aumento de 253,65% na viscosidade apesar de não ter aumentando a produção. A viscosidade aparente da goma produzida em bioreator foi maior que a produzida em shaker e as gomas obtidas apresentaram propriedades pseudoplásticas com pesos moleculares próximos ao da goma xantana comercial e altamente piruvatada (18,6%), um importante indicador na qualidade reológica nas xantanas. O comportamento de TGA também foi similar ao da goma comercial. A aplicação de baixa concentração da goma xantana e da glicerina bruta, como lubrificante, em nova formulação de fluido de perfuração base água apresentou resultados de leituras reológicas, força gel, volume de filtrado, viscosidade aparente, viscosidade plástica e coeficiente de lubrificidade bastante promissores e evidenciaram propriedades próximas aos parâmetros estabelecidos na exploração de poços de petróleo.

Palavras-chave: Goma xantana, *Xanthomonas*, glicerina bruta, fluido de perfuração.

ABSTRACT

Xanthan gum is an exopolysaccharide synthesized by *Xanthomonas* bacteria and extremely important aspect in commercial properties due mainly to form viscous solutions at low concentrations with a wide range of pH and temperature stability, being applied in the food industry, pharmaceutical and petrochemical. The aim of this work was to study the production of xanthan gum fermentation at different scales (shaker and bioreactor) using alternative substrate (residual crude glycerin from biodiesel) in fermentation from native strains of *Xanthomonas*, to characterize the polymer obtained and potential application of drilling fluid in oil wells. The xanthan obtained were evaluated for yield, viscosity, average molecular weight (MW), thermogravimetry (TGA), sugar composition and acids, and water based drilling fluids. The 12 strains of *Xanthomonas* were maintained in YM-agar, maintained periodically and 20% of the inoculum prepared in YM medium was transferred to the fermentation medium. Initially the fermentation media, control and alternative (2.0%, w/v), supplemented with KH_2PO_4 (0.1% w/v) and urea (0.01% w/v) were tested in shake. The strains *X. mangiferaeindicae* 2103 and *X. campestris axonopodis pv manihotis* 356 were selected based on the production of xanthan (5.5g.L^{-1} and 1.24g.L^{-1}) and apparent viscosity (69.50mPa.s and 67.16mPa.s), respectively. To increase gum production of the strain 356 were tested: variation in the concentration of crude glycerin and inoculum in a shaker and 4.5 L bioreactor with varying agitation. The results were obtained maximum production of 1.38g.L^{-1} (shaker) and 2.13g.L^{-1} (bioreactor). Based on these results, it was performed the optimization of the production of xanthan gum obtained by fermentation of crude glycerin with strain 2103, through a statistical planning in star DCCR (Delineation central composite rotational) design 2^3 with 4 axial points and center point in triplicate, totaling 11 tests. The influence of two independent variables (agitation and aeration) were evaluated during fermenting in reactor for 120 hours and the responses variables were xanthan production, cell mass and viscosity. The agitation and aeration showed statistically significant effects ($p < 0.05$) in the production of cell mass and viscosity, and for the production of xanthan, only stirring was significant. The test 9 (1.0 vvm aeration and 500 rpm agitation) resulted in increased production of gum (6.34g.L^{-1}) with higher apparent viscosity of 252.38mPa.s (0.5%, 25°C and 25s^{-1}), and cell mass of 3.13g.L^{-1} . The best conditions in controlled bioreactor resulted in an increase in viscosity of 253.65% despite not having increased production. The apparent viscosity of the gum produced in the bioreactor was greater than that produced in shaker and gums obtained showed pseudoplastic properties with molecular weights close to xanthan gum commercial and highly pyruvic acid (18.6%), an important indicator in rheological behavior in xanthans. The TGA behavior was similar to that of commercial gum. The application of low concentration of xanthan gum and crude glycerin, as a lubricant, in a new formulation of water-based drilling fluid has presented results of rheological readings, gel strength, filtrate volume, viscosity, plastic viscosity and lubricity coefficient and showed promising properties close to the parameters established in exploration of wells oil.

Keywords: Xanthan gum, *Xanthomonas*, crude glycerin, drilling fluid.

1 INTRODUÇÃO

Biopolímeros microbianos são polissacarídeos sintetizados por bactérias, fungos e leveduras. Xantanas são exopolissacarídeos (EPS) produzidas por *Xanthomonas*, e possuem a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso. Apresentam-se como uma alternativa às gomas tradicionais devido às suas propriedades reológicas, sendo amplamente utilizadas como espessantes, geleificantes, agentes de suspensão, colóides protetores e estabilizantes, nas indústrias de alimentos, farmacêutica, química e petroquímica (SUTHERLAND, 1993; MEDEIROS *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2001; FARIA, 2005; BRANDÃO *et al.*, 2008).

Do ponto de vista comercial, a goma xantana é o polissacarídeo microbiano mais importante, com uma produção mundial de cerca de 40.000 toneladas por ano, movimentando um mercado atual de aproximadamente US\$ 270 milhões, estimado para 2015 atingir US\$ 400 milhões e 80.000 t/ano (RAMOS, 2011). As principais indústrias produtoras de xantana são Kelco (EUA), Rhône-Poulenc (França), Pfizer (EUA) e Mero-Rousselot-Santia (França) (PRADELLA, 2006).

As matérias-primas utilizadas para a produção de goma xantana são glicose e etanol. O Brasil por ser o maior produtor dos insumos básicos para produção de xantana, como a sacarose (fonte de carbono do meio fermentativo) e o etanol (solvente utilizado para a precipitação da goma xantana), apresenta alto potencial competitivo para a produção do biopolímero a nível mundial com estimativa de 40% a 60% de redução dos custos (BRANDÃO *et al.*, 2008). Além disso, um país agroindustrial como o Brasil dispõe ainda de inúmeras fontes de biomassas fermentáveis além da sacarose, como a glicerina bruta residual do Biodiesel, que pode impactar ainda mais na redução do custo de produção, além de viabilizar um destino do co-produto (glicerina bruta).

Na produção do biodiesel, a glicerina é o principal co-produto e possui baixo custo por ser de difícil descarte e para maior aplicabilidade do produto (cosmético, emulsificantes, plastificantes e outros) é necessária a sua purificação, que por ter um custo elevado torna-se inviável economicamente. Segundo Borges *et al.* (2005), em média para cada 100 litros de biodiesel produzido, resulta em 10 quilos de glicerina. Por ser gerada em grande quantidade tanto no Brasil e no Mundo, resulta em problemas de consumo no mercado, que não tem condições de absorver tal oferta.

Portanto, o emprego da glicerina bruta constitui, quando convenientemente suplementada com sais e nutrientes (geralmente uma fonte de nitrogênio e fósforo), um substrato alternativo para a produção de biopolímeros por fermentação, o que abre uma nova alternativa de uso desse co-produto e uma nova fonte de renda para o setor (BRANDÃO *et al.*, 2008; PADILHA *et al.*, 2010).

A produção de goma xantana obtida via fermentação da glicerina bruta, co-produto do biodiesel, não é grau alimentícia nem farmacêutico e cosmético, entretanto poderia ser utilizada como aditivo em fluido de perfuração e na EOR (Recuperação Avançada de Petróleo), uma vez que grandes quantidades são necessárias e o aumento do custo limita maiores aplicações apesar das ótimas propriedades reológicas e químicas (KULICKE *et al.*, 1990; XIE, 1992; GALLINO *et al.*, 2001; BORGES, 2007; BORGES *et al.*, 2009).

A formulação de um fluido de perfuração é de fundamental importância para que este possa auxiliar durante o processo de perfuração. Diversos produtos são adicionados ao fluido em concentrações adequadas, dentre eles, argilas e polímeros utilizados para controlar a viscosidade, o limite de escoamento, a força gel e o controle de filtrado, para conferir ao fluido uma taxa adequada de remoção dos sólidos perfurados e de capacidade de estabilização das paredes do poço (THOMAS, 2001).

A perfuração de um poço é uma tecnologia-chave para exploração e produção de petróleo, uma vez que os envolvidos neste processo tais como equipamentos gerais, mão de obra especializada, e qualidade/eficiência dos fluidos de perfuração, podem representar de 40 a 80% dos custos totais de exploração (ALMEIDA; ARAÚJO, 2002). Os fragmentos da rocha gerados, durante a perfuração através de ação rotacional da broca, são removidos continuamente pelo fluido de perfuração (THOMAS, 2001).

Os fluidos de perfuração a base de água apresentam baixo custo em relação aos fluidos à base de óleo e sintéticos, mas apresentam a desvantagem de causar danos a formações rochosas sensíveis ou simplesmente não serem adequados em função da elevada afinidade hidrofílica das formações (AMORIM *et al.*, 2005). A utilização de um ou outro tipo de fluido depende da profundidade do poço e do tipo de formação a ser perfurada (BORGES, 2007).

Segundo Thomas (2001), os fluidos à base de água são os mais utilizados nas perfurações em todo mundo, por serem biodegradáveis, apresentarem baixa toxicidade e baixa bioacumulação, e ecologicamente seguros. A principal função da água neste tipo de fluido é prover o meio de dispersão para os materiais coloidais, principalmente argilas e polímeros.

Para isto, os biopolímeros devem apresentar alta viscosidade em baixas concentrações, comportamento pseudoplástico e estabilidade da viscosidade à salinidade, temperatura e condições alcalinas (SHAH; ASHTAPUTRE, 1999); de modo que apresente fácil injeção, mantenha os cascalhos em suspensão, facilitando a remoção destes e estabilize as paredes do poço. Por apresentar tais características, a goma xantana passou a ser amplamente utilizada, comparadas com outros polímeros comumente utilizadas nesse tipo de fluido, como CMC (Carboximetilcelulose), PAC (Celulose Polianiônica) e PHPA (Poliacrilamida parcialmente hidrolisada), por ser menos sensível a condições de alta salinidade e temperatura (BORGES *et al.*, 2009; SHAH; ASHTAPUTRE, 1999).

Entretanto, o elevado custo de produção de goma xantana tem limitado uma maior aplicação, principalmente da recuperação terciária de petróleo (EOR), não existindo ainda outro substituto em escala comercial que supere as qualidades da xantana nesse setor na indústria petrolífera (SCAMPARINI; LUVIELMO, 2009).

Visando a diminuição do custo da produção de goma xantana, precisamente com relação às matérias-primas fermentescíveis, devido ao alto custo que limitam o potencial de mercado petroquímico desse polímero, busca-se substratos alternativos (PADILHA *et al.*, 2010). A utilização da glicerina bruta residual do biodiesel tanto como matéria-prima para produção de xantana grau não alimentício e também como substituto do lubrificante em fluido de perfuração de poços são inovadores, uma vez que elimina os problemas ambientais com o descarte do efluente com maior competitividade no preço final.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a produção de goma xantana em diferentes escalas fermentativas (*shaker* e bioreator) a partir da fermentação de glicerina bruta residual do biodiesel e avaliar o potencial de aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo.

2.2 OBJETIVO ESPECIFICO

- Selecionar variedades de *Xanthomonas* nativas que resultem na biossíntese da goma xantana com máximas produção e viscosidade, e propriedades reológicas adequadas para aplicação em fluidos de perfuração de poços de petróleo.
- Avaliar o efeito das melhores condições em bioreator sobre a produção e viscosidade aparente de goma xantana.
- Otimizar a produção de xantana em bioreator variando a aeração e agitação do meio fermentativo aplicando a metodologia de superfície de resposta, bem como caracterizar e avaliar a viscosidade aparente e as propriedades reológicas do biopolímero.
- Avaliar o potencial de utilização da goma xantana obtida por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel para aplicação na Recuperação Avançada de Petróleo (EOR) e como viscosificante polimérico de fluido de perfuração de poços de petróleo.
- Formular e caracterizar um novo fluido de perfuração contendo menores concentrações de goma xantana e glicerina bruta como lubrificante.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 GOMA XANTANA

Goma xantana é um biopolímero microbiano natural, considerado como exopolissacarídeo (EPS), produzido por cepas de *Xanthomonas*, descoberta em meados de 1950, pela *Northem Regional Research Laboratories* (NRRL) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. A descoberta tornou-se invenção, inovação e provocou grande interesse no mundo científico e industrial com aplicação nos segmentos de alimentos, fármacos, cosméticos, químico e de petróleo (BORN *et al.*, 2002; LUPORINI; BRETAS, 2008; RAMOS, 2011).

As gomas xantana apresentam propriedades únicas, incluindo a capacidade de produzir géis ao combinar-se com o solvente apropriado, dispersante em água fria ou quente, produzindo soluções ou misturas viscosas; formar géis de alta viscosidade em baixas concentrações, estabilidade em meios ácidos, estabilidade a congelamento e descongelamento diferenciando-a das demais gomas solúveis em água (PASQUEL, 1999; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; NERY, 2007).

A goma xantana apresenta uma estrutura primária que normalmente consiste em unidades repetidas de pentassacarídeos formados por duas unidades de glicose, duas unidades de manose e uma unidade de ácido glucurônico na proporção molar de 2,0:2,0:1,0, além de grupos piruvato e acetil (Figura 1). A sua estrutura, em geral, consiste em uma cadeia celulósica principal de D-glucopiranosil, unidas por ligações β nas posições 1 e 4, substituída em O-3 a cada unidade alternada de glicose, por uma cadeia lateral composta de um trissacarídeo. A cadeia lateral consiste de uma molécula de ácido glucurônico entre as duas unidades D-manopiranosil (VENDRUSCOLO, 2005). A unidade de manose terminal pode ser substituída em O-4 e/ou O-6 por um grupo piruvato, onde aproximadamente metade dos resíduos D-manose terminais podem conter um ácido pirúvico ligado, com distribuição indeterminada. A unidade D-manose ligada à cadeia principal pode conter grupo acetil na posição O-6. A presença dos ácidos glucurônico, acético e pirúvico produz um polissacarídeo do tipo aniônico (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). Este biopolímero é um exopolissacarídeo hidrossolúvel, aniônico, ramificado, extracelular, com unidades repetidoras de

pentassacarídeos e com massa molecular aproximada de 2.10^6 Da, podendo atingir até 13 a 50.10^6 Da (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

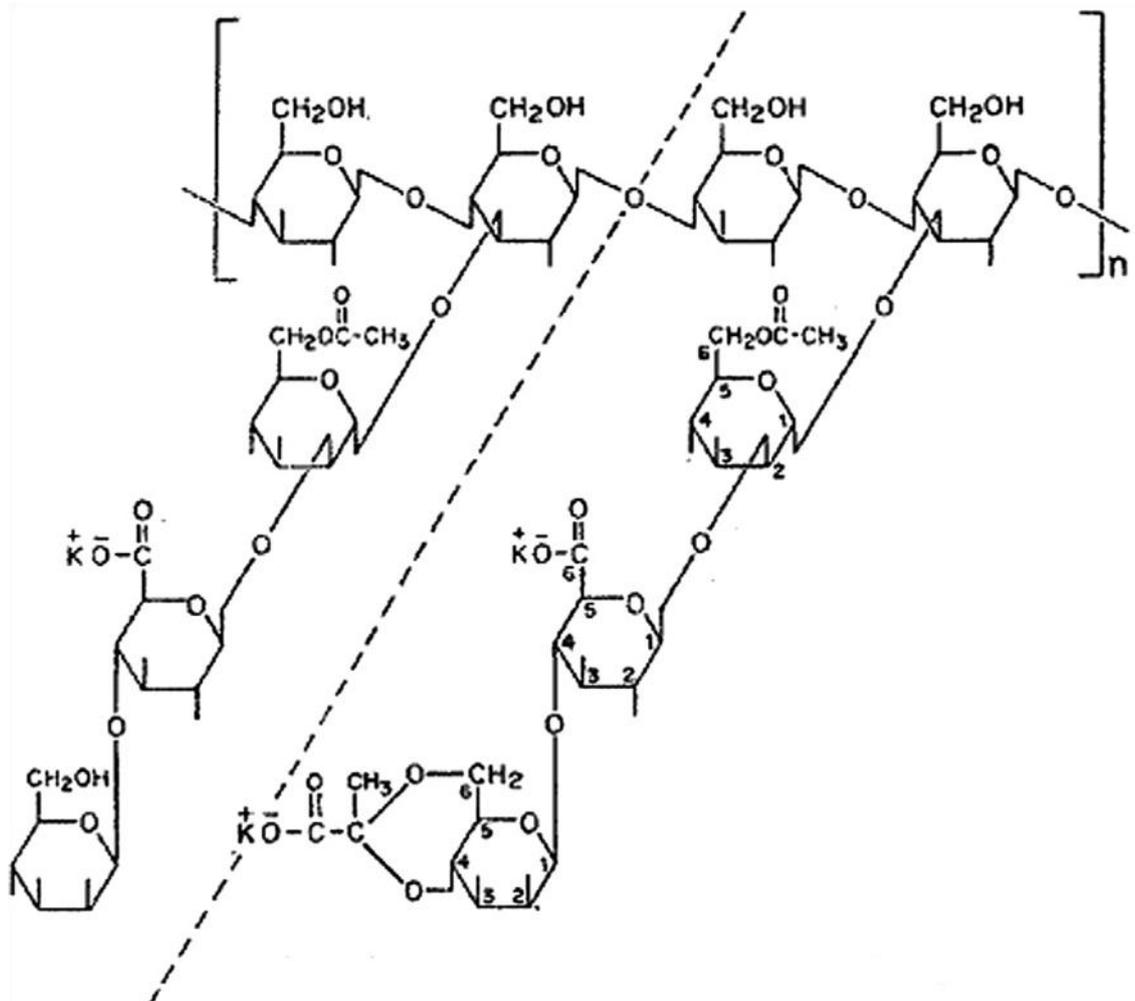


Figura 1. Estrutura do monômero polimérico de goma xantana (PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011).

Em soluções aquosas, a xantana tem sido largamente estudada não apenas pela importância e aplicação comercial, mas também por sua característica de sofrer transição conformacional, ordenada (hélice) para desordenada (espiral), devido a alterações de temperatura, força iônica, pH e concentrações poliméricas (GULREZ *et al.*, 2012; RINAUDO 2001).

As moléculas da goma xantana que adotam uma conformação helicoidal (simples ou dupla-hélice) podem ser descritas como hastes rígidas sem tendência para associar-se resultando num comportamento de um espessante. Como as mais importantes propriedades

são devido ao estado ordenado da macromolécula, a goma xantana pode sempre ser usada na presença de eletrólitos (ASSAF-AL *et al.*, 2012; HAMED; BELHADRI, 2009; LUPORINI; BRETAS, 2008; NERY, 2007; PRADELLA, 2006).

A molécula de xantana é perfeitamente regular quanto à presença de ramificações a cada duas unidades de glicose, no entanto, pode haver certa irregularidade, onde nem todas as cadeias laterais podem estar acetiladas ou piruvatadas. Frequentemente, a unidade repetidora de pentassacarídeo não está piruvatada mais que um monômero, mas esta proporção varia em função da cepa utilizada e das condições de cultivo (LINDEN; LORIENT, 1996).

A xantana é um polissacarídeo de elevado interesse industrial, principalmente para a indústria de alimentos, farmacêutica e petroquímica. Nesses setores há uma contínua substituição dos polissacarídeos convencionais por produtos de origem microbiana, por inúmeras razões, como a possibilidade de modificação de suas características reológicas através do controle de parâmetros de fermentação, da independência climática, entre outras (VENDRUSCOLO, 1995).

A busca de cepas que produzam xantana com alta viscosidade tem sido muito pesquisada, porque quanto menor o percentual utilizado para atingir a textura, viscosidade ou estabilidade desejada, menor será o custo e a interferência na cor do produto final. Da mesma forma para atingir as especificações para a área de exploração de petróleo necessita-se obter xantanas com alta viscosidade e parâmetros reológicos adequados para a utilização em fluidos de perfuração (MAYER *et al.*, 2008). Porém, em algumas aplicações específicas, como por exemplo, na retenção de aromas e em agentes suspensivos, a alta viscosidade não é desejada, buscando-se, para estes casos, cepas que produzam xantana com baixa viscosidade (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

A principal característica da xantana é sua capacidade de modificar a reologia ou comportamento de fluxo das soluções (MARGARITIS; PACE, 1985). Suas propriedades são determinadas por sua composição química, dependente principalmente da quantidade de substituintes acetil e piruvil, do peso molecular do polímero, arranjos e das ligações moleculares (PACE, 1991). As cepas de *Xanthomonas*, o meio fermentativo e as condições operacionais na fermentação influenciam no rendimento e na composição química da goma xantana resultante (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

As propriedades desejáveis para utilização da goma xantana nos segmentos industriais são: comportamento pseudoplástico, elevada viscosidade em baixas concentrações (0,05-1%), devido a sua estrutura ramificada e seu alto peso molecular, bem como

estabilidade em ampla faixa de temperatura e pH (VENDRUSCOLO, 1995; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). Essas são propriedades físico-químicas que superam todos os outros polissacarídeos disponíveis no mercado. A xantana apresenta uma compatibilidade plena com uma grande diversidade de insumos usados industrialmente, como metais, ácidos, sais, agentes redutores, outros texturizantes, solventes, enzimas, surfactantes, conservantes e em blendas com outros tipos de gomas, por exemplo, com galactomananas (gomas guar e goma de algaroba), a xantana apresenta um aumento sinérgico de viscosidade e formam géis termorreversíveis (KALOGIANNIS *et al.*, 2003).

Apesar de amplas possibilidades do uso de polímeros microbianos em alimentos, os mercados de consumo mundiais mais importantes de polissacarídeos são as indústrias de petróleo, mineração, têxtil, termoquímica, tintas de impressão, papel, cosméticos, farmacêutica e de produtos agropecuários onde, além de serem utilizados como formadores de gel, espessantes e agentes de suspensão, são utilizados também por suas propriedades floculantes, adesivas, formadoras de filme, lubrificantes e redutoras de fricção (STREDANSKY; CONTI, 1999; DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007).

A aplicação da goma xantana tem despertado interesse principalmente na área petrolífera em projetos de recuperação avançada de petróleo (EOR) e em fluidos de perfuração de poços de petróleo, devido à suas desejáveis propriedades físico-químicas que nenhum outro substituto em escala comercial superou suas qualidades (SCAMPARINI; LUVIELMO, 2009).

3.1.1 Mercado de goma xantana

Considerando que aproximadamente 80% da tecnologia disponível atualmente é protegida na forma de patente, uma prospecção do número destes registros fornece uma tendência tecnológica do mercado do biopolímero. Um universo de dados composto por 9.224 registros de documentos de patente referente ao biopolímero goma xantana foi levantado por Machado *et al.* (2012), que não representa o total de invenções protegidas nesta área, uma vez o direito da patententeamento é territorial, e portanto, uma mesma patente pode ser depositada em diferentes países, para garantir o direito de exclusividade aos seus inventores nos mercados considerados como mais relevantes. A partir de 1960, pesquisas foram realizadas em alguns laboratórios industriais, culminando na produção semi-comercial da goma Kelzan pela empresa Kelco (Estados Unidos) e, em 1964, a produção comercial do polímero para

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

propósito industrial tornou-se viável para a aplicação em produtos não alimentícios (HARDING *et al.*, 1994). Em 1969, a goma xantana foi aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso como estabilizante, emulsificante e espessante em alimentos (ROCKS, 1971).

Os países detentores de tecnologia de proteção dos bens intangíveis relativos ao mercado de xantana por fermentação de glicose são os Estados Unidos, seguido do Japão e Reino Unido (Figura 2).

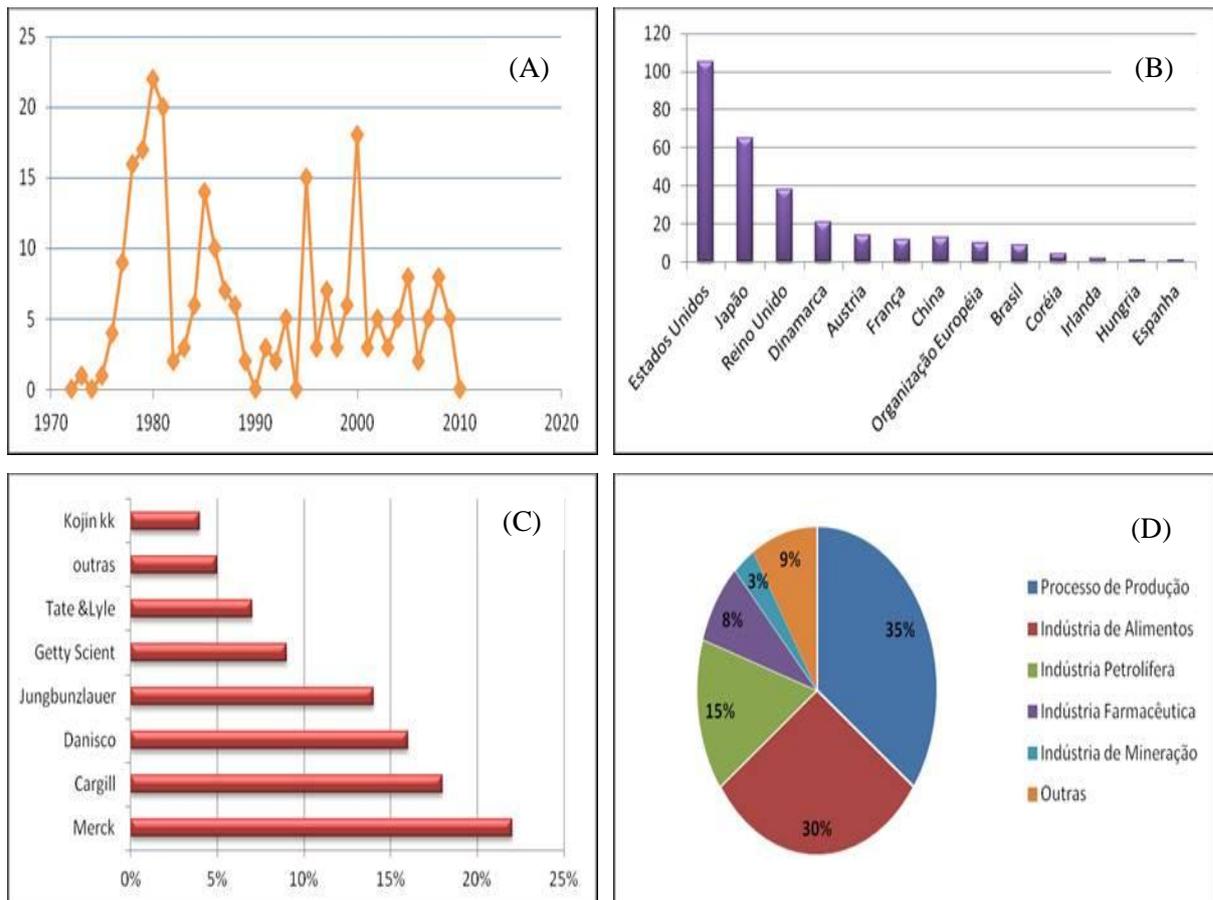


Figura 2. Evolução anual de depósitos, por unidade, de patentes 1970 a 2010 (A), depósitos, por unidade, de patentes por país de origem/organização (B), depósitos, por percentual, de patentes por empresa (C) e depósitos, por percentual, de patentes por setor industrial (D) (MACHADO *et al.*, 2012).

O mercado de inovação é atualmente dominado pela Merck, Cargill e Danisco. Entre os anos de 1970 e 1985 constata-se um número de depósitos de pedidos relacionados à tecnologia básica de obtenção da goma xantana. Após esse período, começa a surgir às patentes relacionadas a aplicações da goma xantana, bem como a técnicas mais modernas de obtenção do biopolímero, destacando-se o uso de fontes alternativas de carbono, como por

exemplo, a sacarose. Nos anos de 2009 e 2010 foi identificando um pequeno número de documentos, devido provavelmente ao período de sigilo, que é de 18 meses após o depósito, para que o documento seja publicado (Figura 2).

Do volume total de patentes depositadas relacionadas à goma xantana, 35% está relacionada com o processo de produção, 30% utilizado na indústria de alimentos, 15% na indústria de petróleo, 8% na indústria farmacêutica, 3% na mineração e 9% em outras aplicações, como por exemplo, indústria têxtil, termoquímica, tintas, papel e de produtos agropecuários, apresentados na Figura 2 (ROSALAM; ENGLAND, 2006; MACHADO *et al.*, 2012).

A análise dos documentos de patentes depositados realizada por Machado *et al.* (2012) mostra que a tecnologia está concentrada nos países mais desenvolvidos. Os Estados Unidos é responsável pelo maior número de depósitos de patentes na área de produção, caracterização e aplicações da goma xantana. Isso já era esperado, pelo fato da tecnologia de produção da goma xantana ter sido inventada principalmente nos Estados Unidos, e o país continua sendo o maior produtor mundial.

Segundo Machado *et al.* (2012), o Brasil tem apenas nove patentes depositadas relativa a produção da goma xantana, sendo que destas, três são de titularidade da Universidade Federal da Bahia, duas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, uma do Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial da Bahia (SENAI – BA) e as três restantes de inventores independentes. Esse cenário de poucas patentes depositadas na área pode ser explicado pelo fato do Brasil ser importador deste biopolímero, aliado ao feito de ainda não o produzir em escala industrial. Entretanto, há expectativa que num futuro próximo, esse quadro possa mudar já que a produção e a aplicação de xantana têm sido extensamente estudadas por diversos grupos de pesquisadores de universidades brasileiras.

Vale ressaltar também, que a imaturidade do sistema de inovação no Brasil também contribui para esse cenário de poucas patentes depositadas, isso porque não existe uma articulação eficiente entre governo, empresas e universidades, capaz de promover um sistema de P&D (Pesquisa e Desenvolvimento) eficaz, a ponto de permitir o avanço da inovação no Brasil. É notório que existem alguns esforços para mudar esse cenário, como por exemplo, a promulgação no Governo Lula da Lei de Inovação (10.973/2004). Essa lei mantém e amplia o apoio às parcerias entre universidade e empresa, promove a participação das universidades e dos centros de pesquisa no processo de inovação, e permite também à transferência do conhecimento da universidade para as empresas, através principalmente da obrigatoriedade de

criação dos Núcleos de Inovação Tecnológica (NITs) nas universidades. Ainda como estratégia para mudar o quadro inovativo no país, foi promulgada, em 2005, a Lei 11.196 (substituída em 2007 pela Lei 11.487) que é conhecida como a Lei do Bem, que autoriza a utilização de benefícios fiscais para as empresas que invistam em P&D, sem necessidade de pedido formal. Esta facilidade agiliza e amplia o estímulo aos investimentos em atividades inovativas.

A goma xantana tem um mercado mundial de cerca de US\$ 270 milhões e 40.000 t/ano com taxa de crescimento contínua de 5 a 10% ao ano, perfazendo, em 2015, mercado de US\$ 400 milhões e 80.000 t/ano (PRADELLA, 2006; MAYER *et al.*, 2008). O Brasil segue a tendência mundial de incremento no consumo de xantana, mesmo sendo esta totalmente importada, demonstrando a relevância de se investir em uma produção nacional competitiva, já que no âmbito nacional se dispõe de matéria-prima básica para a produção: sacarose como substrato para fermentação e álcool para recuperação do polímero (MOREIRA, 2002; BORGES; VENDRUSCOLO, 2008). O substrato, no Brasil pode representar um baixo custo de produção, diferente do cenário de outros países, onde o custo do meio fermentativo é um fator crítico sob o aspecto comercial na produção comercial do biopolímero. Diante disso, a continuação de políticas públicas que visem a articulação e incentivo entre parcerias universidade-empresa se tornam essenciais para o avanço inovativo no país na área de produção e utilização da goma xantana. Além disso, estudos de seleção de cepas e de condições operacionais de produção são necessários na busca de produtos que possam competir com os atualmente comercializados (MESOMO, 2007; ROTTAVA, 2005).

A glicose e a sacarose são citadas na literatura como fontes preferenciais de carbono para a produção de xantana, entretanto diversos estudos têm avaliado fontes alternativas tais como glicerina ou glicerol, resíduos de frutas, mandioca e demais resíduos. Na pesquisa em bases de patentes no escritório europeu de Machado *et al.* (2012), diversos documentos descrevem o processo de produção da goma xantana utilizando meios fermentativos alternativos, como por exemplo, glicerol ou glicerina, resíduos de frutas, mandioca, batata e resíduos do café, melão, soro de leite, bagaço e caldo de cana, entre outros. Utilizando meios alternativos em processos fermentativos, como os resíduos agroindustriais, é possível reduzir os custos da produção, além de minimizar os problemas ambientais, pois auxilia na eliminação destes resíduos. Como exemplo, é citado o documento de patente brasileiro PI0705950-7 (BRANDÃO *et al.*, 2009) resultante da atual Tese (Anexo) que utiliza a glicerina ou glicerol, que é subproduto do biodiesel, como fonte de substrato utilizado na

fermentação por *Xanthomonas* para a obtenção da goma xantana. O glicerol é um subproduto da cadeia do biodiesel, que surgiu mundialmente como uma alternativa promissora aos combustíveis minerais, derivados do petróleo e sua produção se encontra em constante aumento em todo o mundo, inclusive no Brasil. A utilização desse subproduto como substrato para a produção da goma xantana tem uma repercussão bastante promissora, contribuindo para a diminuição dos custos de produção do biopolímero, que possui grande aplicação industrial e também com a destinação dos resíduos gerados. Visando uma maior aplicação do biopolímero, foi desenvolvida e depositada a patente junto ao INPI (Protocolo 011120000069, 2012) que visa a aplicação dessa goma xantana e da glicerina bruta do biodiesel na área de fluido de perfuração de poços de petróleo em parceria entre a Universidade Federal da Bahia (UFBA) e empresa especializada da área de fluido de perfuração (Empresa Carboflex).

3.2 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

A produção industrial de goma xantana é feita, geralmente, com o uso de glicose de milho como fonte de carbono além de fonte de nitrogênio e sais minerais como componentes do substrato fermentescível. Contudo, o aumento da demanda comercial do produto indica que a glicose não é a fonte natural mais econômica. Isto faz com que sejam investigadas novas alternativas para a produção da goma xantana (LUPORINI; BRETAS, 2008).

Na escala de bancada, a otimização das condições operacionais de produção de goma xantana, tendo em vista sua maior flexibilidade e menor custo de operação, sendo que os dados básicos sobre o processo devem ser levantados dentro do maior nível de detalhamento possível. Nesta escala devem ser realizadas as tarefas básicas, como a seleção do microrganismo e o estudo das condições operacionais (BANDINO; SCHMIDELL, 2001).

No processo geral de produção da goma xantana (Figura 3), primeiramente, a cepa microbiana selecionada é preservada para estocagem por longo prazo através de métodos que mantenham as propriedades desejadas. Para produzir a goma xantana, culturas de *Xanthomonas* são cultivadas usando fermentação aeróbica, através da técnica de repicagem de microrganismos (NERY, 2007; BRANDÃO, 2008). O meio esterilizado, composto de carboidratos, uma fonte de nitrogênio e sais minerais, é inoculado com cultura selecionada, na etapa de fermentação, que ocorre por incubação a 28 até 30°C sob agitação por dias. A goma xantana é precipitada em solvente, (isopropanol, etanol ou acetona), separada, seca, moída e então embalada (DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007; NERY, 2007; BRANDÃO, 2008). O

crescimento dos microrganismos e a produção de goma xantana são influenciados por fatores tais como o tipo de bioreator usado, o modo de operação (batelada ou contínuo), a composição do meio, as condições da cultura (temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido) (SCAMPARINI; LUVIELMO, 2009; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; CHI; ZHAO, 2003).

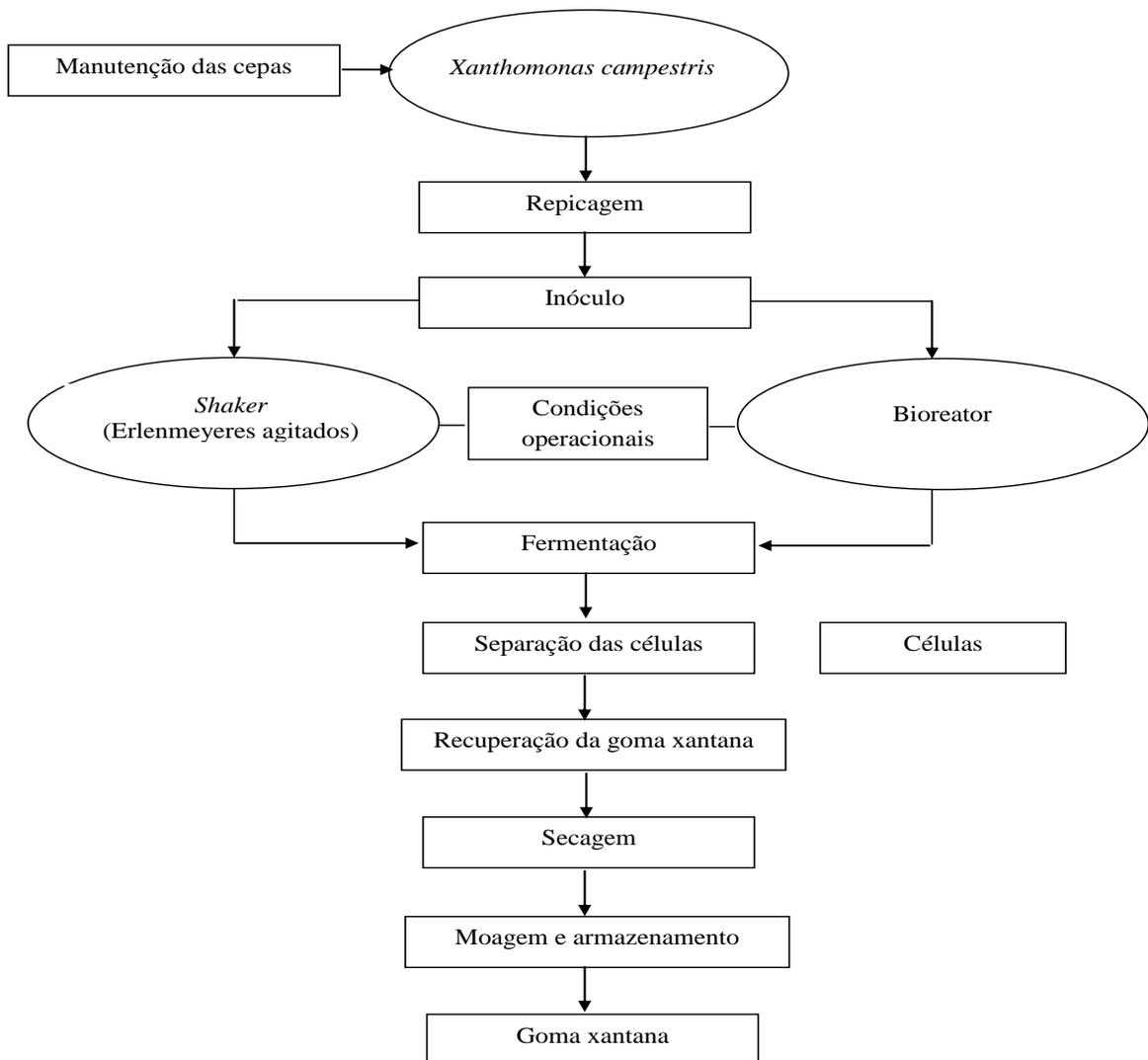


Figura 3. Etapas de processo para produção de goma xantana em escala laboratorial.

A xantana é produzida como metabólito secundário e através da dissociação do processo em duas fases distintas: a fase de crescimento, onde maior concentração de nitrogênio do meio fermentativo é requerida para o crescimento celular e a fase de produção, onde maior concentração de carbono no meio fermentativo é necessária, visando o acúmulo do produto (LO *et al.*, 1997 apud NITSCHKE *et al.*, 2001). Um problema importante

relacionado com a produção da goma xantana deve-se à instabilidade das linhagens de *Xanthomonas*, resultando numa variação de peso molecular do polissacarídeo, assim como no grau de piruvilação e acetilação (LUPORINI; BRETAS, 2008; NERY, 2007).

Estudando-se e controlando-se as variáveis do processo e seus efeitos na síntese do polímero, pode-se desenvolver um econômico processo produtivo. A estrutura básica da maioria dos exopolissacarídeos não muda com as condições de produção, mas o teor dos grupos ligados à estrutura básica do polímero, como o acil e outros, podem variar. Essa variação pode provocar efeitos drásticos nas propriedades dos polímeros e, portanto, definir ou limitar a variedade de aplicações (PAPAGIANNI *et al*, 2001).

3.2.1 Bactérias *Xanthomonas*

A bactéria do gênero *Xanthomonas* foi isolada por Vers em 1940 e é capaz de elevar a viscosidade do meio onde se desenvolve, devido à secreção no meio do exopolissacarídeo aniônico, a goma xantana (MESOMO, 2007). A espécie *Xanthomonas campestris*, a mais numerosa e abundante do gênero, divide-se em aproximadamente em 125 patovares e infectam plantas (Figura 4), algumas de interesse agrícola, causando imenso prejuízo às lavouras como lesões nos frutos, folhas e ramos, e pode atingir as raízes, resultando escurecimento dos vasos condutores devido à presença do polímero (BRADBURY, 1984; THEODORO; MARINGONI, 2002; CANUTO, 2006).

O isolamento e triagem de cepas de *Xanthomonas* do habitat natural é uma importante ferramenta para melhorar a produção e as propriedades reológicas da xantana (NITSCHKE; THOMAS, 1995; GUPTE; KAMAT, 1997; ANTUNES *et al.*, 2000).

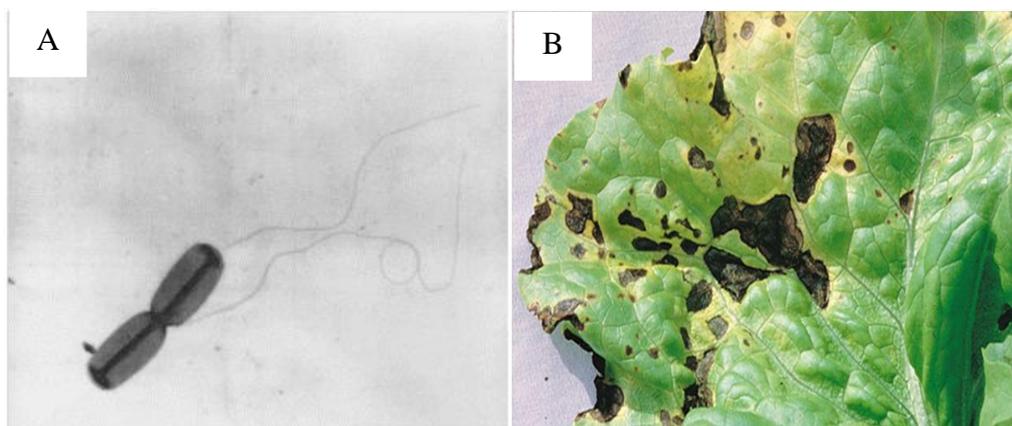


Figura 4. Ilustração da bactéria *Xanthomonas campestris* (A) e folha infectada pela bactéria (B) (García-Ochoa *et al.*, 2000).

As cepas de *Xanthomonas* utilizadas para a produção de goma xantana são selecionadas e cultivadas por métodos convencionais (ROSALAM; ENGLAND, 2006). Um método tradicional de manutenção de culturas bacterianas é a repicagem tubo-a-tubo, que consiste basicamente em repicar o microrganismo de um tubo de cultura para outro a intervalos de tempo, e geralmente é utilizado em tubo com meio inclinado, sendo que o armazenamento da cultura após crescimento é realizado a temperaturas de refrigeração (em torno de 4°C) (BAIOCCO, 1997).

A modificação genética das linhagens pode levar a melhorias nas propriedades requeridas para aplicações de recuperação da cepa ou suplementação do meio, ou ainda aumentar a produção, reduzindo o tempo de fermentação e simplificando a recuperação e purificação do produto no processo (ROSALAM; ENGLAND, 2006; MESOMO, 2007).

3.2.2 Inóculo

O objetivo da produção do inóculo é aumentar a concentração celular na etapa inicial do processo fermentativo, limitando a produção da goma xantana, pois o biopolímero liberado no meio envolve as células dificultando o transporte de nutrientes e estendendo a fase log de crescimento (PONS *et al.*, 1989; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

A fase de crescimento exponencial ou log ocorre quando as células se dividem firmemente, em ritmo constante. Nesta etapa ocorre o crescimento celular máximo, a população é praticamente uniforme em tempos de composição química, atividade metabólica e outras características. A fase estacionária ocorre quando a fase log começa a diminuir, a população permanece constante, talvez pela exaustão de alguns nutrientes que reflete no número de divisões celulares. As células bacterianas nessa fase são morfológica e bioquimicamente diferentes das células na fase de crescimento (log) exponencial, sendo tipicamente mais resistentes à variações físicas e químicas submetidas. Durante o acúmulo de inóculo, com o intuito de aumentar a concentração celular, há uma diminuição da produção de goma, pois a formação do exopolissacarídeo em torno das células impede o transporte maciço dos nutrientes e estende a fase de retardação do crescimento (PONS *et al.*, 1989; NERY, 2007).

A concentração de células no inóculo (densidade ou tamanho), o estado fisiológico, a idade das células e ainda, a morfologia do microrganismo são fatores importantes nas etapas de preparo do inóculo em um processo fermentativo. As características do inóculo dependem

do processo fermentativo que será utilizado e do produto de interesse na fermentação (CANUTO, 2006).

Na produção de goma xantana, as células da *Xanthomonas* são inoculadas no meio de produção contendo os nutrientes necessários. A preparação do inóculo ocorre através da transferência do microrganismo viáveis por meio de uma alça metálica retiradas do meio sólido de manutenção da cepa para um pequeno volume de um meio líquido complexo. A incubação do inóculo deve ser limitada em um período curto de tempo (horas) a fim de se evitar uma significativa produção de goma (CANUTO, 2006).

Os meios empregados para o crescimento das *Xanthomonas* são complexos. O mais comumente usado é o meio YM, composto por D-glicose, peptona bacteriológica, extrato de levedura, extrato de malte, e necessitando utilizar o meio YM-agar, e uma forma semissintética do YM designada como YM-T, composto pelo meio YM mais $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$, PO_4HK_2 e MgSO_4 , e o pH é ajustado para 7,0 com adição de HCl. O crescimento é bastante parecido nos dois meios e a biomassa máxima produzida também são similares (GARCÍA-OCHOA *et al*, 2000).

3.2.3 Produção e biossíntese de goma xantana

O custo do meio de fermentação representa um fator crítico na produção comercial de xantana e o uso de substratos alternativos mais baratos pode resultar em menor custo do produto final (NERY, 2007; LUPORINI; BRETAS, 2008).

O processo fermentativo pode ser efetuado por fermentação submersa de maneira descontínua ou contínua. Na fermentação descontínua ou em batelada, o cultivo das bactérias é adicionado ao meio contendo os substratos necessários ao desenvolvimento do microrganismo e são fornecidas as condições ideais para que a biossíntese ocorra. No momento que a concentração do produto atingir o valor máximo, o processo fermentativo é finalizado. Em escala laboratorial, este método pode ser realizado em agitadores orbitais ou em reatores. Nos agitadores orbitais (shaker), apenas pode-se controlar a temperatura, o tempo e agitação do processo, enquanto que em reatores o controle é mais rigoroso sendo possível monitorar outros parâmetros como pH, concentração de oxigênio dissolvido e velocidade de agitação (rpm) do meio fermentativo. No processo contínuo, a operação é realizada adicionando-se continuamente o meio esterilizado que contém o substrato, enquanto os

produtos de reação são removidos sem a interrupção do processo (BRANDÃO, 2008; TAIT *et al.*, 1986).

Para produzir a goma xantana, a bactéria de *Xanthomonas* precisa de vários nutrientes, macronutrientes, tais como fontes de carbono e de nitrogênio além de micronutrientes como potássio, ferro, e cálcio. Entretanto, a natureza e concentração da fonte de carbono afeta o rendimento de goma xantana, sendo a glicose e a sacarose as fontes de carbono mais freqüentemente utilizadas (SCAMPARINI; LUVIELMO, 2009). Diversos trabalhos mostram a relação entre o meio de cultivo (definido, complexo e meio adicionado de matérias-primas naturais) e condições operacionais (erlenmeyers agitados ou *shaker* e reatores; velocidade de agitação, temperatura, aeração, tipo de cepas de *Xanthomonas*) com a produção de xantana. Dentre eles, alguns devem ser destacados como mostrado na Tabela 1.

A produção de xantana é influenciada por fatores como tipo de escala fermentativa (*shaker* ou reator), das condições operacionais de fermentação (agitação, aeração, temperatura), composição do meio dos nutrientes utilizados com ou suplementação, bem como o tipo de cepa de *Xanthomonas* utilizada (Tabela 1). A utilização de fonte de carbono, glicose ou sacarose, requer uma maior suplementação para obter um bom rendimento de xantana, diferentemente quando são utilizados substratos alternativos, onde a menor suplementação de nutrientes é necessária resultando em menor custo de processo.

A concentração da fonte de carbono também pode afetar a eficiência da conversão em polissacarídeos. É relatado na literatura que concentrações de glicose entre 1-5% resultam em melhor rendimento, enquanto que com concentrações mais altas de glicose, o rendimento do produto é reduzido (PAPAGIANNI *et al.*, 2001).

A composição de nutrientes do meio fermentativo para a produção de xantana tais como fontes de nitrogênio, de carbono, íons fosfato e magnésio e alguns elementos traços é necessária, sendo atribuído o custo de 20 a 30% do processo total (BORN *et al.*, 2002).

O nitrogênio é um nutriente essencial, como componente orgânico ou como molécula inorgânica. A razão C/N normalmente utilizada para a produção de goma xantana é menor que aquela usada durante o crescimento da bactéria (GARCÍA- OCHOA *et al.*, 2000). Geralmente, baixas concentrações de ambos são úteis para a produção da goma xantana. Segundo Souw e Demain (1979), o carbono e o fósforo são nutrientes limitantes e a produção de goma xantana é melhorada, sendo os açúcares (sacarose ou glicose) as melhores fontes de carbono, e o glutamato em uma concentração de 15 mM a melhor fonte de nitrogênio.

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

Tabela 1. Produção de goma xantana por fermentação de diferentes meios de cultura formulados e de substratos alternativos em diferentes escalas.

Escala de processo	Cepas de <i>Xanthomonas</i>	Nutrientes testados	Condição de fermentação	Produção de xantana	Referência
Shaker	<i>X. campestris</i> NRRL B-1459	Fonte de carbono: glicose. Suplementação: fosfato de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de amônia, ácido cítrico, ácido bórico, óxido de zinco, cloreto férrico, carbonato de cálcio e ácido clorídrico.	250rpm/96h/25°C	30,0 g/kg	DEMAIN E SOUW (1979)
	<i>X. campestris pv campestris</i> 1078	Fonte de carbono: sacarose. Suplementação: Fosfato de amônio, fosfato de potássio, sulfato de amônia, cloreto férrico, cloreto de cálcio e sulfato de zinco.	180rpm/96h/28°C	9,6 g/L	ROTTAVA (2005)
	<i>X. campestris</i> T646	Substrato: Resíduo de azeitona.	200rpm/120h/30°C	7,7 g/L	LÓPEZ <i>et al.</i> (2001)
	<i>X. campestris pv manihotis</i> 1182	Substrato: soro de queijo. Suplementação: sulfato de magnésio e fosfato de potássio.	180rpm/72h/28°C	26,4 g/L	FORNARI (2006)
	<i>X. pv maniothis</i> 280	Substrato: resíduo de suco de maçã. Suplementação I: fosfato de potássio, cloreto de magnésio, nitrato de amônia, ácido cítrico, sulfato de sódio, ácido bórico, óxido de zinco, cloreto férrico e carbonato de cálcio. Suplementação II: uréia e fosfato de potássio.	150rpm/96h/28°C	15,0 g/L (suplementado I) 45,0 g/L (suplementado II)	DRUZIAN E PAGLIARINI (2007)
	<i>X. campestris mangiferaeindicae</i> 2103	Substrato: casca de coco, de maracujá e soro de leite. Suplementação: uréia e fosfato de potássio.	250rpm/120h/28°C	6,7 g/L (casca de coco) 5,6 g/L (casca de maracujá) 21,9 g/L (soro de leite)	NERY (2007)

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

	<i>X. campestris manihotis</i> 1182	Substrato: casca de cacau. Suplementação: uréia e fosfato de potássio.	250rpm/120h/28°C	5,0 g/L	DINIZ <i>et al.</i> (2012)
	<i>X. campestris manihotis</i> 1182 <i>X. campestris mangiferaeindicae</i> 2103	Substrato: caldo de cana e soro de mandioca. Suplementação: uréia e fosfato de potássio.	250rpm/120h/28°C	33,5 g/L (caldo de cana) 13,8 g/L (soro de mandioca)	BRANDÃO (2008)
	<i>X. sp</i> C1 <i>X. sp</i> C2	Substrato e fonte de carbono: sacarose, glicerina bruta e sacarose+glicerina. Suplementação: fosfato de amônia, fosfato de potássio, ácido bórico, sulfato de amônia, cloreto férrico, cloreto de cálcio hidratado e sulfato de zinco.	180rpm/96h/28°C	0,3 g/L (sacarose); 0,16 g (glicerina) e 0,4 (sacarose + glicerina) 0,3 g/L (sacarose); 0,19 g (glicerina) e 0,4 (sacarose + glicerina)	PADILHA <i>et al.</i> (2010)
	<i>X. campestris</i> XC02	Substrato: Água da indústria de petróleo e glicerina bruta.	180rpm/72h/30°C	4,9 g/L	RAMOS (2011)
Reator	<i>X. campestris</i> NRRL B-1459	Fonte de carbono: glicose. Suplementação: extrato de malte, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e antiespumante.	800rpm/3,0L.min ⁻¹ /30°C/120h	39,7 g/L	LO <i>et al.</i> (1997)
	<i>X. campestris</i> pv <i>pruni</i> 101	Fonte de carbono: sacarose. Suplementação: fosfato de amônia, fosfato de potássio, sulfato de magnésio.	300rpm/3,0vvm/66h/28°C	8,15 g/L	BORGES (2004)
	<i>X. campestris</i> C ₇ L	Substrato: soro de leite. Suplementação: sulfato de magnésio e fosfato de potássio.	1vvm/70h/30°C Velocidade de agitação foi programada para que DO>50%	28,0 g/L	NITSCHKE <i>et al.</i> (2001)
	<i>X. campestris manihotis</i> 1182	Substrato: caldo de cana. Suplementação: uréia e fosfato de potássio.	400rpm/1,0vvm/ 60h/ 28°C	46,5 g/L	BRANDÃO (2008)
	<i>X. campestris manihotis</i> 1182	Substrato: casca de camarão. Suplementação: uréia e fosfato de potássio.	500rpm/1,0vvm/ 72h/ 28°C	4,59 g/L	COSTA (2010)

Outros trabalhos de produção de xantana a partir de resíduos agroindustriais podem ser citados, como exemplo, a utilização de soro de leite (KONICEK *et al.*, 1992; ANTUNES *et al.*, 2000), resíduos cítricos (GREEN *et al.*, 1994), resíduo de polpa de beterraba (YOO; HARCUM, 1999), melação de açúcar de beterraba (KALOGIANNIS *et al.*, 2003), resíduos agrícolas (MORENO *et al.* 1998) e extrato de leveduras (GOMES, 2008).

A biossíntese da goma xantana é semelhante à síntese de exopolissacarídeo de outras bactérias Gram-negativas, onde a via sintética pode ser dividida em três partes: primeiramente, ocorre à absorção de açúcares simples e a conversão de derivados de nucleotídeos; em seguida, há uma montagem das subunidades de pentassacarídeos ligadas a um transportador de isopentil-pirofostato; e finalmente, a polimerização das unidades repetidoras de pentassacarídeos e suas secreções, sendo o polímero liberado para o meio de crescimento (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

A Figura 5 mostra o caminho *Entner-Doudoroff*, uma via conjugada com o caminho do ácido tricarboxílico que ocorre em células de *Xanthomonas campestris*, pelo mecanismo predominante do catabolismo da glicose.

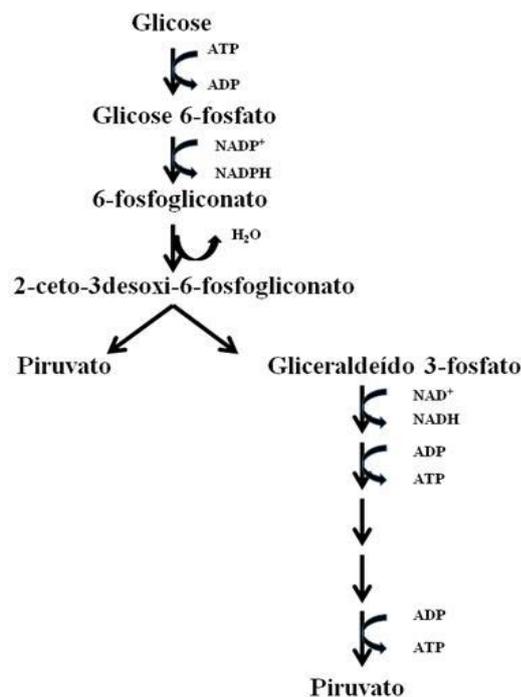


Figura 5. Biossíntese dos monossacarídeos e substituintes que compõem a goma xantana via caminho *Entner-Doudoroff* (ROSALAM; ENGLAND, 2006; PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011).

Para cada molécula de glicose a via de *Entner-Doudoroff* produz duas moléculas de NADPH e uma molécula de ATP para ser utilizada nas reações de biossíntese. A síntese de xantana requer uma proporção significativa de cofatores, nicotinamida e de ATP (LETISSE *et al.*, 2001; ROTTAVA, 2005; ROSALAM; ENGLAND, 2006).

Os exopolissacarídeos (EPS) microbianos consistem em unidades repetidoras de oligossacarídeo polimerizadas. Sua biossíntese envolve glicosiltransferases que ligam os açúcares de glicose do nucleótideo a um transportador lipídico, e é semelhante à biossíntese de antígeno O (geralmente de bactérias Gram-negativas) e de vários tipos de polissacarídeos capsulares. A síntese de xantana que tem sido extensivamente estudada e serve como um paradigma para a biossíntese de outros de outros EPSs, é retratada na Figura 6. Os mecanismos de polimerização, comprimento de cadeia e exportação do polissacarídeo para a superfície celular são ainda pouco compreendidos (KRANENBURG *et al.*, 1999).

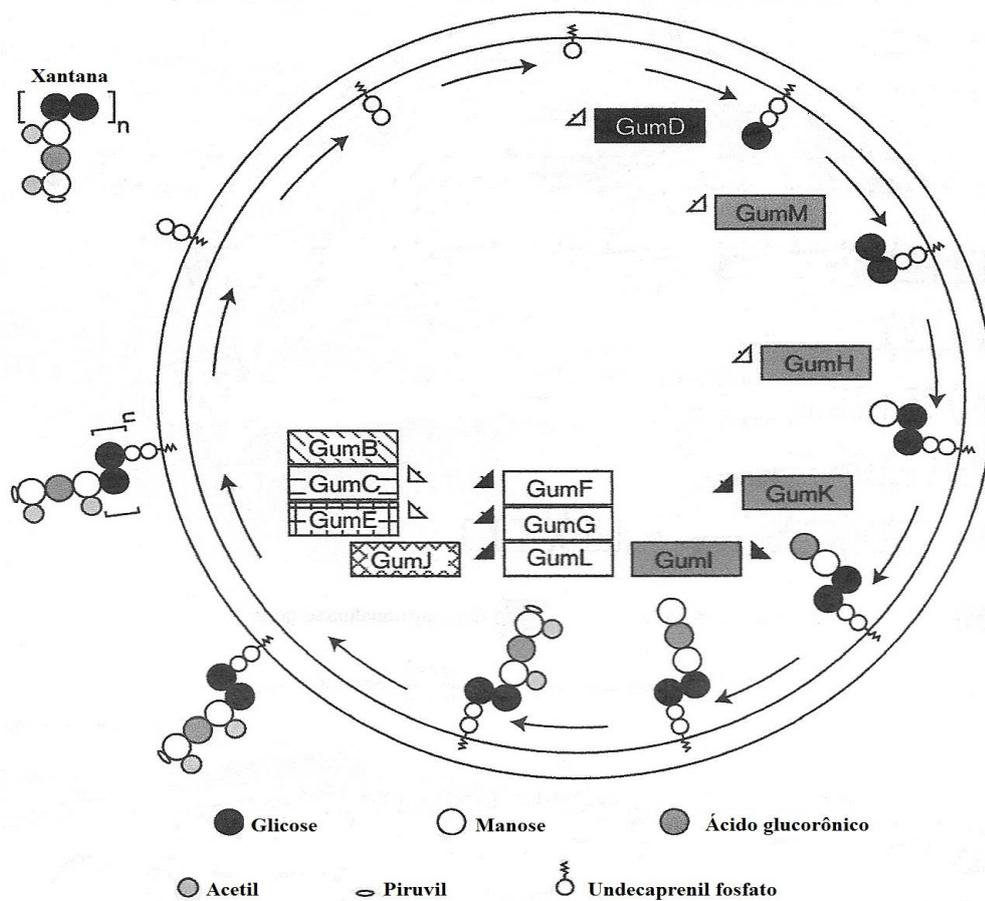


Figura 6. Caminho proposto para a biossíntese e excreção do exopolissacarídeo de goma xantana (KRANENBURG *et al.*, 1999).

A síntese de xantana é iniciada pela ligação de um glicosefosfato do açúcar UDP-glicose do nucleotídeo por um transportador lipídico, undecaprenil fosfato, pela atividade da glicosiltransferase GumD (Figura 6). Glicosiltransferases específicas, tais como GumM, GumH, GumK e GumI, transferem os açúcares do nucleotídeo para a molécula receptora (com o lipídeo ligado), depois que o GumF e GumG incorporar os resíduos de acetil nas porções de manose e GumL piruvil na manose externa, resultando na completa unidade de repetição. As unidades repetidoras são exportadas e polimerizadas na extremidade redutora para formar a xantana e GumB, Gum C e Gum E são previstos para serem envolvidos nesses processos (BECKER *et al.*, 1998; KRANENBURG *et al.*, 1999).

A otimização das variáveis na etapa de fermentação, tais como a composição de nutrientes, técnicas de alimentação, temperatura, pH e agitação, são de suma importância e diversas estratégias são testadas em busca de melhorias na produção e qualidade da xantana (ROSALAM; ENGLAND, 2006; RAMOS, 2011).

O alcance das condições de fermentação otimizados, particularmente associado aos parâmetros físicos e químicos, é de fundamental importância para o desenvolvimento de qualquer processo, devido ao seu impacto sobre a economia e praticidade. A diversidade de interações combinatórias entre os componentes do meio fermentativo, metabolismo das células e o grande número de requisitos químicos para processos de produtos metabólicos, não permitem uma modelagem detalhada satisfatória. A busca unidimensional com mudanças sucessivas em condições variáveis é ainda empregado, embora seja aceito que é praticamente impossível buscar uma única dimensão para uma adequada combinação de um número finito de experimentos. Métodos simples de otimização de variáveis não são apenas tedioso, mas pode levar a erros de interpretação nos resultados, especialmente levando em conta que a interação entre diferentes fatores é negligenciado (ABDEL-FATTAH *et al.*, 2005).

Projetos estatísticos experimentais tem sido usado por muitas décadas e podem ser adotados em várias etapas como uma estratégia de otimização, como os experimentos de triagem ou de busca de condições ideais para uma resposta específica (LEE; GILMORE, 2005; NAWANI; KAPADNIS, 2005). Recentemente, os resultados analisados através de planejamentos experimentais estatísticos são melhores reconhecidos do que os realizadas pelo método tradicional “one-variable-at-a-time”.

Algumas das escolhas para aplicação de modelos estatísticos para bioprocessamento incluem o modelo de Plackett-Burman (LIU *et al.*, 2003) e a metodologia de superfície de resposta com vários modelos (ABDEL-FATTAH; OLAMA, 2002; TANYILDIZI *b.*, 2005). A

metodologia de superfície de resposta é um sistema de modelagem empírica que avalia a relação entre um grupo de variáveis, que podem ser controlados experimentalmente, e a resposta observada. Esta metodologia está sendo muito usada na otimização de processos fermentativos para seleção de variáveis. É um modelo fatorial, onde gráficos de contorno são gerados por efeitos linear ou quadrático de variáveis chaves, e a equação modelo é derivada com o ajuste dos dados experimentais e a resposta ótima do sistema é calculada (CAZETTA *et al.*, 2005).

O meio de cultura consiste geralmente de 2-4% de glicose ou sacarose como fonte de carbono, 0,05-0,1% de fonte de nitrogênio (extrato de levedura, peptona bacteriológica, nitrato de amônio ou uréia), fósforo e traços de outros minerais. O polímero é sintetizado, principalmente ao cessar o crescimento microbiano. Geralmente, a concentração final atinge entre 20 a 30 g.L⁻¹, com rendimento de 50 a 70% e produtividade típica de 0,5 g.L⁻¹.h⁻¹ (LIMA *et al.*, 2001; PORTILHO, 2002).

3.2.3.1 Condições operacionais e escalas fermentativas

As condições ótimas para a síntese de goma xantana são variáveis e a fim de conseguir alta taxa produtiva da xantana é necessário regular tanto o crescimento celular como a produção de xantana através da fermentação. É recomendável que o processo de fermentação ocorra em dois estágios que tenha suas condições operacionais, um para aperfeiçoar o crescimento das células e o outro para a produção do biopolímero (OLIVEIRA, 2009). A Figura 7 apresenta um fluxo de produção de goma xantana em reator convencional em escala industrial.

A produção de goma em escala laboratorial pode ser realizada em agitadores orbitais (shaker) ou em reatores. Nos agitadores orbitais apenas pode-se controlar a temperatura, o tempo e a agitação do processo fermentativo, enquanto que em reatores o controle é mais rigoroso sendo possível monitorar outros parâmetros como pH, a concentração de oxigênio dissolvido, adição de substrato e antiespumante como mostrado na Figura 7 (PINTO, 2005; PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011).

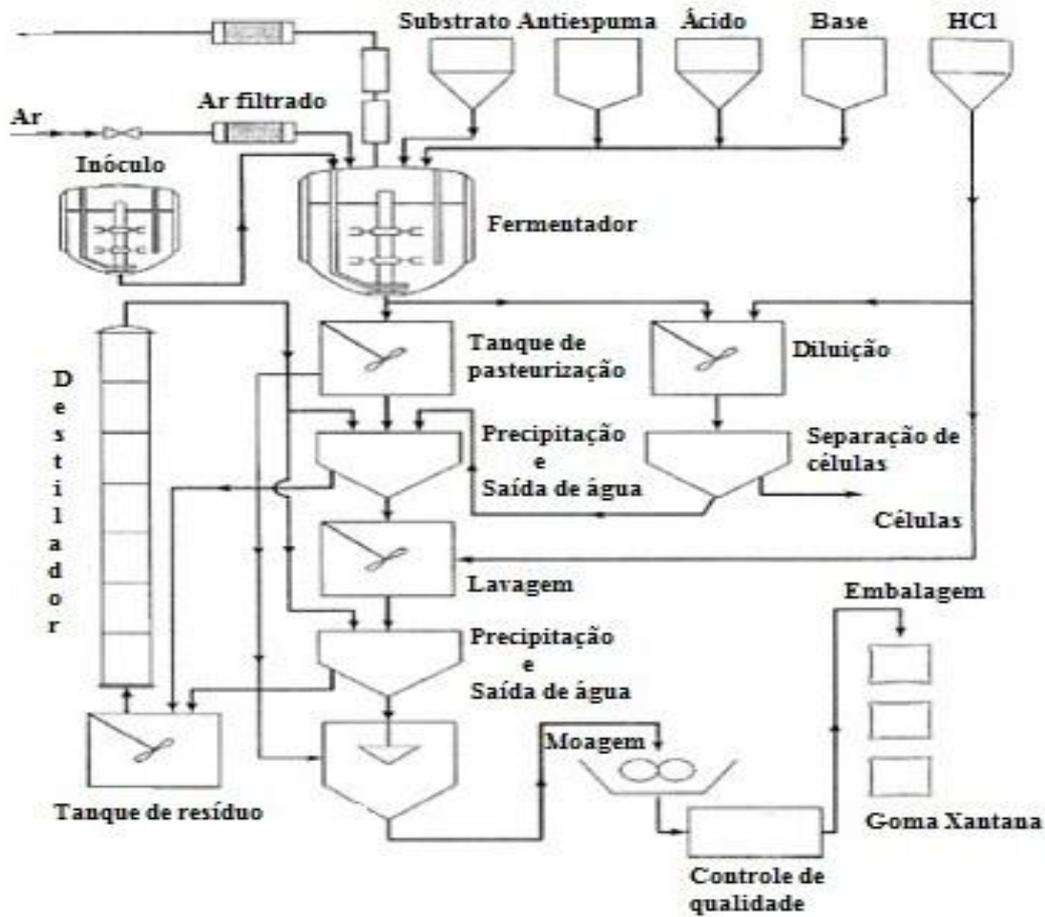


Figura 7. Fluxo de produção de goma xantana em reator convencional em escala industrial (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

As condições operacionais, como a configuração do reator, modo de operação (batelada ou contínuo), composição do meio, temperatura, pH, velocidade de agitação, taxa de aeração e o tempo de fermentação influenciam não apenas o crescimento do microrganismo e a produção de xantana, mas também a estrutura e características reológicas do polímero (BAIG; AHMAD, 1995; CASAS *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2001; ANTUNES *et al.*, 2003; PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011). Desta forma, a otimização das condições de fermentação na escala de bancada é extremamente necessária antes da ampliação da escala de produção industrial.

As temperaturas empregadas para a produção de xantana variam de 25-34°C. A temperatura ótima para a produção de xantana depende do meio de produção utilizado, sendo a temperatura de 28°C, a mais utilizada para os meios otimizados (CASAS *et al.*, 2000; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

O estudo de Shu e Yang (1990) relatam que os maiores rendimentos de goma xantana podem ser obtidos com fermentações realizadas em temperaturas mais altas, e que o conteúdo de piruvato no polímero varia com a temperatura da fermentação, isto é, variando de 27°C e 30°C, o conteúdo de piruvato na goma variou de 1,9% a 4,5%. O mecanismo que explica esse comportamento ainda não foi esclarecido.

O pH é outro fator operacional importante na produção de xantana. A maioria dos pesquisadores aponta o pH neutro como ótimo para o crescimento da *Xanthomonas campestris*, sendo que este decresce para 5,0 durante a produção de xantana, devido aos grupos ácidos presentes no polímero. Um estudo do efeito do pH mostrou que seu controle em reatores contínuos melhora o crescimento celular, mas não tem efeito sobre a produção do biopolímero (BRANDÃO, 2008; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Alguns autores sugerem que não é necessário fazer o controle do pH durante o processo, enquanto outros recomendam manter o pH neutro com KOH, NaOH e NH₄OH. Quando o pH é controlado, a produção da goma cessa uma vez que a fase de crescimento estacionária seja atingida, e este efeito é independente do álcali usado para controlar o pH. Quando o pH não é controlado, a produção da goma continua durante a fase estacionária de crescimento (SCAMPATINI; LUVIELMO, 2009; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Segundo Scamparini e Luvielmo (2009), o efeito da interação entre o pH e a temperatura exerce pouca importância para o crescimento celular, entretanto parece ter uma influência negativa tanto na produção de goma xantana quanto na viscosidade do caldo.

A temperatura e o pH ótimos para o crescimento celular e produção de xantana foram determinados por Esgalhado *et al.* (1995). A faixa ótima para o crescimento de *Xanthomonas campestris* em cultivo de batelada foi pH entre 6,0 – 7,5 e temperatura entre 25 - 27 °C. Para maior produção de xantana e viscosidade do polímero, valores de pH entre 7,0 - 8,0 e temperatura entre 25 - 30 °C foram determinados. Esta diferença entre faixa ótima de pH, temperatura para crescimento celular e produção de xantana pode ser uma importante informação para ser incluída na estratégia de fermentação.

A agitação e a aeração são parâmetros necessários para evitar condições de anaerobiose decorrentes da alta viscosidade do meio pela formação do polissacarídeo, visto que a bactéria é estritamente aeróbia. Logo, a combinação adequada, para os níveis destes parâmetros, deve ser estudada para evitar a limitação na transferência de oxigênio ou condições de estresse hidrodinâmico (SUTHERLAND, 1993; CASAS *et al.*, 2000). Em sistemas não-newtonianos como na etapa fermentativa para biossíntese de xantana, a agitação

é mais significativa para a transferência de oxigênio do que a aeração (CASAS *et al.*, 2000; RICHARD; MARGARITIS, 2002).

Para se obter produção de goma em processos fermentativos, aumentos dos níveis de agitação resultam em níveis de produção mais altos, o que ocorre também para o crescimento celular. Em baixas velocidades de agitação ocorrem limitações de oxigênio resultando em menores produções de gomas com baixo peso molecular. Os efeitos benéficos do aumento da agitação são atribuídos à transferência de nutrientes e oxigênio necessários para a formação de goma xantana (BRANDÃO, 2008; PAPAGIANNI *et al.*, 2001).

Diversos trabalhos mostram a relação entre velocidade de agitação e taxa de aeração com o crescimento celular, produção, composição química e características reológicas da xantana. A influência da taxa de aeração na viscosidade e no conteúdo de ácido pirúvico da xantana foi estudada por Cadmus *et al.* (1978). Para estes autores as maiores viscosidades e o conteúdo máximo de piruvato foram alcançados pela utilização de 0,75 vvm e 1,5 vvm (aeração). A produção e viscosidade da xantana sintetizada utilizando duas combinações de velocidade de agitação e taxa de aeração (250 rpm - 1,5 vvm e 350 rpm - 2 vvm) foram avaliadas por Moreira (2002). A maior produção foi alcançada na condição de maior aeração, diferentemente da viscosidade, que foi mais elevada com taxas mais baixas de aeração.

Casas *et al.* (2000) observaram dois efeitos com o aumento da velocidade de agitação: aumento na taxa de transferência de massa de oxigênio associada a um dano celular. Em velocidades mais altas (800 rpm) o crescimento celular e a produção de goma xantana são menores, provavelmente devido ao dano celular por “stress” hidrodinâmico; e em velocidades muito baixas (100 rpm) também se observou menor crescimento de biomassa e produção de goma xantana, devido à limitação na transferência de oxigênio. Para esse estudo foi utilizado um bioreator com volume de trabalho de 1,5 L, e ambos, o crescimento de biomassa e produção de goma xantana, alcançou um máximo quando a velocidade de agitação foi fixada em 500 rpm. Em velocidades de agitação mais baixas ocorre limitação de oxigênio, e em velocidades de agitação mais altas ocorre “stress” hidrodinâmico, resultando em um decréscimo do peso molecular médio, e também em um decréscimo nos parâmetros reológicos.

Papagianni *et al.* (2001) testaram diferentes velocidades de agitação (100, 200, 300, 400 e 600 rpm), utilizando aeração de 1 vvm, onde o aumento da velocidade de agitação resultou no aumento da produção e no conteúdo de piruvato das xantanas. O efeito benéfico do aumento da agitação foi atribuído à redução da viscosidade do meio, aumentando a

transferência de nutrientes e oxigênio necessários para formação de xantana, sendo que o estresse hidrodinâmico foi dependente da agitação/aeração e do microrganismo utilizado.

Peters *et al.* (1989) demonstram que existe uma forte relação entre a demanda microbiológica de oxigênio e o grau de piruvatação. A limitação de oxigênio do sistema em batelada ou contínuo resultou na redução do conteúdo de piruvato. A dependência da piruvatação com relação ao fornecimento de oxigênio não é inesperada. Por ser um componente altamente oxidado do polímero, o aumento do nível de oxigênio dissolvido em velocidades de agitação mais altas, pode explicar o aumento da quantidade de piruvato (PAPAGIANNI *et al.*, 2001).

Uma qualidade importante na produção industrial de goma xantana é a versatilidade nutricional da *Xanthomonas campestris*, a qual pode utilizar diferentes substratos para biossíntese do biopolímero, porém com o inconveniente da variação da composição do polímero e do peso molecular, interferindo na qualidade reológica e na qualidade dos produtos de aplicação (SUTHERLAND, 1993).

O meio padrão para produção de xantana deve conter fontes de nitrogênio, de carbono, íons fosfato e magnésio e alguns elementos traços, sendo atribuído o custo de 20 a 30% do processo total (BORN *et al.*, 2002). Com relação aos meios que utilizam substratos, e menos onerosos, pode-se mencionar o uso de matérias-primas naturais, tais como caldo de cana-de-açúcar, farinhas diversas (trigo, milho, soja, cevada), água de maceração de milho, entre outros. Como a composição química dependerá de uma série de fatores, tais como solo, variedade do vegetal, safra, clima, processamento e estocagem, frequentemente é necessária a adição de alguns sais, particularmente contendo nitrogênio e fósforo. Estes fatos indicam que podem ocorrer oscilações no processo fermentativo que emprega essas matérias primas, obrigando as empresas produtoras a manterem instalações piloto para o ajuste da composição do meio a cada novo lote de matéria-prima que a empresa recebe (SCHMIDELL, 2001).

3.2.4 Glicerina como substrato alternativo

O biodiesel e a glicerina são obtidos através da reação de óleos vegetais novos ou usados, gorduras animais, processo conhecido como transesterificação desses óleos com alcoóis (metanol ou etanol) usando catálise básica (Figura 8).

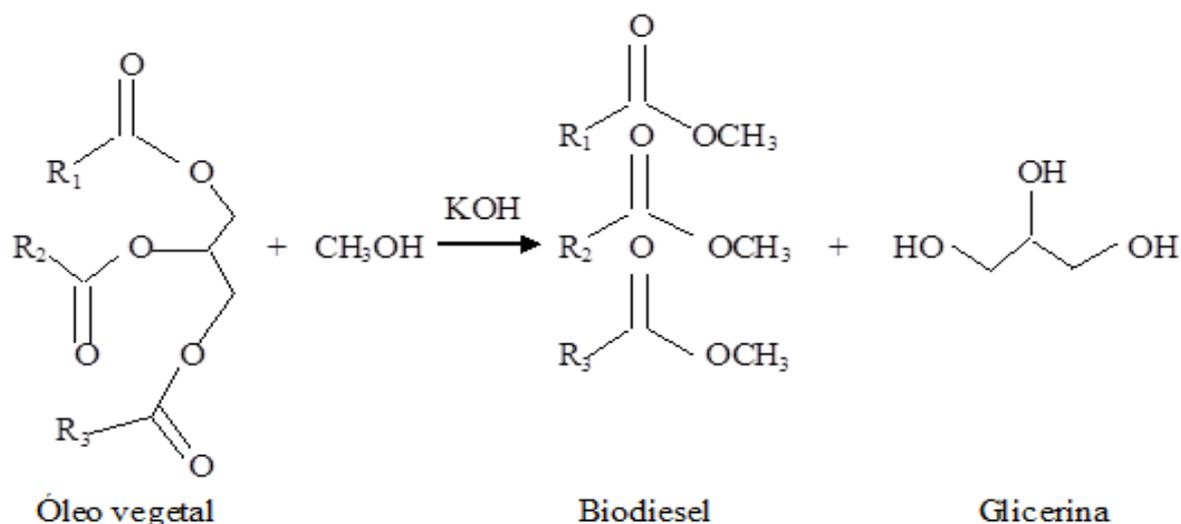


Figura 8. Reação de transesterificação para produção do biodiesel (CASTELLANELLI *et al.*, 2007; GONÇALVES, 2006)

A reação de transesterificação proporciona uma melhoria significativa das seguintes propriedades físico-químicas: redução da viscosidade, um pequeno acréscimo no número de cetano e poder calorífico próximo ao do óleo diesel convencional, com isso conseguem-se uma boa qualidade da combustão nos motores a diesel (LAFORGIA; ARDITO, 1994). A reação de transesterificação com o uso do metanol é tecnicamente mais viável do que com etanol. A separação da glicerina obtida como co-produto, no caso da síntese dos ésteres metílicos, é obtida mediante simples decantação. Esta etapa de separação para ésteres etílicos requer um maior número de etapas (CASTELLANELLI *et al.*, 2007; GONÇALVES, 2006).

O termo glicerol aplica-se geralmente ao composto puro, ou seja, ao 1,2,3-propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais que contenham 95%, ou mais, de glicerol na sua composição. Portanto, a glicerina é um co-produto resultante da hidrólise de triglicérides de óleos ou gorduras e é considerado um resíduo gerado em grandes volumes na produção de biocombustíveis, mas também de sabão, ácidos graxos, álcoois de ácidos graxos, entre outros (FELIZARDO, 2003). A glicerina bruta difere da glicerina purificada que é comercialmente utilizada na indústria, pois possui impurezas e colorações diferentes, o que dificulta seu uso em processos industriais.

Na produção do biodiesel, a glicerina é o co-produto principal e segundo Borges (2005), em média para cada 100 litros de biodiesel produzido, gera-se 10 quilos de glicerina. Devido à alta produção de biodiesel, o mercado não terá condições de absorver tal oferta, mesmo porque, para maior aplicabilidade do produto (cosmético, emulsificantes, plastificantes

e outros) é necessária a sua purificação, sendo um processo com custo elevado, impactando a viabilidade econômica. Por isso, é importante desenvolver novas aplicações para a glicerina residual (bruta ou loira) e/ou purificada para atenuar o impacto causado pela crescente produção de biodiesel (LIMA, 2001).

Dentre estas, existem várias utilizações de glicerina para produção de compostos orgânicos ou outros derivados na indústria química ou petroquímica, como a patente depositada no Brasil PI0413519-9 (TROY *et al.*, 2005), e de patentes de outros países WO2006111810 (SIANO *et al.* 2006), WO2006045584 (HARICHIAN *et al.*, 2006) e WO2006136336 (BUB *et al.*, 2006) As patentes US2005095336 (MALETTO PETE, 2005) e JP2005179255 (MATSUDA *et al.*, 2005) são algumas das que citam a utilização de formulações de glicerina com goma xantana para aplicação em processos alimentícios, farmacêutico e afins, no entanto, apresentam desvantagens quanto ao custo por utilizarem um complexo de gomas e reagentes orgânicos ou inorgânicos. Nenhuma delas propõe o uso da glicerina como substrato alternativo no meio fermentescível para a produção de biopolímero tipo goma xantana, exceto a patente brasileira PI0705950-7 de BRANDÃO *et al.* (2008) resultante da atual Tese (Anexo) que visa obter substratos alternativos de baixo custo para o processo fermentativo na produção de goma xantana quando comparado ao processo industrial de bioconversão de sacarose ou glicose.

A produção brasileira do biodiesel era incipiente em 2006, com 1.075 mil litros (ANP, 2006). Em 2008, o diesel comercializado em todo território nacional passou a conter, obrigatoriamente, 3% de biodiesel (B3); e em 2013-2014 está previsto o aumento percentual para 5% (B5). As diretrizes governamentais já consideram a possibilidade de antecipação desta meta, condicionadas a necessidade de se encontrar utilizações comerciais para os coprodutos, principalmente a glicerina (MOTA *et al.*, 2009). O Brasil ao produzir biodiesel para adição de 5% no óleo diesel (aproximadamente 2,6 milhões de toneladas do biocombustível por ano) resulta quase 300 mil toneladas de glicerina por ano em média. No entanto, esta quantidade não é totalmente absorvida e o excedente de glicerina vem saturando o mercado, sendo sua oferta maior que a procura, levando assim a queda do preço desse coproduto e a estocagem do mesmo sem um destino certo (MILLI *et al.*, 2011). Devido aos inúmeros incentivos governamentais que impulsionam a produção de biodiesel no Brasil, tal combustível está sendo produzido em larga escala, e um fator preocupante frente a este exacerbado crescimento, é o destino da glicerina excedente gerando problemas sérios de descarte, contribuindo para um grande problema ambiental.

A glicerina residual não pode ser depositada em aterros, pois se cria um problema ambiental, devido a sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Assim, a questão central é como utilizar adequadamente essa matéria-prima gerada tanto sob o ponto de vista econômico como ambiental, dado que alguns estudos indicam que o mercado, no médio prazo, só conseguiria absorver 50% dessa produção, mesmo com as novas aplicações de glicerina (ROBRA, 2006). Portanto, destinos viáveis de utilização devem ser buscados pela comunidade acadêmica e empresarial.

3.2.5 Recuperação da Goma Xantana

Ao término do processo fermentativo para a separação da xantana, o biopolímero é recuperado e purificado. Os métodos usados para a recuperação de um biopolímero do meio fermentativo dependem, sobretudo, das características do microrganismo utilizado, do tipo de polissacarídeo e do grau de pureza desejado (SANDFORD, 1979). O processo de recuperação da xantana tem um importante papel na economia do processo, geralmente é um passo difícil e de alto custo (SCAMPARINI; LUVIELMO, 2009).

As etapas de extração do biopolímero envolvem a remoção de células microbianas, precipitação do biopolímero, secagem e moagem (GALINDO, 1994). A precipitação do biopolímero ocorre ao diminuir a solubilidade do colóide dissolvido utilizando métodos de recuperação com solventes, adição de sais e concentração por evaporação (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

O caldo resultante da fermentação contém o biopolímero, células, resíduos de nutrientes e outros metabólitos (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). Em função da alta concentração de goma xantana, o caldo é altamente viscoso e difícil de manusear. A alta viscosidade dificulta a remoção da biomassa do caldo. Para o processamento, o caldo é normalmente diluído em algum estágio do processo (SCAMPARINI; LUVIELMO, 2009).

As células podem ser eliminadas fisicamente através de centrifugação ou ultracentrifugação (ASHTAPUTRE; SHAH, 1995a, 1995b, 1995c; GIAVASIS *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2003; BOZA *et al.*, 2004) ou filtração (KANG *et al.*, 1982; GIAVASIS *et al.*, 2000). Métodos químicos ou enzimáticos podem ser usados como alternativa, complementados com operações posteriores de purificação/concentração (PACE, 1991; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

A recuperação do biopolímero do caldo fermentativo, após a separação das células, pode ser feita através da precipitação, pela adição de um solvente adequado (MARGARITIS; PACE, 1985). Normalmente, o método utilizado é a de precipitação com álcool, principalmente etanol e isopropanol, sendo que os custos para a recuperação do álcool e as perdas inevitáveis contribuem significativamente para o custo total de produção (SCAMPARINI; LUVIELMO, 2009; BRANDÃO, 2008). Demais solventes como metanol e a acetona, podem ser adicionados ao caldo fermentado não só para diminuir a solubilidade do exopolissacarídeo, mas também para lavar impurezas tais como componentes coloridos, sais e células. A quantidade necessária de álcool depende da natureza do reagente (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

A quantidade de solvente necessário para a completa precipitação depende da força iônica e da composição do polímero apesar de não depender de sua concentração. A precipitação com solventes resulta também em purificação parcial do polímero por eliminação dos componentes solúveis no solvente (PACE, 1991).

Normalmente, a goma xantana é recuperada por precipitação com etanol 99,5° GL (três volumes) e retirada por filtração e seguida de secagem, a baixas temperaturas (40°C), e então, preparados para as análises subseqüentes de caracterização da estrutura e reologia (DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007; NERY *et al.*, 2008; BRANDÃO *et al.*, 2010).

García-Ochoa *et al.* (2000) apresentaram uma técnica de recuperação de xantana que envolve etapas de: mecânicos ou térmicos; remoção das células por filtração (se necessário, fazer a diluição antes da filtração); recuperação do polímero por precipitação com solventes orgânicos (etanol, isopropanol, misturas de sais e álcool); separação precipitado/solvente, sendo o precipitado lavado várias vezes com o solvente que é evaporado posteriormente; secagem do biopolímero em secadores contínuos ou em batelada, a vácuo ou com circulação forçada de gás inerte.

A secagem rápida do precipitado a altas temperaturas pode resultar em um produto com baixa solubilidade ou com baixo desempenho reológico. Porém, o aquecimento controlado da xantana pode resultar em um produto com melhor reologia em solução (PACE, 1991).

O produto final moído não deve conter células de *Xanthomonas campestris*, pois afeta diretamente a performance do produto para uma determinada aplicação, sendo, portanto, a sua remoção essencial (BRANDÃO, 2008; MARGARITIS; PACE, 1985).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA GOMA XANTANA

3.3.1 Reologia

A reologia é o estudo da deformação e do escoamento da matéria, sendo que a deformação aplica-se no caso da matéria sólida e o escoamento quando a matéria é líquida. No caso mais simples, a propriedade reológica de interesse para sólidos é a sua elasticidade, e nos líquidos é a viscosidade, que pode ser interpretada como a resistência que um fluido oferece para escoar ou também como a medida da fricção interna de um fluido (PASQUEL, 1999).

A viscosidade é a resistência de um líquido ao fluxo causado por atrito interno entre as moléculas. Além de ser uma medida direta da qualidade do fluido, a viscosidade pode fornecer importantes informações sobre mudanças fundamentais em sua estrutura durante determinado processo (NAVARRO, 1997). A viscosidade de fluido Newtoniano, como, por exemplo, a água ou o óleo, depende somente da temperatura (e para alguns a pressão), enquanto fluidos não-Newtonianos mostram um comportamento dependente do tempo e/ou taxa de deformação. As soluções aquosas de goma xantana são não-Newtonianos e altamente pseudoplásticos, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação do fluido, portanto essas soluções exibem um comportamento *shear-thinning* (OLIVEIRA, 2009).

A viscosidade (η) pode ser definida, matematicamente, como a derivada da força de cisalhamento por unidade de área entre dois planos paralelos de líquido em movimento relativo (tensão de cisalhamento, τ) versus o gradiente de velocidade dv/dx (taxa de cisalhamento, γ) entre os planos, isto é, $\eta = d\tau/d\gamma$ (OLIVEIRA, 2009). Onde:

$$\gamma = \frac{dv}{dx} = \frac{(\text{velocidade diferencial})}{(\text{espessura diferencial})} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\tau = \frac{F}{A} = \frac{(\text{força})}{(\text{área})} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\eta = \frac{d\tau}{d\gamma} = \frac{F/A}{dv/dx} \quad (\text{Equação 3})$$

As equações 1, 2 e 3 representam a taxa de cisalhamento, a tensão de cisalhamento e a viscosidade aparente, respectivamente. Utilizam-se diferentes sistemas de unidades para

expressar a viscosidade, como o Sistema Internacional ($\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$, Pa.s, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), o Sistema Britânico ($\text{lb}\cdot\text{s}/\text{ft}^2$, $\text{slug}/\text{ft}\cdot\text{s}$), o Sistema Imperial ($\text{lbf}\cdot\text{ft}^{-2}$) e o Sistema CGS (P , $\text{dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$) (LEWIS, 1993; MOTT, 1996).

As propriedades reológicas dos polissacarídeos em soluções aquosas dependem de suas características físico-químicas intrínsecas, isto é, composição monomérica, peso molecular, polidispersividade e grau de substituição. No caso dos polissacarídeos microbianos, essas propriedades físico-químicas, bem como, a eficiência de produção estão relacionadas ao processo fermentativo, linhagem bacteriana, composição do meio, pH, temperatura e outros parâmetros ambientais da fermentação. Fenômenos de transporte e mistura dos nutrientes no fermentador são os fatores que mais influenciam a biossíntese do biopolímero (BANIK *et al.*, 2000; CASAS *et al.*, 2000; DILTZ; ZELLER, 2001; NAVARRETE *et al.*, 2001).

O peso molecular, a estrutura molecular, e a presença dos grupos acetil e piruvil têm a capacidade de alterar as propriedades reológicas das soluções, ou seja, dependem da natureza do polímero (CASAS *et al.*, 2000; NAVARRETE *et al.*, 2001).

A viscosidade é a propriedade funcional determinante para a seleção de cepas produtoras de gomas xantana, embora seja importante também a quantidade de biopolímero produzida devido ao fator econômico requerido na produção em grandes escalas. O maior interesse industrial é por gomas, que em baixas concentrações (0,01 a 3%) sejam capazes de promover altas viscosidades (PASQUEL, 1999; OLIVEIRA, 2009).

Soluções de goma xantana obtidas por dissolução em temperatura moderada tendem a ser altamente viscosas. A temperatura de dissolução afeta grandemente a viscosidade por controlar a conformação molecular. A molécula de goma xantana parece ter duas conformações, helicoidal e randômica, dependendo da temperatura de dissolução (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). A viscosidade da goma é uma função de sua concentração na dispersão (PETTITT, 1982). A viscoelasticidade é uma das propriedades reológicas mais simples de substâncias de comportamento reológico complexo, como são os biopolímeros microbianos, uma vez que soluções de biopolímeros com interesse para aplicação comercial exibem propriedades viscoelásticas, isto é, a capacidade de formar géis verdadeiros em baixas concentrações e, portanto, com características intermediárias entre sólidos e fluídos (SZCESNIAK, 1983).

Uma baixa concentração de xantana ($< 1\%$ m/v) pode aumentar a viscosidade da água em um fator de 10^5 em baixas taxas de cisalhamento, e em fator de 10 em altas taxas de

cisalhamento. Esta notável pseudoplasticidade é privilégio de poucos polímeros. Outros aspectos da reologia da goma xantana são sua estabilidade em ampla faixa de temperaturas, pH, e salinidade como a presença de NaCl (LUPORINI; BRETAS, 2008; WHITCOMB; MACOSKO, 1978).

A característica de pseudoplasticidade da goma xantana é muito desejada em diversas situações. Efetivamente, polissacarídeos que possuem comportamento pseudoplástico provocam menos sensação de gomosidade (flavour, “mouth feel”) na boca do que aqueles com comportamento newtoniano (a viscosidade se mantém inalterada com o aumento da taxa de deformação) (NAVARRO, 1997; MORRIS, 1984). Sua associação com hidrocolóides, como proteínas e outros biopolímeros, pode potencializar o efeito pseudoplástico (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). Além disso, em taxas de cisalhamento entre 50 e 200s⁻¹, a taxa da mastigação, a goma xantana exibe baixa viscosidade, fazendo com que o produto pareça menos viscoso ao paladar e o sabor seja mais bem percebido (CHALLEN, 1994; KATZBAUER, 1998).

A magnitude do parâmetro reológico K (índice de consistência) e da viscosidade aparente para misturas são fortemente influenciadas pela temperatura e pela concentração da goma xantana. Segundo Moreira *et al.* (2001), a alta viscosidade aparente para soluções em baixas concentrações é um parâmetro simples para avaliar o potencial de utilização industrial de um biopolímero.

As soluções de xantana apresentam uma pequena tixotropia, que é um tipo de fluido não-Newtoniano dependente do tempo onde a viscosidade diminui com o tempo a uma taxa de cisalhamento constante. Esta diminuição na viscosidade é quase que totalmente reversível desde que não haja imediata destruição da estrutura interna, causada pela aplicação de taxa de deformação muito alta (NAVARRO, 1997). Fatores como baixo grau de acetilação e especialmente alto grau de piruvatação, aumentam a viscosidade de suas soluções porque associações intermoleculares são favorecidas (NERY, 2007).

A estrutura ramificada e o alto peso molecular conferem à goma xantana uma alta viscosidade, mesmo em baixas concentrações. A rede tridimensional formada por associações de cadeias de goma xantana tem eficiente estabilidade para suspensões e emulsões (KATZBAUER, 1998). Muitas das propriedades reológicas da goma xantana derivam de sua conformação em dupla-hélice adotada em solução. A cadeia lateral trissacarídica alinha-se com a cadeia celulósica principal, estabilizando a conformação por interações não covalentes (SUTHERLAND, 1996). A Figura 9 podem-se observar as longas moléculas de goma xantana

formando agregados através de ligações de hidrogênio e o entrelaçamento dos segmentos flexíveis das cadeias, resultando em alta viscosidade (OLIVEIRA, 2009). Quando uma tensão de cisalhamento é aplicada, os agregados são desfeitos e a viscosidade diminui drasticamente.

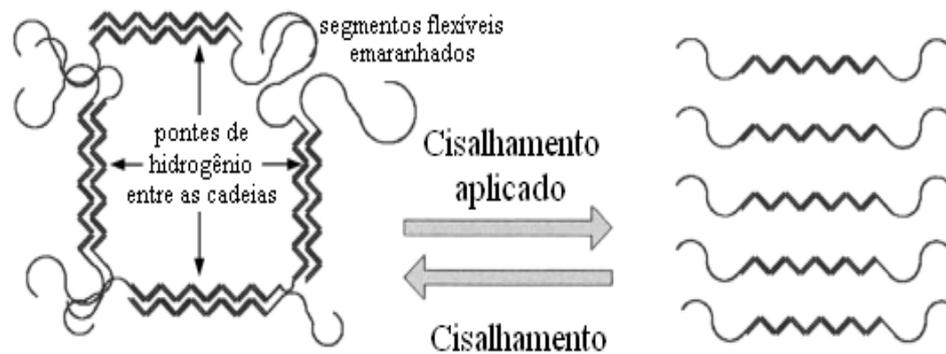


Figura 9. Esquema do efeito da taxa de cisalhamento na rede do biopolímero goma xantana (KI-WON *et al.*, 2006).

Em altas taxas de cisalhamento, a viscosidade aparente de soluções de goma xantana diminui devido à desarticulação da rede de biopolímero e ao alinhamento parcial das macromoléculas individuais na direção do fluxo de cisalhamento, resultando em baixa viscosidade (KI-WON *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2009).

Os sais influenciam a viscosidade das soluções aquosas de goma xantana, e algumas formulações comerciais contendo o polímero contêm sais, tais como sais de potássio, sais de cálcio e sódio na forma de cloretos, para facilitar a solubilização, aumentar a viscosidade e estabilidade (MORRIS, 1984). Isto é resultado da estabilização da estrutura ordenada da xantana pelo aumento da associação intermolecular (XUEWU *et al.*, 1996).

A goma xantana também é frequentemente usada em combinação com outros hidrocolóides a fim de se obter o comportamento desejado para o fluido. O sinergismo entre hidrocolóides é de especial interesse comercial, por possibilitarem uma nova funcionalidade, além de possibilitar reduzir as quantidades utilizadas, reduzindo custos (KATZBAUER, 1998).

3.3.2 Análise Termogravimétrica (TG)

A termogravimetria é a técnica na qual a perda de massa de uma substância é medida em função da temperatura ou tempo, quando submetida a uma programação controlada de

temperatura. As técnicas mais difundidas de análise térmica são a análise térmica diferencial (DTA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) (CARVALHO FILHO, 2000; ZARONI, 2006).

As curvas de TG podem ser classificadas em: isotérmica, quase-isotérmica e dinâmica. Na TG isotérmica, a variação de massa é registrada em função do tempo à temperatura constante. Na TG quase isotérmica, o aquecimento é interrompido no início do evento de perda de massa permanecendo isotérmico até obtenção de massa constante, e na TG dinâmica, há um acompanhamento das variações de massa sofrida pela amostra em função da temperatura quando esta é submetida a um resfriamento ou aquecimento linear. Essas curvas permitem obter informações importante sobre a estabilidade térmica da amostra e dos compostos intermediários no processo de termodecomposição, sobre a composição dos produtos intermediários e do resíduo de massa b(PINHO, 1999; CARVALHO FILHO, 2000).

Segundo Pinho (1999), nas curvas de TG observam-se degraus correspondentes às variações de massa em função do tempo e/ou temperatura e na curva da sua derivada, DTG, os degraus equivalem a picos que delimitam áreas proporcionais às alterações de massa com aquecimento da amostra. Os resultados de variação de massa a partir da DTG aparecem de uma forma mais visualmente acessível, uma vez que as inflexões da TG são enfatizadas e possibilitam a separação de reações sobrepostas e a determinação com maior exatidão das temperaturas correspondentes ao início e quando os processos de decomposição atingem velocidade máxima (CARVALHO FILHO, 2000).

Existem diversos fatores que podem afetar as curvas TG, sendo os mais frequentes: a razão de aquecimento, atmosfera gasosa do forno, características da amostra (tamanho das partículas, cristalinidade), geometria e composição do cadinho (alumínio, platina, quartzo), peso da amostra, calor de reação e defasagens de até $\pm 10\%$ na temperatura programada pode provocar erros consideráveis (PINHO, 1999).

O principal interesse pelo método de TG é a possibilidade de eliminar o tratamento da amostra para retirada de interferentes e também diminuir o tempo de análise, além das informações complementares que cada técnica pode fornecer. Nos diversos domínios da sua aplicação, a termogravimetria é usada de um modo geral para: obter os parâmetros cinéticos das reações de decomposição, identificar uma oxidação ou uma redução, isolar fases intermediárias que possam surgir durante a história térmica de uma amostra, determinar a estabilidade térmica de compostos orgânicos e minerais, controlar e conhecer o estado de hidratação dos sais (CANOTILHO *et al.*, 1992).

3.3.3 Massa Molar

Para caracterizar o biopolímero xantana, diferentes parâmetros podem ser levados em consideração, como a estrutura química, o comportamento reológico, o conteúdo de grupos acetil e piruvato e a massa molar (BORN *et al.*, 2002).

A estrutura ramificada e a alta massa molar conferem à goma xantana uma alta viscosidade, mesmo em baixas concentrações. A rede tridimensional formada por associações de cadeias de goma xantana tem eficiente estabilidade para suspensões e emulsões (KATZBAUER, 1998). Muitas das propriedades reológicas da goma xantana derivam de sua conformação dupla-hélice adotada em solução. A cadeia lateral trissacarídica alinha-se com a cadeia celulósica principal, estabilizando a conformação por interações não covalentes (SUTHERLAND, 1996).

Estudos preliminares preconizam que a introdução de ramificações reduz o grau de enrolamento de uma cadeia linear, sendo a viscosidade de um polímero ramificado menor que a de um linear de mesma composição química e massa molar. A queda da viscosidade com o aumento de ramificação sempre ocorre quando a ramificação não excede a um dado comprimento, estando relacionado com a alteração no movimento cooperativo dos segmentos da cadeia (DIAZ *et al.*, 2004). Alguns pesquisadores, porém, relatam que o aumento das ramificações aumenta a viscosidade e que isto pode ocorrer quando as ramificações são longas e enrolam-se entre as cadeias, com comprimento maior que o comprimento crítico da cadeia (NAVARRO, 1997; RAO, 1999).

A cadeia de um biopolímero é sintetizada através de uma reação enzimática em que os monômeros são adicionados, ocorrendo polimerização de adição com cadeias de diferentes comprimentos. Em decorrência, haverá uma distribuição de massas molares, não sendo possível obter um valor único e definido do peso molecular ou massa molar do polímero; daí, que o cálculo do peso molecular médio ou massa molar média (PM) seja efetuado com base na média da distribuição das massas molares (DPM) (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

García-Ochoa *et al.*, 2000 relatam que as propriedades físicas, reológicas, mecânicas, térmicas e o comportamento de um dado biopolímero durante o processamento dependem do tamanho médio e da distribuição de comprimentos das cadeias do polímero. Se a estrutura química do biopolímero é igual, PM e/ou DPM diferentes podem alterar as propriedades do biopolímero. Por isto, um dos fatores de caracterização dos polímeros é sua massa molar.

As condições operacionais do processo fermentativo, a composição do meio de cultura e do substrato e as características genéticas da bactéria de *Xanthomonas*, influenciam o PM da goma xantana, sendo produzidos biopolímeros com massas molares médias e distribuições diferentes (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é um dos métodos mais utilizados para separar e analisar polímeros acoplado ao sistema a um detector de Índice de Refração (IR). Especificamente, a técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC - Gel Permeation Chromatography) ou cromatografia de exclusão molecular permite fornecer informações referentes ao peso molecular (massa molar) médio e à distribuição do mesmo mediante programas estatísticos específicos incorporados aos cromatógrafos (CIOLA, 1998).

O mecanismo de separação da cromatografia por exclusão está baseado na diferença de volume hidrodinâmico das cadeias de diferentes tamanhos e estrutura. Utiliza-se uma resina empacotada na coluna, que são macromoléculas com ligações cruzadas e afinidade pelos solventes, mas que são insolúveis nos mesmos. A resina da fase estacionária é um gel não carregado equilibrado no mesmo eluente que separa as moléculas em análise (COLLINS *et al.*, 1995). Na fase estacionária, o espaço intersticial entre as partículas da resina é ocupado pelo líquido que ao fluir, elue as moléculas a serem separadas. A porosidade da fase estacionária controla a eluição, de maneira que a variação no fluxo imprime uma velocidade que promove a separação (MANO, 1985).

A separação das moléculas acontece quando o fluxo da fase móvel passa através dos poros da fase estacionária. A escolha desta malha permite a exclusão das moléculas, de forma que as menores são retidas nesses poros e as maiores são eluídas primeiro, havendo a separação contínua de substâncias por tamanho molecular. O mecanismo de separação depende principalmente do tamanho (massa molar), da estrutura e da conformação química das macromoléculas (DRUZIAN, 2000).

Diversos estudos têm mostrado a influência da linhagem de *Xanthomonas*, da agitação, da temperatura, sendo observadas variações na massa molar média. Os resultados de Shatwell *et al.* (1990) indicaram variações entre $0,9 \times 10^6$ a $1,27 \times 10^6$ Da, quando utilizadas as linhagem campestris 646, a $1,27 \times 10^6$ e phaseoli 1128, pela técnica de espalhamento de luz, enquanto o PM, viscosimétrico médio, determinado pela técnica de viscosidade oscilou entre $2,4 \times 10^6$ a $6,3 \times 10^6$, Da para essas cepas, respectivamente. Com o aumento da velocidade de agitação durante a fermentação, o PM médio atingiu valores de $6,9 \times 10^6$ Da e $8,6 \times 10^6$ Da, a 200 e 800 rpm, respectivamente (PETERS *et al.*, 1989). Entretanto,

Papagianni *et al.* (2001), não obtiveram essa correlação entre o PM médio da xantana com a velocidade de agitação (5×10^5 rpm). Em termos de temperatura, o aumento de 25 para 34°C reduziu a massa molar média do polímero (CASAS *et al.*, 2000). Normalmente, a goma xantana apresenta peso molecular médio aproximado de 2.10^6 Da, mas podendo chegar a 13 – 50.10^6 Da (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

Quanto à composição química, há uma relação entre o teor de piruvil e acetil e o PM da xantana (CALLET *et al.*, 1987). Variações de PM foram observados ao se comparar valores entre xantana livre de piruvato ($2,3 \times 10^6$ Da), xantana livre de acetil e piruvato ($2,3 \times 10^6$ Da) em relação à xantana nativa ($5,2 \times 10^6$ Da). A desacetilação não afetou o conteúdo de ácido pirúvico nem a massa molar da xantana.

3.3.4 Composição monomérica da goma xantana

As espécies e linhagem da bactéria *Xanthomonas* utilizados no processo de fermentação podem ser fatores que influenciam a composição do biopolímero formado. O polissacarídeo xantana produzido por diferentes espécies de *Xanthomonas* contém normalmente glicose, manose e ácido glucurônico (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000). A presença de ramnose e xilose foram encontradas nos polissacarídeos produzidos pelos patovares *juglandis* e *phaseoli*, respectivamente (SLONEKER; JEANES, 1962; LOWSON; SYMES, 1977 apud SOUZA; VENDRUSCULO, 1999). A xantana sintetizada pelo patovar *pruni* apresenta o monossacarídeo ramnose em sua composição (SOUZA; VENDRUSCOLO, 1999).

A literatura tem mostrado que variações quantitativas entre polímeros produzidos por diferentes microrganismos do gênero *Xanthomonas*, são mais comuns que as diferenças qualitativas, e as principais variações estão relacionadas com o conteúdo dos substituintes piruvato e acetato. O conteúdo de ácido pirúvico no polissacarídeo de diferentes espécies e cepas de *Xanthomonas* foi avaliado, inicialmente, por Orentas *et al.* (1963) com variações de 1,05% a 7,64% (p/v). Vários trabalhos sucederam-se, mostrando a influência da espécie, patovar e cepa na composição química qualitativa e quantitativa do polímero. Alguns estudos de composição monomérica de gomas xantana produzidas por diferentes cepas de *Xanthomonas* estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 2. Composição química (%) de biopolímero produzido por diferentes cepas de *Xanthomonas*.

Microrganismo	Glc (%)	Man (%)	Aglc (%)	Ac (%)	Ap (%)	Referência
<i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i> 646	40,2	36,0	23,8	4,5	4,4	SHATWELL <i>et al.</i> (1990)
<i>X. campestris</i> pv <i>oryzae</i> PXO ₆₁	40,6	37,7	21,7	14,3	0,3	
<i>X. campestris</i> pv <i>phaseoli</i> 556	40,5	38,7	20,8	1,6	6,0	
<i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i> 10	-	-	-	10,0	0,24	
<i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i> 11	-	-	-	8,1	0,50	SÁNCHEZ <i>et al.</i> (1997)
<i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> 16	-	-	-	4,6	6,82	
<i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i> E2	-	-	-	7,3	2,56	
<i>X. campestris</i>	30,1	27,3	14,9	6,5	7,1	
<i>X. fragaria</i> 1822	24,6	26,1	14,0	5,5	4,9	KENNEDY; BRADSHAW
<i>X. gummisudans</i> 2182	34,8	30,7	16,5	10,0	4,7	(1984) apud GARCÍA-
<i>X. juglandis</i> 411	33,2	30,2	16,8	6,4	6,9	OCHOA <i>et al.</i> (2000)
<i>X. phaseoli</i> 1128	30,9	28,6	15,3	6,4	1,8	
<i>X. vasculorum</i> 702	34,9	30,2	17,9	6,3	6,6	
<i>X. arboricola</i> pv <i>pruni</i> 115	-	-	-	2,8	0,8	BORGES (2007)

Glc = Glicose/Glucose; Man = Manose; Aglc = Ácido glucurônico; Ac = Ácido acético e Ap = Ácido pirúvico.

A composição monomérica da unidade repetitiva da xantana tem sido amplamente estudada por se tratar de uma estrutura passível de mudanças ocasionadas também pelas diferentes condições operacionais aplicadas durante a fermentação. Diferentes métodos têm sido utilizados para a determinação da composição deste biopolímero, incluem desde técnicas simples, como cromatografia de camada delgada e métodos colorimétricos, até a utilização de cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa e também técnicas espectrométricas, como a de infravermelho e de ressonância magnética (CHAPLIN, 1994; CANEVAROLO, 2004).

Os polissacarídeos extracelulares produzidos por bactérias *Xanthomonas* têm sido amplamente caracterizados. Primeiramente, o polímero produzido pela bactéria *Xanthomonas phaseoli* foi analisado, sendo composto de D-glucose, D-manose e D-ácido glucurônico na proporção de 1:1:1 (LESLEY; HOCHSTER, 1959). Após este trabalho, Sloneker e Jeanes (1962) estudaram o polissacarídeo produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris* cepa NRRL B-1459, e verificaram que este é composto de D-glucose, D-manose e D-ácido glucurônico na proporção 2,8:3,0:2,0; além de ácido acético e ácido pirúvico, na proporção 1,73 : 0,627.

Polímeros que apresentam um alto conteúdo de piruvato são interessantes para aplicação nos processos de recuperação terciária de petróleo, pois apresentam menor adsorção ao solo e conseqüentemente, melhora a injetabilidade em poços (KLEINITZ *et al.*, 1989). O conteúdo de acetato e piruvato apresentam um grande efeito no comportamento reológico, adsorção e injetabilidade de soluções de xantana (TAYLOR; NASR-EL-DIN, 1998).

A composição química não influencia apenas a viscosidade, mas também as propriedades viscoelásticas. O efeito da presença de piruvato na interação macromolecular aumentou a capacidade gelificante da xantana, quando combinada com outros polímeros, característica importante para aplicação em fluido de perfuração em poços de petróleo. Xantanas com alto grau de piruvatação formam um gel altamente termoresistente, enquanto xantanas depiruvatadas ou naturalmente livres de piruvato reduzem a interação depreciando a formação do gel (LECHNER *et al.*, 1996).

3.4 APLICAÇÃO DE GOMA XANTANA NA ÁREA PETROQUÍMICA

A indústria de petróleo no Brasil foi instalada em 1953, com a criação da empresa Petróleo Brasileira S/A – Petrobras. Inicialmente, com uma produção média de 2.700 barris

por dia, em 50 anos, esta aumentou para 2,2 milhões de barris por dia em 2011. A expectativa é que continue a trajetória de expansão e alcance o patamar de 5,7 milhões de barris em 2035 (AIE, 2012).

Devido às suas propriedades reológicas e químicas, a goma xantana tem sido utilizada na área de exploração de petróleo, principalmente em fluido de perfuração de poços e na recuperação terciária de petróleo. As propriedades desejáveis para polímeros utilizados nestas aplicações são: alta viscosidade em baixas concentrações, comportamento pseudoplástico e estabilidade da viscosidade às variações de salinidade, temperatura e condições alcalinas (SHAH; ASHTAPUTRE, 1999). No Brasil, a empresa Petrobras adota normas técnicas para ensaios de viscosificantes e fixa condições específicas para a qualificação e aplicação destes em fluidos de perfuração e na recuperação avançada de petróleo (EOR) (PETROBRAS, 2003; PETROBRAS, 2009).

3.4.1 Recuperação Avançada de Petróleo (EOR)

Na indústria petrolífera, a goma xantana é o polímero mais adequado para Recuperação Avançada de Petróleo (EOR), não tendo até o momento nenhum outro substituto em escala comercial que supere suas qualidades. A goma xantana tem sido usada junto com hidróxido de sódio e surfactantes na técnica conhecida como APS (álcali-polímero-surfactante) (NAVARRETE *et al.*, 2001).

A aplicabilidade de soluções de xantana na EOR consiste num processo que utiliza energia química e térmica para recuperar o óleo cru que fica armazenado nos poros dos reservatórios rochosos após o término da produção primária e secundária. O residual de óleo cru nos reservatórios pode atingir até 70% do total das reservas de petróleo, indicando a relativa ineficiência da produção primária e secundária (BRYANT, 1987).

O polímero é dissolvido na água para aumentar a viscosidade da solução, antes de ser aplicada nos poços de injeção (FLEW; SELLIN, 1993). As propriedades reológicas das soluções de xantana são altamente dependentes da concentração de polímero e de qualquer eletrólito adicionado (DIAZ *et al.*, 2004). O processo de injeção de polímeros utiliza aditivos poliméricos na concentração de 500 a 1500 ppm na água de injeção (MEZZOMO; VITAL, 1981 apud AGUIAR *et al.*, 2010).

Segundo Thomas (2001), quando o óleo do reservatório apresenta viscosidade um pouco elevada, pode-se adicionar polímeros à água de injeção para transformá-la em um

fluido que se desloque dentro do meio poroso com a mesma mobilidade que o óleo. Devido à essa semelhança, o fluido injetado não percorre caminhos preferenciais e se dirige rapidamente para o poço de produção, aumentando a eficiência e eficácia de varrido. As características químicas da xantana exercem grande influência nesta aplicação. A presença de agregados, biomassa e microgéis no polímero pode provocar obstrução dos poros da formação rochosa (SMITH; PACE, 1982; KULICKE *et al.*, 1990). O conteúdo de piruvato e acetato apresentam um grande efeito no comportamento reológico, adsorção e injetabilidade das soluções de xantana (TAYLOR; NASR-EL-DIN, 1998).

3.4.2 Fluido de perfuração para poços de petróleo

A perfuração de um poço é uma tecnologia-chave para exploração e produção de petróleo, uma vez que os custos envolvidos neste processo podem representar de 40 a 80% dos custos totais de exploração (ALMEIDA; ARAÚJO, 2002). A perfuração é realizada através de uma sonda, onde as rochas são rompidas pela ação da rotação e peso aplicado a uma broca existente na extremidade de uma coluna de perfuração. Os fragmentos da rocha gerados são removidos continuamente através de um fluido de perfuração ou lama. O fluido é injetado por bombas pelo interior da coluna de perfuração através da cabeça de injeção ou *swivel* e retorna à superfície pelo espaço anular formado entre as paredes do poço e da coluna. Ao atingir determinada profundidade, a coluna de perfuração é retirada do poço e uma coluna de revestimento de aço, de diâmetro inferior ao da broca, é colocada no poço. O espaço anular entre os tubos do revestimento e as paredes do poço é cimentado com a finalidade de isolar as rochas perfuradas permitindo então o avanço seguro da perfuração (THOMAS, 2001).

Esses fluidos são indispensáveis durante as atividades de perfuração de um poço, pois desempenham uma série de funções essenciais (FERRAZ, 1977; THOMAS, 2001; AMORIM *et al.*, 2005), tais como: resfriar e lubrificar a broca e o tubo de perfuração para evitar a corrosão; auxiliar a suspensão do cascalho gerado durante a perfuração; controlar as pressões das formações perfuradas; exercer pressão sobre as paredes do poço para estabilizá-lo, evitando o desmoronamento e formação da torta de filtração que seletivamente fecha os poros e em outras aberturas nas formações penetradas pela lama. Para satisfazer essas exigências, o fluido de perfuração deve possuir propriedades físico-químicas que possam ser cuidadosamente controladas, para se ajustarem a uma grande variedade de condições em subsuperfície. Portanto, o desempenho destas funções é diretamente dependente das propriedades reológicas,

de filtração e lubricidade que depende da composição dos fluidos de perfuração (MEDEIROS *et al.*, 2008).

3.4.2.1 Classificação dos fluidos de perfuração

Os fluidos de perfuração são comumente classificados de acordo com o componente principal que constitui a fase contínua. Esses componentes podem ser: água, óleo ou gás. Quando o componente principal da fase contínua é água, é dito que ele é à base de água, e quando é óleo, o fluido é à base de óleo. Os fluidos à base de gás incluem aqueles em que o gás é a fase contínua (gás seco), e aqueles onde o gás é a fase descontínua, como em espumas e espumas compactas. A presença de ambos os líquidos (óleo e água) juntos resulta em uma emulsão, formada através de agitação e da presença de um emulsificante adequado. A natureza química do agente emulsificante determina se o óleo está emulsionado na água (emulsão direta) ou se a água está emulsionada no óleo (emulsão inversa), (DEHGHANPOUR; KURU, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2008).

Os fluidos a base de água apresentam baixo custo em relação aos fluidos à base de óleo e sintéticos, mas apresentam a desvantagem de causar danos às formações rochosas sensíveis ou simplesmente não serem adequados em função da elevada afinidade hidrofílica das formações. Os fluidos de alta performance, utilizados comercialmente, tem características excelentes no combate aos fatores negativos que fluidos base água exercem na formação e nas propriedades comumente necessárias para uma boa operação de perfuração (AMORIM *et al.*, 2005). A utilização de um ou outro tipo de fluido depende da profundidade do poço e do tipo de formação a ser perfurada (BORGES, 2007).

Os fluidos são formulados com o objetivo de garantir uma perfuração rápida e segura. Para este fim, é necessário que o fluido de perfuração seja estável quimicamente, facilite a separação dos cascalhos na superfície, estabilize as paredes do poço, seja inerte em relação a danos às rochas produtoras, mantenha os sólidos em suspensão quando estiver em repouso, tenha um fluxo bombeável, aceite qualquer tratamento físico e químico, apresente baixo grau de corrosão e abrasão em relação à coluna de perfuração e demais equipamentos do sistema de circulação e operadores, não interfiram nas interpretações geológicas do material retirado do poço, e apresente custo compatível com a operação (FERRAZ, 1977; AMORIM *et al.*, 2005; DARLEY; GRAY, 1988; LUMMUS; AZAR, 1986).

3.4.2.2 Composição dos fluidos de perfuração base água

Os fluidos de perfuração, de uma maneira geral, são sistemas multifásicos, que podem conter água, material orgânico, sais dissolvidos e sólidos em suspensão nas mais diversas proporções. A proporção entre os componentes básicos e as interações entre eles provocam sensíveis modificações nas propriedades físico-químicas do fluido. Conseqüentemente, a composição é o principal fator a considerar no controle de suas propriedades (CAENN; CHILLINGAR, 1996; MEDEIROS *et al.*, 2008).

O que determina as características de um fluido aquoso é a natureza da água e os aditivos químicos empregados no preparo deste. Segundo Thomas (2001), a principal função da água neste tipo de fluido é prover o meio de dispersão para os materiais coloidais, principalmente argilas e polímeros. A água utilizada para aplicação industrial em fluidos de perfuração pode ser doce, dura ou salgada. A água doce não precisa de pré-tratamento químico, pois praticamente não afeta o desempenho dos aditivos empregados no preparo do fluido. Já a água dura tem como característica principal a presença de sais de cálcio e de magnésio dissolvidos, em concentração suficiente para alterar o desempenho dos aditivos químicos. É considerada água salgada aquela que apresenta salinidade superior a 1000 ppm de NaCl equivalente e pode ser natural, como a água do mar, ou pode ser salgada com a adição de sais como os cloretos de sódio, de cálcio e de potássio (CAENN; CHILLINGAR, 1996; MEDEIROS *et al.*, 2008).

Os aditivos são substâncias químicas que, quando adicionadas ao fluido, conferem a ele propriedades especiais, requeridas durante as atividades de perfuração. Esses aditivos podem desempenhar uma série de funções no fluido de perfuração. Atualmente, encontram-se disponíveis no mercado uma variedade de aditivos, que possuem diferentes funções, em decorrência da variedade de situações encontradas durante a perfuração de poços (TAYLOR; NASR-EL-DIN, 1998; AMORIM *et al.*, 2005). Os principais aditivos de fluido de perfuração à base de água estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3. Principais aditivos de fluido de perfuração a base de água e respectivas funções.

Aditivo	Função	Componente
Água	Meio de dispersão	Doce ou Salgada
Tensoativos	Diminuir a tensão interfacial entre a fase contínua e os demais aditivos	
Floculantes	Promover o agrupamento das partículas suspensas, aumentando a viscosidade do fluido	Soda cáustica, cal e cloreto de sódio
Dispersantes	Evitar a incorporação de partículas de argila da formação no fluido	Lignossulfonato, tanino, lignito e fosfatos
Lubrificantes	Facilitar a penetração da broca e coluna na formação	Glicerina, Éster graxo de polietileno glicol
Inibidores de argila	Evitar que as argilas sejam hidratadas e provoquem prisão de ferramentas	Cloreto de potássio e cloreto de sódio
Redutores de filtrado	Evitar que o fluido invada a formação e venha a danificar a jazida	Carboximetilcelulose (CMC), amido
Controladores de pH	Controlar o grau de acidez ou alcalinidade do fluido	Óxido de magnésio para fluido polimérico e soda cáustica para fluido com argila ativada
Bactericidas	Evitar a rápida degradação do fluido, permitindo, assim, que o mesmo seja reutilizado em outras perfurações	Triazina, glutaraldeído, organoclorados, soda cáustica e cal
Viscosificantes (sólidos ativos)	Aumentar a viscosidade para proporcionar melhor limpeza do poço e suspensão dos cascalhos	Goma xantana, goma guar, argila ativada, bentonita
Adensantes (sólidos inertes)	Dar peso ao fluido e controlar a pressão no interior do poço	Calcita, baritina e hematita
Alcalinizantes	Controlar o volume de filtrado	Soda cáustica, potassa cáustica e cal hidratada

Fonte: TAYLOR;NASR-EL-DIN, 1998, CAENN;CHILLINGAR, 1996; AMORIM *et al.*, 2005.

Os fluidos de perfuração contêm aditivos classificados em viscosificantes, agentes densificantes, redutores de viscosidade (defloculantes), redutores de filtrado e aditivos especiais. Os viscosificantes têm a função de aumentar a viscosidade do fluido, como a bentonita, atapulgita e polímeros naturais e sintéticos. Os agentes densificantes aumentam a densidade do fluido, sendo a barita (BaSO_4) o mais utilizado. Os redutores de viscosidade (defloculantes ou dispersantes) e de perda de fluido são adicionados aos fluidos com a função de reduzir a viscosidade e o volume de filtrado, respectivamente. Como aditivos especiais, estão incluídos floculantes, controladores de pH, antiespumantes, lubrificantes, anticorrosivos, dentre outros (LUMMUS; AZAR, 1986).

Segundo Thomas (2001), os polímeros como aditivos de fluidos de perfuração devem apresentar alta viscosidade em baixas concentrações, comportamento pseudoplástico e estabilidade da viscosidade à salinidade, temperatura e condições alcalinas, de modo que apresente fácil injeção, mantenha os cascalhos em suspensão, facilitando a remoção destes e estabilize as paredes do poço. Por apresentar tais características, a goma xantana passou a ser amplamente utilizada, comparadas com outros polímeros comumente utilizadas nesse tipo de fluido, como CMC (Carboximetilcelulose), PAC (Celulose Polianiônica) e PHPA (Poliacrilamida parcialmente hidrolisada), que são mais sensíveis a condições de alta salinidade (BORGES *et al.*, 2009; SHAH; ASHTAPUTRE, 1999).

A pseudoplasticidade dos fluidos é imprescindível para a limpeza dos poços, uma vez que a baixas taxas de cisalhamento, a viscosidade deve ser alta para que os cascalhos possam permanecer em suspensão durante o fluxo, já que a velocidade de bombeamento é baixa. Por outro lado, a altas taxas de cisalhamento, a própria velocidade de circulação é responsável pelo carreamento dos cascalhos. Entretanto, o bombeamento de um fluido de alta viscosidade é dificultado fazendo com que o fluido deva apresentar uma baixa viscosidade a altas taxas de cisalhamento. A goma xantana é um viscosificante polimérico para fluidos usados na exploração e produção de poços de petróleo e gás (PETROBRAS, 2009), entretanto a determinação dos parâmetros reológicos, índice de consistência (K), índice de fluxo (n) e a força gel, são de grande importância na qualificação da xantana para a área de exploração de petróleo (SHAH; ASHTAPUTRE, 1999; BORGES, 2007; PETROBRAS, 2009).

Especialistas em fluidos de perfuração enfrentam um dilema em selecionar aditivos que possa aumentar o desempenho da perfuração de um poço de petróleo e minimizar as preocupações sobre os efeitos prejudiciais de aditivos dos fluidos de perfuração em zonas de produção do petróleo. O custo, o desempenho, a qualidade, efeitos ambientais,

compatibilidade da avaliação da produção e da exploração, utilização das perfurações e logística são os principais parâmetros que caracterizam o uso de aditivos em fluidos de perfuração (ENGLAND, 1988).

3.4.2.3 Propriedades dos fluidos de perfuração

As propriedades de controle dos fluidos podem ser físicas ou químicas. As propriedades químicas são mais genéricas e podem ser medidas em qualquer tipo de fluido. Já as propriedades físicas são mais específicas e são determinadas para distinguir certos tipos de fluidos. As propriedades físicas mais importantes e frequentemente medidas nas sondas são a densidade, os parâmetros reológicos, as forças géis e o teor de sólidos. Outras propriedades físicas de menor uso são a resistividade elétrica, o índice de lubrificidade e a estabilidade elétrica. As propriedades químicas determinadas com maior frequência nos laboratórios das sondas são o pH, teor de cloreto e a alcalinidade. Outras propriedades químicas que podem ser avaliadas são o excesso de cal, o teor de cálcio e de magnésio e a concentração de potássio (TAYLOR; NASR-EL-DIN, 1998; FERRAZ, 1977).

As propriedades físicas mais importantes dos fluidos de perfuração e frequentemente medidos nas sondas *onshore* (perfuração em terra) e *offshore* (perfuração em mar) são:

1. Parâmetros Reológicos

O comportamento de fluxo de um fluido é definido pelos parâmetros reológicos, que vão influenciar diretamente no cálculo de perdas de carga na tubulação e velocidade de transporte dos cascalhos. A reologia é a ciência da deformação e fluxo da matéria. Fazendo certas medidas reológicas do fluido, é possível determinar como o fluido escoará sob variadas condições de temperatura, pressão e taxa de cisalhamento. Em termos reológicos, a viscosidade é o parâmetro mais conhecido, sendo definida como a resistência que uma substância apresenta ao fluxo. No campo, as principais propriedades reológicas de interesse, que se encontram vinculadas ao desempenho do fluido são: índice de comportamento; índice de consistência; viscosidade aparente; viscosidade plástica; limite de escoamento e força gel (HAMED; MANSOUR, 2009).

É importante controlar as propriedades reológicas do fluido visando aperfeiçoar a operação de perfuração, através da maximização da limpeza do poço, minimização da pressão

de bombas, evitando o influxo da formação e prevenindo perda de circulação para a formação perfurada. Nos líquidos, a transferência de quantidade de movimento devido à atividade molecular é pequena em comparação com a força de coesão entre as moléculas, e, por isso, a tensão de cisalhamento e a viscosidade dependem principalmente da ordem de grandeza destas forças de coesão que tendem a manter as moléculas adjacentes em uma posição fixa e a resistir ao movimento. Como estas forças diminuem rapidamente com o aumento da temperatura, a viscosidade dos líquidos diminui com o aumento da temperatura (HAMED; MANSOUR, 2009). A viscosidade aparente é a viscosidade do fluido quando medida a uma determinada taxa de cisalhamento, que, no caso dos fluidos de perfuração, é fixada pelo *American Petroleum Institute* (API). No modelo reológico plástico de *Bingham*, pode-se calcular a viscosidade aparente a partir do valor medido em um viscosímetro rotacional a 600 rpm (rotações por minutos). A viscosidade plástica é a medida da resistência interna exercida por um fluido para fluir, resultando da interação dos sólidos presentes em um fluido de perfuração. Ela tem um efeito mecânico, indicativo de número, tipo e tamanho das partículas sólidas. Quando o teor de sólidos aumenta, a fricção entre as partículas aumenta (DEHGHANPOUR; KURU, 2011).

2. Força Gel

Alguns fluidos de perfuração são tixotrópicos, isto é, adquirem um estado semirrígido quando estão em repouso e voltam a adquirir um estado de fluidez quando estão novamente em movimento. A força gel é um parâmetro também de natureza reológica, que indica o grau de gelificação devido à interação elétrica entre as partículas dispersas. A força gel inicial (G_0) mede a resistência para colocar o fluido em fluxo, enquanto a força gel final (G_{10}) mede a resistência do fluido para reiniciar o fluxo, quando este fica certo tempo em repouso. A diferença entre elas indica o grau de tixotropia do fluido. Os valores de forças géis determinados em testes de campo são usualmente denominados como força gel inicial, que seria uma medida de reologia feita no momento exato da parada de circulação e a força gel final, que é a medida feita após um tempo da parada de circulação (HAN *et al.*, 1999; MEDEIROS *et al.*, 2008).

O interessante é que a medida do ângulo de deformação da mola seja menor para o gel inicial, pois a leitura é feita no momento que houve a parada de circulação e o fluido ainda não se agregou suficientemente para formar um gel rígido, e a força para quebrar esse gel ao

submetê-lo novamente ao cisalhamento não é tão grande, enquanto que para o gel final, do tempo da parada de circulação até submeter o fluido novamente à circulação, é um pouco maior, o que possibilita a agregação das partículas possibilitando a formação de um gel mais rígido, ou seja, mas difícil de quebrar. Valor ideal pré-determinado na literatura de forças géis varia de acordo com a necessidade na perfuração, mas os valores esperados no campo variam entre 7 e 12, esse valor é dado em ângulo (FERRAZ, 1977).

3. Parâmetros de filtração

A capacidade do fluido de perfuração em formar uma camada de partículas sólidas úmidas, denominada reboco, sobre as rochas permeáveis expostas pela broca é de fundamental importância para o sucesso da perfuração e da completa ação do poço. Para formar o reboco, deve haver o influxo da fase líquida do fluido do poço para a formação. Este processo é conhecido como filtração. É essencial que o fluido tenha uma fração razoável de partículas com dimensões ligeiramente menores que as dimensões dos poros das rochas expostas. Quando existem partículas sólidas com dimensões adequadas, a obstrução dos poros é rápida e somente a fase líquida do fluido, o filtrado, invade a rocha. O filtrado e a espessura do reboco são dois parâmetros medidos rotineiramente para definir o comportamento do fluido quanto à filtração (DEGHANPOUR; KURU, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2008). O ideal seria que não houvesse filtrado, mas na prática é observado que valores até 10 mL (valores de laboratório), podem ser esperados sem que haja muita preocupação.

4. Densidade

É através da medida de densidade que se conhece o peso do fluido e quanto de pressão esse fluido pode suportar. É o peso do fluido, ou seja, a pressão que ele exerce na formação, que impedirá que fluidos indesejados migrem para o interior do poço, fator esse de suma importância na segurança da formação. O diferencial de pressão entre o interior do poço e a formação deve ser pequeno, sendo que, a pressão exercida pelo fluido (interior do poço) seja maior que a pressão exercida pela formação (fluidos no interior da formação), pois é esse diferencial de pressão que garante que fluidos indesejados não migrem do interior da formação para a superfície (FERRAZ, 1977; CAENN; CHILLINGAR, 1996).

5. Estabilidade térmica

À medida que aumenta a profundidade vertical de um poço de petróleo, vários fatores são alterados. Um deles é a temperatura. Por isso, há grande necessidade de se desenvolver fluidos de perfuração com boa estabilidade térmica, ou seja, que quando submetido a um amplo intervalo de variação de temperatura, o mesmo não venha a ser degradado. Com o aumento da temperatura, muitos fluidos apresentam uma diminuição na sua viscosidade, conseqüentemente, um aumento no volume de filtrado (CAENN; CHILLINGAR, 1996).

6. Teor de sólidos

O teor de sólidos, cujo valor deve ser mantido no mínimo possível, é uma propriedade que deve ser controlada com rigor, porque o seu aumento implica em aumento de várias outras propriedades, tais como densidade, viscosidade e forças géis, além de aumentar a probabilidade de ocorrência de problemas como desgaste dos equipamentos de circulação, fratura da formação, devido à elevação das pressões de bombeio ou hidrostática, prisão da coluna e redução da taxa de penetração. O tratamento do fluido para reduzir o teor de sólidos pode ser preventivo ou corretivo. O tratamento preventivo consiste em inibir o fluido, física e quimicamente, evitando-se a dispersão de sólidos perfurados. No método corretivo, pode-se fazer uso de equipamentos extratores de sólidos, tais como tanques de decantação, peneiras, hidro ciclones e centrifugadores, ou diluir o fluido (CAENN; CHILLINGAR, 1996).

7. pH

A concentração hidrogeniônica, ou seja, o pH dos fluidos de perfuração é geralmente mantido no intervalo alcalino (7-10), para evitar problemas de corrosão dos equipamentos e dispersão das formações argilosas, (FERRAZ, 1977).

8. Resistividade Elétrica

Experimentalmente, encontra-se que em um dado material, à temperatura constante, a densidade de corrente é diretamente proporcional ao campo elétrico aplicado. Nos poços de

petróleo essa propriedade é fundamental, pois na perfilagem, operação em que os geólogos verificam a formação rochosa e até mesmo a presença de hidrocarbonetos, através de ondas eletromagnéticas, o fluido precisa obter características em que haja uma baixa resistência elétrica para que a operação citada não sofra influência nos parâmetros coletados, (FERRAZ, 1977).

9. Grau de inchamento de argilas

As montmorilonitas, um tipo de argila hidratável, são constituídas por duas folhas tetraédricas de silicato e uma folha octaédrica de alumina hidratada, intercaladas, e possuem conexões cristalinas relativamente fracas, permitindo a entrada da água ou outras substâncias polares, e, conseqüentemente, o aumento da distância basal ou interplanar, fenômeno dito como a expansão ou inchamento das argilas. Este efeito constitui um problema grande durante a perfuração dos poços, porque diversas formações de rocha contêm um índice elevado de argilas hidrofílicas, e os fluidos mais frequentemente usados são à base de água, principalmente devido as suas vantagens econômicas e ambientais (AMORIM *et al*, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentadas às metodologias analíticas empregadas, bem como os microrganismos e as matérias-primas utilizadas, cita os planejamentos experimentais adotados e relaciona os reagentes e equipamentos necessários ao desenvolvimento experimental.

Os experimentos envolvendo tratamentos microbiológicos, determinação da composição centesimal dos substratos e estudos de produção da goma xantana em agitadores orbitais (shaker) e em bioreator de 4,5L foram realizados no Laboratório de Pescado e Cromatografia Aplicada – LAPESCA da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia. Nesse laboratório foram realizados e desenvolvidos também a caracterização do polímero: viscosidade aparente, análise térmica, peso molecular e composição monomérica.

O estudo de um novo fluido de perfuração contendo goma xantana e a glicerina bruta foi realizada no Laboratório de Fluidos de Perfuração/P&D da empresa Carboflex – Produtos e Serviços Especiais Ltda.

4.1 MATERIAL

Os reagentes utilizados para os experimentos do trabalho foram:

- Sacarose, P.A., *Synth*;
- Uréia, A.A., *Fmaia*;
- Fosfato monobásico de potássio, P.A., *Synth*;
- Extrato de malte, *Himedia*;
- Extrato de levedura, *Himedia*;
- Peptona bacteriológica (of gelatin), *Acumedia*;
- Glicose, P.A., *Synth*;
- Ágar (pó), *Vetec*;
- Glicerina comercial PA, *Synth*;
- Glicerina bruta residual do biodiesel, da planta piloto de biodiesel da *Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA*.

Para aplicação em fluidos de perfuração base água, os aditivos utilizados foram da empresa Carboflex:

- Óxido de Magnésio;
- Cloreto de Potássio tipo II;
- Amido Normal;
- CMC LV;
- Inibidor Catiônico ;
- Bactericida ;
- Antiespumante ;
- Goma xantana comercial (Bioflex XG);
- Carbonato de Cálcio Fino;
- Baritina.

4.1.1 Equipamentos

Os equipamentos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho estão relacionados na Tabela 4.

Tabela 4. Equipamentos utilizados nos procedimentos experimentais.

Equipamentos	Marca	Modelo
Agitador de tubos	Hoenix	AP56
Agitador magnético	Hotlab	II
Autoclave vertical	Alpha	-
Balança analítica	Saartorius	BL 2105
Balança semi-analítica	Bel	-
Centrífuga	Eppendorf	5702R
Destilador de água	Barnstead	-
Estufa de cultura bacteriológica	Tecnal	TE 398/2
Estufa de secagem	Nova Ética	-
Forno mufla	Lavoisier	462-D
Agitador orbital com temperatura controlada (Shaker)	Tecnal	TE-424
Bioreator de 4,5 L	Tecnal	-
Espectrofotômetro	Perkin Elmer	UV/ VIS Lambda 35
Geladeira	Continental	460
Mini-processador	Walita Máster	-
pH metro digital	Quimis	
Reômetro	Haake	CV-20
TGA	Perkin Elmer	Pyris 1
CLAE	Perkin Elmer	GPC-IR Series 200 UV Series 200
Misturador	Hamilton Beach	-
Viscosímetro	Fann	35A
Estufa de rolamento/ envelhecimento	Ofite	-
Células inox de estufa	Ofite	-
Filtro press API	Ofite	-
Lubricímetro	Ofite	EP-Lubricity Tester

4.1.2 Microrganismos

Foram utilizadas doze cepas do gênero *Xanthomonas*. As bactérias foram obtidas da Coleção de Culturas do Instituto Biológico em Campinas-SP como é mostrado na Tabela 5.

Tabela 5. Cepas de *Xanthomonas* utilizadas na produção de goma xantana.

Ordem	Número da Cepa	Descrição
01	2103	<i>Xanthomonas campestris mangiferaeindicae</i>
02	356	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihotis</i>
03	510	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>cordiae</i>
04	247	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i>
05	1078	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i>
06	545	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i>
07	729	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i>
08	629	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i>
09	607	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i>
10	68	<i>Xanthomonas melonis</i>
11	472	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
12	290	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihotis</i>

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Composição centesimal da glicerina bruta residual do biodiesel como substrato para a produção de goma xantana

Foi testado o substrato alternativo para bioconversão da goma xantana, a glicerina bruta residual do biodiesel, a glicerina comercial PA e sacarose. A composição centesimal da glicerina bruta residual do biodiesel e glicerina comercial PA incluiu a determinação do teor de voláteis, cinzas, proteína bruta, lipídeos totais e carboidratos totais. Estes parâmetros são importantes considerando que a *Xanthomonas* necessita de nutrientes essenciais, como fonte de carbono e nitrogênio, para produzir goma xantana.

- Voláteis: foi determinado pelo método de secagem em estufa a 105°C com circulação de ar, dependendo do produto, de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC,1997).
- Cinzas: O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 700°C de acordo com a AOAC (1997).
- Proteína bruta: Os valores para proteína foram calculados a partir dos teores de nitrogênio total, usando os fatores de conversão. O fator geral de 6,25 foi usado para calcular as proteínas que não possuíam um fator de conversão específico. O nitrogênio total foi determinado pelo método Kjeldahl, segundo AOAC (1997).
- Lipídios totais: Os lipídios totais foram determinados, pelo método de extração Bligh e Dyer (1959), segundo AOAC (1997).
- Carboidratos: O teor de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de água, proteína, lipídios totais e cinzas. Os valores de carboidratos incluem a fibra alimentar total. Esta fração representa a fonte de carbono disponível para ser bioconvertida à goma xantana pelas cepas de *Xanthomonas*.

4.2.2 Manutenção dos microrganismos

As cepas de *Xanthomonas* foram mantidas em meio YM-ágar (Yeast Malt) contendo (p/v): glicose 1,0%; extrato de levedura 0,3%; extrato de malte 0,3%; peptona bacteriológica 0,5%; ágar 2,0%. O pH do meio foi ajustado para 7,0 e a esterilização foi a 121°C por 15 minutos (BRANDÃO *et al.*, 2009).

A repicagem das cepas *Xanthomonas* foram realizadas em placas de Petri e tubos de ensaio. Os tubos e as placas com meio YM ágar foram esterilizados à 121°C por 15 minutos e esfriados a temperatura ambiente. No caso dos tubos, o meio foi esfriado em posição inclinada para obtenção de maior superfície para repicagem. Para a repicagem das cepas foi utilizada à sementeira por estrias com uma alça de células reidratadas e incubado em estufa bacteriológica a 28°C ± 2°C por 48 horas para verificar o crescimento dos microrganismos.

Cessado o período de crescimento, as placas e os tubos foram armazenados em temperatura de refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), sendo renovadas a cada quinze dias através de repiques em meio YM-ágar. Para a estocagem dessas culturas, foi adicionado óleo mineral estéril em alguns tubos, e armazenados em temperatura de refrigeração.

4.2.3 Preparo do inóculo

O meio YM utilizado para o inóculo (produção de células) foi composto por (p/v): glicose 1,0%; extrato de levedura 0,3%; extrato de malte 0,3%; peptona bacteriológica 0,5% com o pH ajustado para 7,0. Foram preparados frascos de Erlenmeyers (250 mL) contendo 50mL do meio inóculo. Os frascos foram esterilizados em autoclave a uma temperatura de 121°C por um período de 15 minutos. Os meios foram resfriados a temperatura ambiente e uma alça de microrganismos da repicagem foi transferida para cada frasco. Os Erlenmeyers foram incubados em agitador orbital, 180 rpm, a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (BRANDÃO *et al.*, 2009).

4.2.3.1 Curva de crescimento microbiano do inóculo

As curvas de crescimento microbiano das cepas selecionadas foram realizadas a partir da transferência asséptica de 1mL do inóculo inicial em 50mL de meio YM líquido. Este foi incubado em agitador a 180rpm e 28°C . Foram retiradas amostras inicialmente a cada 3 horas, de forma asséptica, para a verificação do crescimento microbiano.

O crescimento celular foi monitorado até 48 horas de incubação do inóculo através da medição da leitura da absorbância, em comprimento de onda de 620 nm, em espectrofotômetro, por meio do plaqueamento em ágar YM através da técnica de disseminação com alça de *Drigalsky* ou bastão em ângulo reto esterilizados. As curvas de crescimento microbiano foram construídas a partir dos dados de absorbância e contagem total. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.4 Produção de goma xantana por fermentação em batelada - *Shaker*

4.2.4.1 Testes preliminares de produção de goma

Preliminarmente foi realizado um *screening* buscando selecionar as cepas de *Xanthomonas* que resultem em alta produção de xantana aliada a melhor viscosidade aparente. Para a produção de goma xantana foi utilizado três meios fermentativos: meio controle (I) com sacarose como fonte de carbono, meio alternativo (II) e (III) com glicerina bruta residual do biodiesel e glicerina comercial PA, respectivamente, como substratos. Todos os meios foram minimamente suplementadas com 0,01% de ureia e 0,1% de K_2HPO_4 . Os meios fermentativos (80 mL) foram transferidos para erlenmeyers de 250 mL e os pH's foram ajustados para 7,0 e autoclavados a 121°C por 15 minutos.

As produções de goma xantana foram realizadas em triplicata com as doze cepas de *Xanthomonas*, apresentadas na Tabela 5. Após o resfriamento dos meios fermentativos à temperatura ambiente, foram adicionados 20% de inóculo das cepas de *Xanthomonas*. As condições operacionais da fermentação em agitador orbital (*shaker*) foram de 250rpm de agitação, na temperatura de $28 \pm 2^\circ C$ por um período até 120 horas. A Figura 10 mostra a foto ilustrativa do *shaker* utilizado.



Figura 10. Ilustração do *shaker* utilizado nas etapas de produção de células (inóculo) e de produção de goma xantana.

As cepas que apresentaram maiores produções de xantana aliada a maiores viscosidades aparente (0,5% de solução aquosa de xantana a 25°C na taxa de cisalhamento de $25s^{-1}$) foram selecionadas para serem usados em um planejamento estatístico para otimizar a

produção de goma xantana, utilizando a glicerina bruta residual do biodiesel como substrato alternativo.

4.2.4.2 Otimização das condições de produção de goma xantana

Para avaliar a otimização da produção de goma xantana foi realizada um planejamento estatístico em estrela DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) fracionado 2^2 com 4 pontos axiais e triplicata no ponto central, totalizando 11 ensaios com variações de concentração de glicerina bruta e de inóculo, conforme apresentado na Tabela 6. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para determinar a influência das variáveis estudadas e adequá-las a quantidade de células a concentração de substrato.

Tabela 6. Planejamento experimental para avaliar a influência de variáveis independentes da composição do meio fermentado sobre a produção de xantana e viscosidade aparente.

Ensaio	Glicerina bruta (% , v/v)	Inóculo (% , v/v)
	(X ₁)	(X ₂)
1	-1 (2,00)	-1 (8,0)
2	-1 (2,00)	+1 (20,0)
3	+1 (6,00)	-1 (8,0)
4	+1 (6,00)	+1 (20,0)
5	-1,41 (1,17)	0 (14,0)
6	+1,41 (6,83)	0 (14,0)
7	0 (4,00)	-1,41 (5,5)
8	0 (4,00)	+1,41 (22,5)
9	0 (4,00)	0 (14,0)
10	0 (4,00)	0 (14,0)
11	0 (4,00)	0 (14,0)

Todos os meios fermentativos foram minimamente suplementados com 0,01% de uréia e 0,1% de KH₂PO₄. As produções foram realizadas nas mesmas condições operacionais em shaker citadas no item 4.2.4.1. As variáveis dependentes (Y₁ e Y₂) coletadas como respostas foram: produção de goma xantana (g.L⁻¹) e viscosidade aparente (mPa.s).

4.2.5 Produção de goma xantana por fermentação em batelada - Bioreator 4,5L

Para a otimização da produção de goma xantana em uma maior escala, o meio fermentativo contendo a glicerina bruta residual do biodiesel (2,0%, m/v) minimamente suplementado com 0,01% de uréia e 0,1% de KH_2PO_4 foi fermentada pela cepa de *Xanthomonas* selecionada em bioreator com capacidade de 4,5 L (Figura 11).

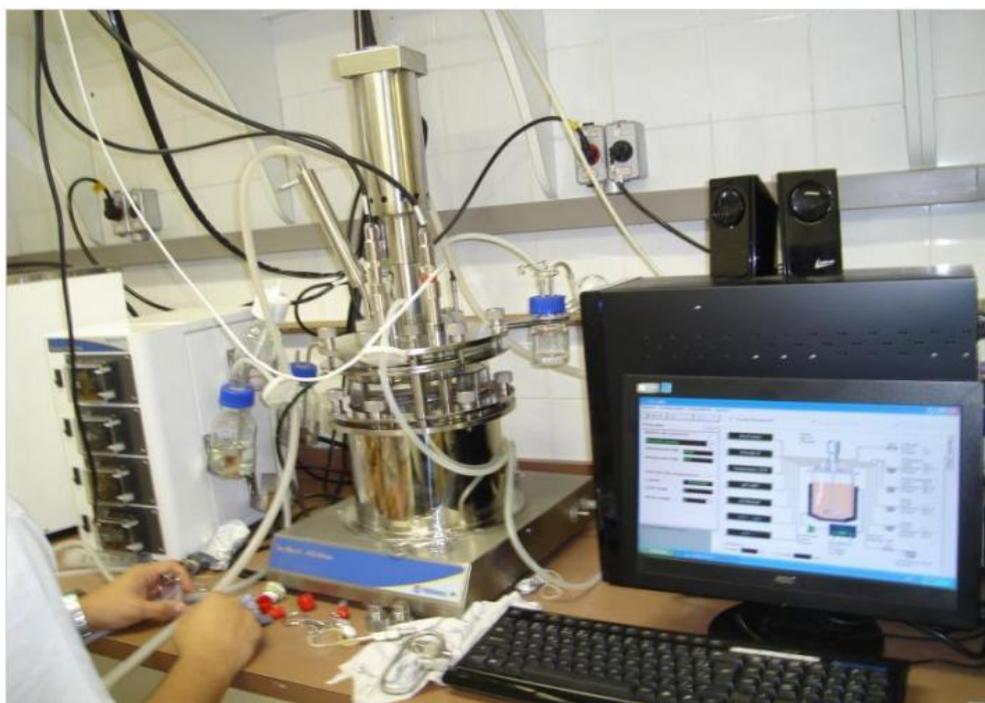


Figura 11. Ilustração do bioreator utilizado para realizar a etapa de produção de xantana.

Nessa fermentação também foi utilizado um planejamento estatístico em estrela DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) fracionado 2^2 com 4 pontos axiais e triplicata no ponto central, totalizando 11 ensaios (na Tabela 7). A aeração e a agitação foram os parâmetros operacionais variados em 0,5 – 1,5 vvm e 300 – 700 rpm, respectivamente, numa temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 120 horas. As variáveis dependentes (Y_1 , Y_2 , Y_3) coletadas como respostas foram: produção de goma xantana (g.L^{-1}), produção de massa celular (g.L^{-1}) e viscosidade aparente (mPa.s).

Tabela 7. Planejamento experimental variando aeração e agitação para a produção de biomassa e goma xantana.

Ensaio	Aeração (vvm) (X ₁)	Agitação (rpm) (X ₂)
1	-1 (0,7)	-1 (360)
2	-1 (0,7)	+1 (640)
3	+1 (1,3)	-1 (360)
4	+1 (1,3)	+1 (640)
5	-1,41 (0,5)	0 (500)
6	+1,41 (1,5)	0 (500)
7	0 (1,0)	-1,41 (300)
8	0 (1,0)	+1,41 (700)
9*	0 (1,0)	0 (500)
10*	0 (1,0)	0 (500)
11*	0 (1,0)	0 (500)

* pontos centrais.

4.2.6 Recuperação da goma xantana

Para a recuperação da goma xantana produzida nas fermentações, em shaker ou em bioreator, o caldo fermentativo foi centrifugado a 18800 x g por 30 minutos à 5°C, para remoção das células. Ao sobrenadante foi adicionado álcool etílico 98°GL na proporção de 1:3 (v/v) para precipitação da xantana. As gomas obtidas foram secas em estufa (35 ± 2°C) até o peso constante, moídas e armazenadas em embalagens plásticas. O rendimento da produção foi calculado por gravimetria e os valores expressos em g.L⁻¹ (grama por litro de meio fermentativo) (BRANDÃO *et al.*, 2009; NERY *et al.*, 2008).

4.2.7 Consumo de substrato e estudo preliminar da cinética do processo fermentativo do ponto otimizado

Foi realizado um acompanhamento do processo fermentativo, nas condições do ponto otimizado a uma temperatura de 28°C ± 2°C até 120 horas, para verificar a conversão de substrato (glicerina bruta residual do biodiesel) em produção de biomassa e de goma xantana, avaliando-se os rendimentos.

A biomassa e a produção da goma xantana foram determinadas por gravimetria conforme descrita na recuperação do polímero no item 4.2.7. O consumo de substrato foi medido pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência CLAE GPC-IR. A solução aquosa de glicerina bruta residual do biodiesel (2,0%, m/v) antes da fermentação e do caldo fermentativo foram analisados sob as mesmas condições cromatográficas para determinação da massa molar média ponderada (item 4. 2.8.3). O consumo do substrato (glicerina bruta) foi avaliado com base no percentual de redução das áreas dos picos dos substratos entre os tempos inicial e final da fermentação.

Foram realizados os cálculos dos seguintes parâmetros cinéticos até 120 horas de fermentação:

- Fator da conversão de substrato – biomassa:

$$Y_{X/S} = (X_f - X_i) / (S_i - S_f) \quad \text{Equação (4)}$$

- Fator da conversão de substrato – produto:

$$Y_{P/S} = (P_f - P_i) / (S_i - S_f) \quad \text{Equação (5)}$$

- % Conversão do substrato em biomassa:

$$\text{Conversão S/X (\%)} = Y_{X/S} \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

- % Conversão do substrato em produto:

$$\text{Conversão S/P (\%)} = Y_{P/S} \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

Onde:

S_i = substrato medida no tempo t_i

S_f = substrato medida no tempo t_f

X_i = biomassa medida no tempo t_0

X_f = biomassa medida no tempo t_f

P_i = produto medida no tempo t_0

P_f = produto medida no tempo t_f

4.2.8 Caracterização das gomas xantana

4.2.8.1 Avaliação da viscosidade aparente

A viscosidade aparente das soluções aquosas das gomas xantana (0,5%, m/v) produzidas pelas cepas de *Xanthomonas* citadas no item 4.2.4.1 obtidas com os meios

fermentativos, controle (I) e alternativo (II) e (III) em shaker, foi determinada na taxa de cisalhamento de 25 s^{-1} a temperatura de 25°C . O equipamento utilizado foi o reômetro Haake Rheotest, com dispositivo de cilindros concêntricos, acoplado a um banho-maria.

Para o preparo das soluções aquosas de goma xantana, o biopolímero foi dissolvido em água destilada e as soluções para análise ocorreu sob agitação mecânica constante por aproximadamente 15 minutos em temperatura ambiente. As soluções diluídas foram mantidas em refrigeração a 4°C por 12 horas antes de se proceder às medições de viscosidade. Foi necessário para esse modelo de viscosímetro, 25 mL das soluções de goma xantana. Cada amostra foi transferida para o equipamento e aplicada uma velocidade de rotação variável aos eixos metálicos imersos no líquido.

Foram aplicados os dados de tensão cisalhante, medidos em diferentes taxas de deformação, ao modelo cinético de Ostwald-de Waele ou “*power-law*” (CHHABRA; RICHARDSON, 1999). Esse modelo de ajuste foi utilizado para a determinação do comportamento pseudoplástico das soluções de goma, caracterizado pela equação:

$$\eta = \tau / \dot{\gamma} = K.(\dot{\gamma})^{n-1} \quad (\text{Equação 8})$$

Onde K é o índice de consistência; n é o índice de fluxo; η é a viscosidade aparente; τ é a tensão de cisalhamento e $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento.

Os resultados foram expressos em gráficos da viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento e viscosidade aparente em função da temperatura e em diferentes concentrações de goma. As unidades de medidas utilizadas foram: mPa.s (cP) para a viscosidade aparente, 1/segundo (s^{-1}) para a taxa de cisalhamento e mPa para tensão de cisalhamento.

Foi avaliado também o comportamento da viscosidade aparente das soluções aquosas das gomas (0,5%, m/v) produzidas pelas cepas de *Xanthomonas* obtidas pelo meio fermentativo contendo a glicerina bruta residual do biodiesel (II) na taxa de cisalhamento de 25s^{-1} a 1000s^{-1} .

Para as cepas de *Xanthomonas* selecionadas quanto a maiores produção e viscosidade aparente do biopolímero, foi estudado as seguintes influências no comportamento da viscosidade aparente:

- Influência da temperatura (25°C , 45°C , 65°C e 85°C);
- Influência da taxa de cisalhamento de 25s^{-1} a 1000s^{-1} ;

- Influência de diferentes concentrações de goma xantana (0,5 a 2,0%, m/v).

Os índices K e n foram calculados segundo a equação 8 para o estudo da pseudoplasticidade das gomas xantana e sua aplicação na Recuperação Avançada de Petróleo (EOR).

4.2.8.2 Análise Térmica

As curvas termogravimétricas das gomas xantana obtidas nas condições do ponto otimizado em bioreator 4,5 L foram obtidas pela técnica de termogravimetria (TGA). Para isso foi utilizada uma massa de aproximadamente 7,0 mg das xantanas, entre 0 a 400°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ em atmosfera dinâmica de gás inerte com vazão média de 20 mL.min⁻¹. Os suportes das amostras foram cadinhos de alumínio. As curvas de DTG, correspondentes à derivada primeira das curvas de TGA foram usadas para determinar os intervalos de temperatura (°C) e perda de massa (%) correspondente às percentagens de desidratação e decomposição de material orgânico. O programa utilizado para a determinação dessas curvas foi obtida com o auxílio do Software Pyris Manager.

4.2.8.3 Massa molar média ponderada

A massa molar média ponderada (MM) da goma xantana obtida nas condições do ponto otimizado em bioreator 4,5 L foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando as colunas Shodex SB 803, 804, 805, 806 conectadas em série para abranger um faixa maior de MM. Essas colunas estão acoplados a um detector de índice de refração (GPC-IR). A fase móvel foi uma solução aquosa de nitrato de sódio (0,5%) a um fluxo de 1,0 mL/minuto. Foram injetados 80µL nas mesmas condições cromatográficas das soluções aquosas de padrões de dextrana (American Polymer Standards) de diferentes MM (102.000, 207.200, 431.800, 655.200, 759.400, 1.360.000, 2.025.000, 2.800.000, 34.500.000 e 5.900.000 Da). Foram utilizados como amostras um padrão de goma xantana (comercial da Carboflex) e as gomas xantana produzidas a partir da fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel e da sacarose. As soluções foram armazenadas em geladeira por 12h para hidratação completa do polissacarídeo. Os MM (s) das gomas xantana foram determinados através de uma curva de calibração do log MM versus o tempo de retenção média ponderada (Tr) construída com os padrões de dextrana.

4.2.8.4 Composição monomérica da goma xantana

Os métodos para determinação de açúcares e ácidos urônicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram adaptados de Druzian (2000).

4.2.8.4.1 Determinação de açúcares

Para determinação de açúcares em amostras de goma xantana foi utilizado por CLAE com detector de índice de refração (IR), com uma pré-coluna Polypore Ca (30 mm x 4,6 mm x 10 µm) seguida de uma coluna Polypore Ca (220 mm x 4,6 mm x 10 µm). As colunas foram acondicionadas em um forno a temperatura de 80°C. A fase móvel utilizada foi água grau cromatográfico sob um fluxo de 0,1 mL/min. O volume de injeção foi de 5 µL.

A identificação foi realizada por comparação de tempo de retenção (Tr) entre os picos de padrões de glicose e manose e das amostras de goma hidrolisada. A quantificação foi obtida por padrão externo, utilizando soluções aquosas dos padrões de glicose (0,1mg/L a 1,1 mg/L) e manose (0,1mg/L a 1,1 mg/L) para a obtenção das curvas de calibração.

4.2.8.4.2 Determinação de ácidos urônicos

Para a determinação dos ácidos urônicos das xantanas, foi utilizado um sistema CLAE-UV, utilizando uma pré-coluna Polypore H (30 mm x 4,6 mm x 10 µm) seguida de uma coluna Polypore H (220 mm x 4,6 mm x 10 µm). As colunas foram acondicionadas em um forno a temperatura de 50°C. A fase móvel utilizada foi uma solução aquosa de H₂SO₄ com pH 1,9 sob um fluxo de 0,4 mL/min. O volume de injeção foi de 10 µL. O detector utilizado foi o Ultravioleta (UV) em um comprimento de onda de 195 nm.

A identificação foi realizada por comparação do tempo de retenção (Tr) entre os picos dos padrões dos ácidos glucurônico e pirúvico e das amostras de goma hidrolisada. A quantificação foi obtida por padronização externa, utilizando soluções aquosas dos padrões de ácido glucurônico (2,5mg/L a 100mg/L) e ácido pirúvico (2,0mg/L a 82mg/L) para a obtenção das curvas de calibração.

4.2.9 Comportamento reológico e aplicação das gomas na área petroquímica

Para verificar o comportamento reológico das gomas xantana obtida pela melhor cepa de *Xanthomonas*, obtidas nos meios fermentativos controle (I) e nos meios alternativos (II) e (III), foi avaliado a variação da viscosidade aparente das soluções aquosas da xantana em diferentes concentrações (0,5% a 2,0%) em função da taxa de cisalhamento de 25s^{-1} a 1000s^{-1} na temperatura de 25°C e 85°C .

Para a caracterização da pseudoplasticidade das xantanas foram calculados os índices de consistência (K) e de fluxo (n) conforme a equação 8 citado no item 4.2.8.1.

Para aplicação das gomas xantanas na Recuperação Avançada de Petróleo (EOR) foi determinada a viscosidade aparente na concentração da solução aquosa de xantana a 0,5% a 25°C na taxa de cisalhamento de 400s^{-1} e o índice de fluxo (n). A viscosidade e o índice de fluxo foram comparados com valores desejados segundo Shah e Ashtaputre (1999). A determinação da viscosidade aparente das xantanas foi descrita no item 4.2.8.1.

4.2.10 Goma xantana como viscosificante polimérico em fluido de perfuração

4.2.10.1 Avaliação da goma xantana em solução salina segundo Norma Petrobras

Para aplicação em fluidos de perfuração em poços de petróleo, o estudo da viscosidade é determinado segundo as normas da Petrobras (PETROBRAS, 2009; PETROBRAS, 2003), com a preparação do fluido base água composta por: solução aquosa de NaCl (30 g/500mL), CaCl_2 (0,1 g/500mL), MgCl_2 (0,04 g/500mL) e 2,15 g de goma xantana obtida da fermentação da glicerina bruta. Também foi preparado um fluido similar, porém com a goma xantana comercial como controle comparativo.

Antes do envelhecimento dos fluidos em estufa com células giratórias a 50°C por 16 horas, os fluidos foram transferidos para o recipiente do viscosímetro Fann 35 A, que apresenta uma combinação R1 B1 e mola de torção F1, sendo R1 o raio do cilindro externo e B1 o raio do cilindro interno do viscosímetro com valores de 1,8415 cm e 1,7245 cm respectivamente (AMORIM *et al.*, 2007). Neste equipamento, seis valores de torque foram lidos com taxas de cisalhamento variando de 5,1 a 1022 s^{-1} (PETROBRAS, 2003). O equipamento foi acionado na velocidade de 600 rpm (L_{600}) durante 2 min e efetuado a leitura. Logo após, a velocidade foi mudada para 300 rpm (L_{300}) e efetuada a leitura após 15 seg. Em

seguida, mudou-se a velocidade para 200 rpm (L_{200}) e esperou-se estabilizar para efetuar a leitura. O mesmo procedimento foi utilizado para as velocidades de 100 rpm (L_{100}), 6 rpm (L_6) e 3 rpm (L_3). Essas leituras reológicas foram também determinadas após o envelhecimento dos fluidos.

Para obtenção dos géis, agitou-se os fluidos após o envelhecimento na velocidade de 600 rpm durante 15 segundos e em seguida mudando a velocidade para 3 rpm, deixando os fluidos em repouso por 10 segundos (gel inicial ou gel 10 segundos ou G_0). Em seguida, para a obtenção do gel final, os fluidos foram deixados em repouso durante 10 minutos (gel final ou gel 10 minutos ou G_{10}) e 30 minutos (gel final ou gel 30 minutos ou G_{30}) e ambas leituras foram efetuadas na velocidade 3 rpm. Os parâmetros reológicos, K (índice de consistência) e n (índice de fluxo) foram analisados através do método mínimos quadrados segundo a lei de potência (equação 8).

4.2.10.2 Formulação e caracterização do fluido de perfuração base água composto de goma xantana e glicerina bruta

No estudo de reologia depois do rolamento em estufa com sistema giratório, como simulação na perfuração do poço, foram testadas as soluções das gomas xantana (fluidos 1 e 2) e soluções de xantana contendo glicerina bruta residual do biodiesel (fluidos 3 e 4), como mostrado da Tabela 8.

Tabela 8. Formulação dos fluidos base água de goma xantana preparados segundo a norma Petrobras (2003).

Fluido ¹	Aditivo
1	Goma xantana obtida da fermentação glicerina bruta
2	Goma xantana comercial
3	Goma xantana obtida da fermentação glicerina bruta + Glicerina bruta
4	Goma xantana comercial + Glicerina bruta

¹Fluido 1 = Água (500mL) + 30g NaCL, 0,1g CaCl₂, 0,04g MgCl₂ + 2,15g de Goma xantana obtida da fermentação da glicerina bruta.

Fluido 2 = Água (500mL) + 30g NaCL, 0,1g CaCl₂, 0,04g MgCl₂ + 2,15g de Goma xantana comercial.

Fluido 3 = Água (500mL) + 30g NaCL, 0,1g CaCl₂, 0,04g MgCl₂ + 1,07g de Goma xantana obtida da fermentação da glicerina bruta + 1,07 de Glicerina bruta.

Fluido 4 = Água (500mL) + 30g NaCL, 0,1g CaCl₂, 0,04g MgCl₂ + 1,07g de Goma xantana comercial + 1,07g de Glicerina bruta.

Posteriormente foram preparados 9 fluidos variando-se as concentrações das gomas (0,2 a 0,4%) e glicerina bruta como lubrificante (1,0 a 4%), e mantendo-se constante a

concentração de todos os aditivos segundo procedimento do Manual de fluidos base água (CARBOFLEX, 2011) conforme a Tabela 9. Para a preparação dos fluidos, inicialmente, a 350 mL de água doce foram misturados os polímeros em pó (goma xantana, amido e CMC) por 10 minutos com agitador mecânico da marca Hamilton Beach, modelo 936 na velocidade de 13.000 rpm. Em seguida, foram adicionados os demais componentes do fluido (Tabela 9) e a velocidade do agitador foi aumentada para 17.000 rpm e mantida por 20 minutos. A seguir, os fluidos foram levados à estufa de rolamento em célula rotativa por 16 horas à 200°F (93,3°C).

Logo após o envelhecimento dos fluidos a 93,3°C foi realizado o estudo reológico dos mesmos, sendo os fluidos transferidos para o recipiente do viscosímetro Fann 35 A. As respostas das leituras reológicas, L_{600} - L_{300} - L_{200} - L_{100} - L_6 - L_3 , e os géis (G_0 e G_{10}) como variável dependente foram determinadas similar ao item 4.2.7.1. Os comportamentos dos fluidos de perfuração foram obtidos com o auxílio do tratamento matemático utilizando as leituras reológicas (PETROBRAS, 2003).

Tabela 9. Composição dos fluidos de perfuração base água contendo diferentes quantidades de gomas xantana como viscosificante e glicerina bruta como lubrificante.

Componentes	Fluidos								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Água (mL)	318,0	318,0	318,0	318,0	318,0	318,0	318,0	318,0	318,0
Goma xantana (% m/m)	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4
Oxido de magnésio (g)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Cloreto de potássio II (g)	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Amido normal (g)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
CMC LV (g)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Inibidor catiônico (g)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Bactericida (g)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Antiespumante (gotas)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Glicerina bruta (% m/m)	1,0	2,5	4,0	1,0	2,5	4,0	1,0	2,5	4,0
Carbonato de cálcio fino (g)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Baritina (Sulfato de Bário, g)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

As respostas do planejamento estatístico entre formulação do fluido aplicado na composição dos fluidos apresentados na Tabela 9 foi tratado estatisticamente quanto à diferença significativa ($p < 0,05$).

Com os dados das leituras reológicas obtidas no viscosímetro, calculou-se também como respostas a viscosidade aparente (VA) e a viscosidade plástica (VP) segundo a norma da Petrobras (2009) e Medeiros *et al.* (2008), utilizando as equações 9 e 10:

- Viscosidade aparente (VA): $VA = L_{600} / 2$ (cP) Equação (9)

- Viscosidade plástica (VP): $VP = L_{600} - L_{300}$ (cP) Equação (10)

Para a resposta do volume de filtrado, os fluidos foram agitados durante 1 minuto, em um agitador mecânico Hamilton Beach, na velocidade de 17.000 rpm. Em seguida, os fluidos foram transferidos para o recipiente do filtro-prensa API, com aplicação de uma pressão da ordem de 7,0 kgf/cm² (100 psi). Após 30 min, o filtrado foi lido e obteve-se a medida do volume do filtrado, expresso em mL (MEDEIROS *et al.*, 2008).

O coeficiente de lubricidade dos fluidos foi a resposta determinada em lubricímetro OFITE (EP-Lubricity Tester). Para tanto, agitou-se o fluido por 5 minutos em um agitador mecânico Hamilton Beach, na velocidade de 17.000 rpm. Em seguida, o fluido foi transferido para o recipiente do equipamento, com torque inicial zero e uma velocidade de 60 rpm; aplicou-se lentamente uma força de 150 lbf/in² (equivalente a uma pressão de 34.500 a 69.000 kPa) durante 5 minutos, efetuando-se a leitura do torque exercido pelo fluido (MEDEIROS *et al.*, 2008). Com a leitura obtida pelo torque da água, calculou-se o fator de correção (FC) e o coeficiente de lubricidade (CL), conforme as equações 11 e 12:

- Fator de correção: $FC = 34,0 / \text{Leitura}_{\text{água}}$ Equação (11)

- Coeficiente de lubricidade: $CL = FC \cdot \text{Leitura}_{\text{obtida}} / 100$ Equação (12)

4.2.11 Tratamento estatístico dos dados experimentais

As variáveis dos planejamentos estatísticos descrito nas Tabelas 6 e 7 foram aplicadas o diagrama de Pareto e superfície de resposta segundo a ANOVA 95% ao nível de significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). O tratamento dos dados foi realizado utilizando-se o software Statistica 7.0.

.As diferenças das respostas dos parâmetros das Tabelas 8 e 9 foram avaliados pelo método Tukey com significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$ ou $> 95\%$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados de produção e caracterização da goma xantana. Primeiramente, foram também caracterizados os substratos fermentados para produção de goma xantana. Foram testadas doze cepas de *Xanthomonas*, utilizando a sacarose (meio controle), glicerina comercial como fonte de carbono e glicerina bruta residual do biodiesel substrato. Todos os meios foram minimamente suplementados com 0,01% de uréia, 0,1% de K_2HPO_4 e fermentados em *shaker*. As cepas de *Xanthomonas* foram selecionadas quanto à produção de goma xantana e viscosidade aparente do polímero.

Com uma das cepas selecionada foi avaliado o efeito da variação da concentração da glicerina bruta e do inóculo na produção e na viscosidade aparente da goma xantana, nas condições fermentativas em *shaker*, através de um planejamento estatístico fracionado em estrela DCCR 2² com 4 pontos axiais e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. Também ao passar da fermentação em *shaker* para bioreator (4,5L) foi avaliada a produção e a viscosidade aparente dessas xantanas variando a agitação do meio fermentativo.

Com a cepa mais produtiva, foi avaliado a mudança da fermentação em *shaker* a bioreator, com variação da aeração e agitação em bioreator de 4,5L, através da utilização de planejamento estatístico fracionado em estrela DCCR 2² com 4 pontos axiais e triplicata do ponto central, totalizando também 11 ensaios fermentativos.

A goma xantana resultante do ponto otimizado no planejamento em bioreator de 4,5L foi caracterizada quanto à viscosidade aparente, análise térmica, peso molecular e composição monomérica do polímero. Também, foi realizado o estudo preliminar da cinética quanto ao consumo de glicerina bruta e formação de goma xantana no ponto otimizado.

As gomas xantana produzidas a partir da fermentação da sacarose e glicerina bruta e glicerina comercial PA foram avaliadas quanto ao comportamento reológico para aplicação na Recuperação Avançada de Petróleo (EOR).

Um novo fluido de perfuração contendo goma xantana comercial e a obtida com o substrato alternativo e com glicerina bruta como lubrificante foi desenvolvido e avaliado quanto aos parâmetros reológicos estabelecidos pela Norma Petrobras e Companhia de Serviços de Fluido (Carboflex).

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS ALTERNATIVOS

Os valores médios da caracterização físico-química das amostras de glicerina bruta residual do biodiesel e da glicerina comercial PA, utilizadas como substratos alternativos para obtenção de goma xantana, são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Caracterização físico-química da glicerina bruta residual do biodiesel e da glicerina comercial utilizadas na etapa de fermentação para produção de goma xantana.

Parâmetros	Glicerina bruta (%)	Glicerina comercial (%)
Voláteis a 105°C	53,50 ± 0,01	12,13 ± 0,01
Cinzas	3,40 ± 0,01	0,00 ± 0,01
Lipídios totais	6,70 ± 0,02	1,03 ± 0,03
Proteína bruta	2,71 ± 0,03	0,01 ± 0,01
Glicerina	33,69 ± 0,02	86,83 ± 0,02

Ambas as amostras de glicerina possuem teores consideráveis de carboidratos, entretanto a glicerina bruta apresenta teores consideráveis de proteína da oleaginosa, lipídios (triglicerídeos não hidrolisados, ácidos graxos livres), além de minerais (Tabela 10). Portanto, sua utilização como meio fermentativo é viável tanto para a reprodução das bactérias *Xanthomonas* como para a biossíntese do polímero de goma xantana.

Os meios fermentativos consistem geralmente de 2 a 4% de glicose ou sacarose como fonte de carbono, 0,05 a 0,1% de nitrogênio, fósforo e traços de outros minerais e resultam numa conversão de 50 a 70% da fonte de carbono em goma xantana (ROTTAVA, 2005). Em geral, os processos industriais procuram utilizar meios que disponibilizem condições tanto para o crescimento como para o acúmulo de goma (TEIXEIRA, 2005). Neste contexto, existe a necessidade de suplementação de nitrogênio livre e fósforo no meio fermentativo composto de glicerina residual do biodiesel (BRANDÃO *et al.*, 2009).

A relação entre a fonte de carbono (C) e a fonte de nitrogênio (N) da glicerina bruta é de aproximadamente 15:1, correspondendo a 0,54 g de glicerina, 0,10 g de lipídios e 0,04 g de proteínas em 80 mL de meio de fermentação (Tabela 9). A composição química da glicerina bruta encontrada está em concordância com as condições fermentativas que indicam a concentração de nitrogênio não limitante que é requerida para um rápido crescimento celular, enquanto elevado teor de carbono e baixo teor de nitrogênio são essenciais para a produção de polímero com propriedades reológicas adequadas (SUTHERLAND, 1996). Enquanto, na

composição química da glicerina comercial PA apresentou 1,39 g de glicerina e 0,016 g de lipídios, e nada de proteínas no meio fermentativo, necessitando de nutrientes essenciais para a produção de xantana. Geralmente, os processos industriais são conduzidos sob condições escolhidas para otimizar o crescimento celular e a produção de goma de xantana (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

5.2 SELEÇÃO DE CEPAS DE *XANTHOMONAS*

As doze cepas de *Xanthomonas* depois de repicadas e incubadas por um período de 48 horas a 28°C, foram novamente incubadas sob agitação de 180 rpm a 28°C por 24 horas, e transferidos para 80 mL dos meios, controle (sacarose) e alternativos (glicerina bruta e glicerina comercial), e fermentados por 120 horas a 28°C numa agitação de 250 rpm em agitador orbital (shaker). Após a fermentação, as gomas xantanas foram recuperadas através da precipitação com álcool etílico e depois secas. A Figura 12 apresenta o aspecto das gomas produzidas por uma das cepas, a *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, a partir da fermentação de sacarose e de glicerina bruta.

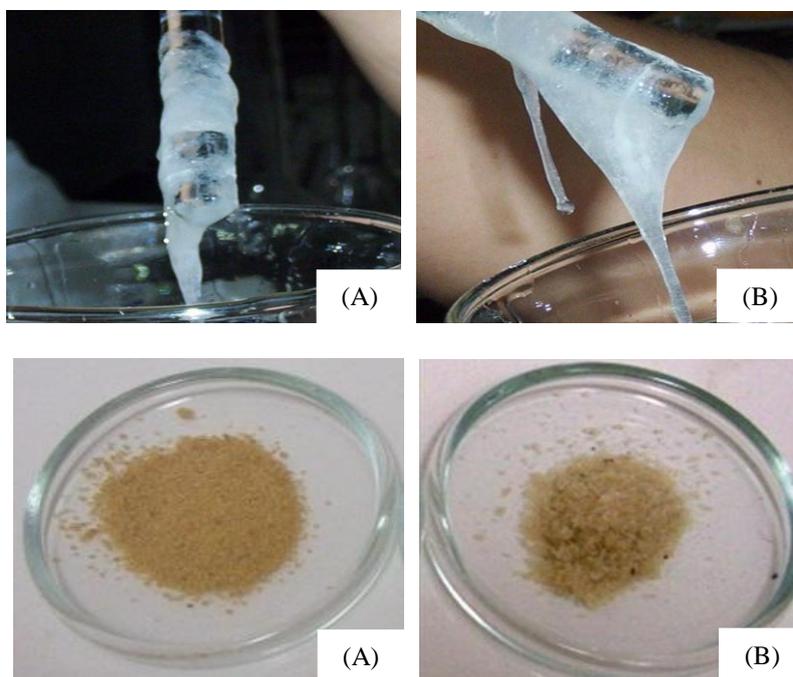


Figura 12. Aspectos das gomas xantana sintetizadas pela cepa 2103 por fermentação de sacarose (A) e de glicerina bruta (B) depois de precipitadas com álcool etílico, secas e trituradas.

Observa-se que as gomas xantana obtidas com a sacarose e com a glicerina bruta, após precipitação com álcool etílico, não apresentaram pigmentação, e depois de secas apresentaram pigmentação amarelada (Figura 11). Rottava (2005) obteve gomas xantana sem pigmentação depois de extraídas com álcool etílico, mesmo quando as linhagens de *Xanthomonas* utilizadas possuíam coloração amarelada e alerta sobre o processo de secagem dos polímeros, pois a secagem rápida a altas temperaturas pode resultar em um produto com baixa solubilidade e com baixa viscosidade. As condições de secagem devem ser tais que evitem a degradação química, coloração excessiva ou mudanças na solubilidade do produto (MARGARITIS; PACE, 1985).

A Tabela 11 apresenta as médias de produções das gomas xantana obtidas a partir da fermentação da sacarose e das glicerinas bruta e comercial em shaker, assim como, as respectivas viscosidades aparentes (0,5% de xantana a 25°C numa taxa de cisalhamento de 25s⁻¹). As massas celulares separadas do caldo fermentativo por centrifugação, em todos os casos foram menores que 1,0 g.L⁻¹, independente da cepa e do substrato fermentado.

Das sete cepas que bioconverteram glicerina bruta e comercial a goma xantana (58% do total de cepas testadas), cinco são *Xanthomonas campestris pv. campestris*, uma é *Xanthomonas axonopodis pv. manihotis*, e uma é *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae*, indicando que possuem maior capacidade de adaptação a diferentes meios de cultivo, especialmente das cepas do primeiro gênero (Tabela 11). Segundo Nitschke e Thomas (1995), a maior parte das pesquisas de produção de goma xantana tem sido realizada com cepas do gênero *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

A produção de goma xantana pelas diferentes cepas de *Xanthomonas* variou de 0,26 a 5,5 g.L⁻¹, quando foi utilizado a glicerina bruta no meio fermentativo, enquanto que a partir da sacarose (controle) variou de 1,27 a 4,21 g.L⁻¹. Para o meio contendo a glicerina purificada variou de 0,24 a 6,78 g.L⁻¹ (Tabela 10).

Na Tabela 11, observa-se que a maior produção de goma xantana aliada à maior viscosidade aparente foi obtida por fermentação da glicerina bruta com as cepas 2103, 1182, e 356, com 5,5±0,10; 1,80±0,01 e 1,24±0,10 g.L⁻¹, respectivamente.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Tabela 11. Produção de goma xantana (g.L^{-1}) em meio fermentativo controle e alternativos com diferentes cepas nativas de *Xanthomonas* a 28°C, 250rpm por 120h (*shaker*) e as respectivas viscosidades aparentes.

Cepas <i>Xanthomonas</i>	Produção (g.L^{-1})			Viscosidade aparente (mPa.s) ¹		
	Sacarose (I)	Glicerina bruta (II)	Glicerina comercial (III)	Sacarose (I)	Glicerina bruta (II)	Glicerina comercial (III)
<i>X. campestris mangiferaeindicae</i> 2103	4,21 ± 0,20	5,5 ± 0,10	6,0-6,78 ± 0,10	61,03	69,50	115,34
<i>X. axonopodis pv manihotis</i> 356	1,27 ± 0,08	1,24 ± 0,10	0,44 ± 0,12	59,65	67,16	42,38
<i>X. campestris pv campestris</i> 472	2,39 ± 0,10	0,39 ± 0,10	1,17 ± 0,04	76,27	46,76	66,68
<i>X. campestris pv campestris</i> 545	1,52 ± 0,06	0,14 ± 0,11	0,24 ± 0,04	48,94	19,32	77,28
<i>X. campestris pv campestris</i> 247	*	0,69 ± 0,08	1,41 ± 0,14	*	51,73	111,56
<i>X. campestris pv campestris</i> 629	1,65 ± 0,09	0,79 ± 0,26	1,49 ± 0,13	86,28	58,34	87,08
<i>X. campestris pv campestris</i> 607	*	0,26 ± 0,02	2,27 ± 0,10	*	23,55	62,95
<i>X. campestris pv campestris</i> 1078	1,68 ± 0,10	*	*	106,77	*	*
<i>X. campestris pv cordiae</i> 510	1,95 ± 0,10	*	*	68,15	*	*
<i>X. campestris pv campestris</i> 729	*	*	*	*	*	*
<i>X. melonis</i> 68	*	*	*	*	*	*
<i>X. axonopodis pv. manihotis</i> 290	*	*	*	*	*	*

* não houve formação de goma xantana.

Meio (I): 2,0% de sacarose, 0,01% de uréia e 0,1% de K_2HPO_4 .

Meio (II): 2,0% de glicerina bruta residual, 0,01% de Uréia e 0,1% de K_2HPO_4 .

Meio (III): 2,0% de glicerina comercial purificada, 0,01% de Uréia e 0,1% de K_2HPO_4 .

¹Concentração de 0,5% de goma xantana a 25°C numa taxa de cisalhamento de 25s^{-1} .

As cepas 2103 (*X. campestris mangiferaeindicae*) e 356 (*X. axonopodis pv manihotis*) se destacaram por apresentar as maiores produções aliadas a maiores viscosidades aparente do polímero com 1,24 a 5,5 g.L⁻¹ de goma xantana, e 67,16 a 69,50 mPa.s, respectivamente (Tabela 11). Observa-se que no caso da cepa 2103 com o substrato alternativo foi possível obter uma produção de goma xantana aproximadamente 1,3 vezes superior à obtida com sacarose, confirmando as constatações de Souza (1999) e Antunes *et al.* (2000), que relatam que a produtividade é influenciada não somente pela linhagem do microrganismo, como também pelo meio de fermentação.

Padilha *et al.* (2010) relatam uma produção de 0,16 g.L⁻¹ e 0,19 g.L⁻¹ de xantana com as cepas de *X. sp* C1 e C2, respectivamente, à 180 rpm a 28°C por 96 horas de fermentação de 4,0% de glicerina bruta residual do biodiesel, obtendo viscosidade aparente de 140 mPa.s para a cepa *X. sp* C1 na concentração de 3,0%, enquanto a goma xantana da cepa *X. sp* C2 não obteve uma viscosidade considerável. Esses resultados mostraram que a glicerina bruta, como única fonte de carbono, não foi adequada para produção de xantana. Enquanto Ramos (2011) relata uma produção máxima de 4,85 g.L⁻¹ de xantana após 72 horas à 180 rpm/30°C com viscosidade aparente entre 92 e 492 mPa.s (1% de xantana a 25°C) com a cepa *X. campestris* XC02 a partir do uso da água produzida na indústria do Petróleo.

Dentre os poucos estudos utilizando resíduos industriais como substratos alternativos para a produção de goma xantana, relata-se a produção de 7,48 g.L⁻¹ de goma em 48 horas à 120rpm e 28°C (ARAÚJO *et al.*, 2005) e de 15,1 g.L⁻¹ de goma em 30 horas à 800rpm e 28°C (FARIA, 2005) ambos utilizando caldo de cana e sintetizadas pela cepa *X. campestris pv. campestris* NRRL B-1459; e de 11,5 g.L⁻¹ de goma em 72 horas de fermentação a 30°C pela *X. campestris* E-NRC-3 usando melão de cana de açúcar (EL-SALAM, 1994). A produção de goma xantana a partir de resíduos da mandioca foi realizada por Soccol (2002) com rendimento de 14,8 g.L⁻¹ do biopolímero, em 96 horas a 28°C à 160rpm com a cepa *X. campestris* – LPB 01. Nery (2007) relata 6,7 g.L⁻¹, 5,6 g.L⁻¹ e 21,91 g.L⁻¹ de goma xantana por fermentação de casca de coco verde, casca de maracujá e soro de leite, respectivamente, por *X. campestris mangiferaeindicae*, em 120 horas a 28°C à 250rpm, enquanto Druzian e Pagliarini (2007) relata uma produção de 45 g.L⁻¹ de goma xantana à 150 rpm/28°C com a cepa *X. campestris pv maniothis* utilizando resíduo de suco de maçã.

Na Figura 13 foi observado que à medida que a taxa de cisalhamento aumenta, as viscosidades aparentes das sete gomas xantana decrescem, caracterizando o comportamento pseudoplástico dos biopolímeros produzidos a partir da glicerina bruta com todas as cepas

produtoras, comportamento típico das soluções aquosas de goma xantana (SANDFORD, 1979; KATZBAUER, 1998; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

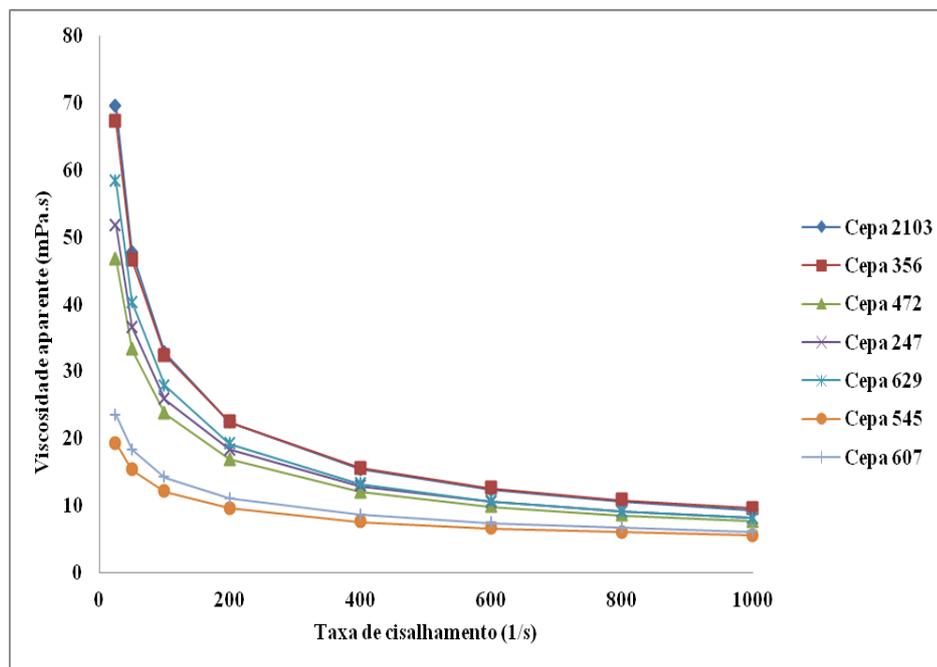


Figura 13. Comportamento da viscosidade aparente das soluções aquosas a 0,5% de gomas xantana obtidas por diversas cepas de *Xanthomonas* a partir de glicerina bruta, fixando-se a temperatura em 25°C e variando-se as cepas e a taxa de cisalhamento de 25 a 1000 s⁻¹.

A viscosidade da goma xantana é dependente da composição química do polímero. Sandford *et al.* (1977) concluíram que as xantanas com alto conteúdo de piruvato (4,0-4,8%) são mais viscosas do que as com baixo conteúdo (2,5-3,0%). Segundo Slonecker e Jeanes (1962) apud Pinto (2005) a remoção dos grupos acetil da xantana sintetizado pela *Xanthomonas campestris* pv *campestris* cepa NRRL B-1459 promove um melhoramento das suas propriedades físicas.

Existem vários processos e produtos que utilizam a glicerina para a produção de compostos orgânicos ou outros derivados da indústria química ou petroquímica como a patente depositada no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial) BR0413519-9 (TROY *et al.*, 2005), e de outros países WO2006111810 (SIANO *et al.* 2006), WO2006045584 (HARICHIAN *et al.*, 2006) e WO2006136336 (BUB *et al.*, 2006). As patentes US2005095336 (MALETTO PETE, 2005) e JP2005179255 (MATSUDA *et al.*, 2005) são algumas das que protegem a utilização de formulações contendo glicerina com goma xantana para aplicação em processos alimentícios, farmacêutico e afins, no entanto, apresentam as desvantagens quanto ao custo destes produtos por utilizarem um complexo de

gomas e reagentes orgânicos ou inorgânicos. No entanto, nenhuma delas propõe o uso da glicerina bruta ou comercial como substrato alternativo no meio fermentescível para a produção de biopolímero tipo goma xantana. Considerando não haver anterioridade na base de patentes e de artigos foi depositada a PI0705950-7 pelos inventores Brandão; Nery; Druzian (2009), em anexo, visando proteger a utilização de substratos alternativos contendo glicerina bruta do biodiesel ou glicerina purificada ou comercial, e de baixo custo quando comparado ao processo industrial de bioconversão de sacarose ou glicose, para o processo fermentativo de produção de goma xantana.

5.2.1 Comportamento reológico das gomas xantana produzidas pelas cepas 356 e 2103 em *Shaker*

Para verificar a qualidade das gomas produzidas pelas cepas 356 e 2103 a partir da fermentação do meio controle e do meio composto de glicerina bruta do biodiesel foi analisada a viscosidade aparente das soluções aquosas do polímero em função da variação da temperatura em diferentes taxas de cisalhamento. As Figuras 14 (A e B) apresentam a influência direta da variação da temperatura na viscosidade aparente em diferentes meios fermentativos.

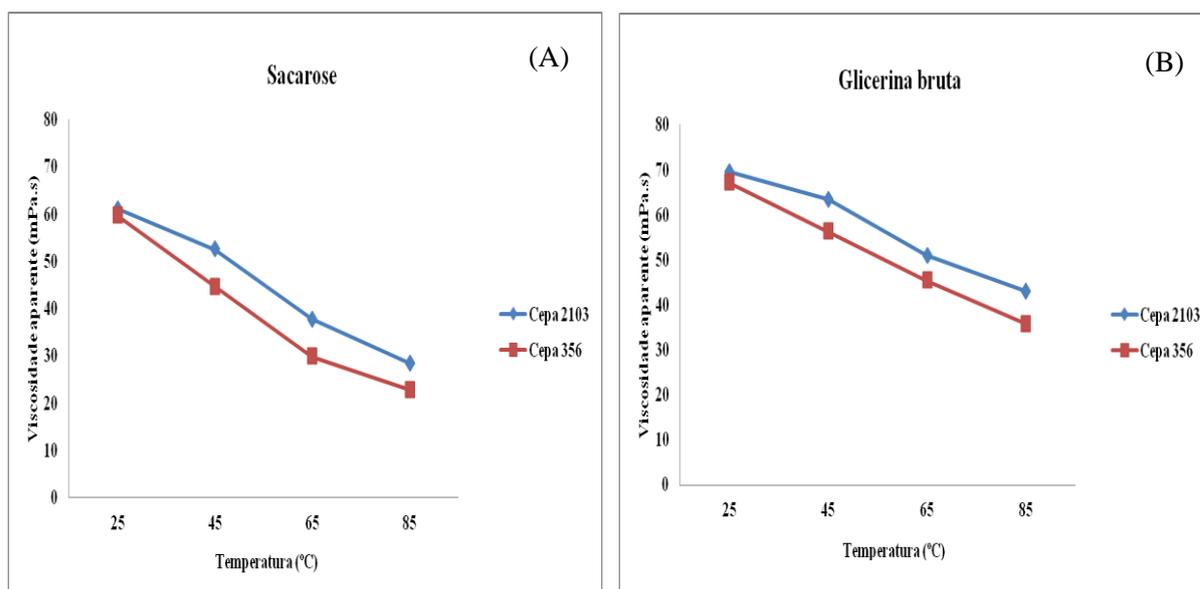


Figura 14. Variação da viscosidade aparente das soluções aquosas a 0,5% de gomas xantana obtidas por fermentação de sacarose (A) e glicerina bruta (B) pelas cepas de *Xanthomonas* fixando-se a taxa de cisalhamento em 25s^{-1} em diferentes temperaturas.

Para todas as gomas xantana produzidas da fermentação do meio contendo sacarose e glicerina bruta, a viscosidade foi influenciada pela temperatura, com diferenças mais pronunciadas entre os valores para diferentes cepas em temperaturas mais altas. Através da Figura 14, observa-se uma diminuição da viscosidade na medida em que houve um incremento na temperatura e o perfil do comportamento dos gráficos de viscosidade das cepas foram semelhantes, sendo que a cepa 2103 produziu goma xantana com viscosidade aparente superior com os diferentes meios fermentativos.

O aumento da temperatura faz com que as soluções de xantana mudem de uma transição de conformação de uma estrutura ordenada rígida para um emaranhado desordenado, especialmente quando aquecidas acima do ponto de derretimento (MEDEIROS *et al.*, 2000). Os grupos acetil e piruvil, presentes na estrutura do biopolímero, têm uma influência notável nessa conformação estrutural, e segundo Sutherland (1996), os grupos de acetil estabilizam a forma ordenada, enquanto o piruvato causa o efeito oposto.

As soluções de xantana mostram um comportamento pseudoplástico, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento do fluido, e esta é uma característica muito desejada em diversas situações (KALOGIANNIS *et al.*, 2003). A Figura 15 mostra esse tipo de comportamento, onde há variação da viscosidade aparente das xantanas obtidas por fermentação da sacarose e glicerina bruta com a influência da variação da taxa de cisalhamento.

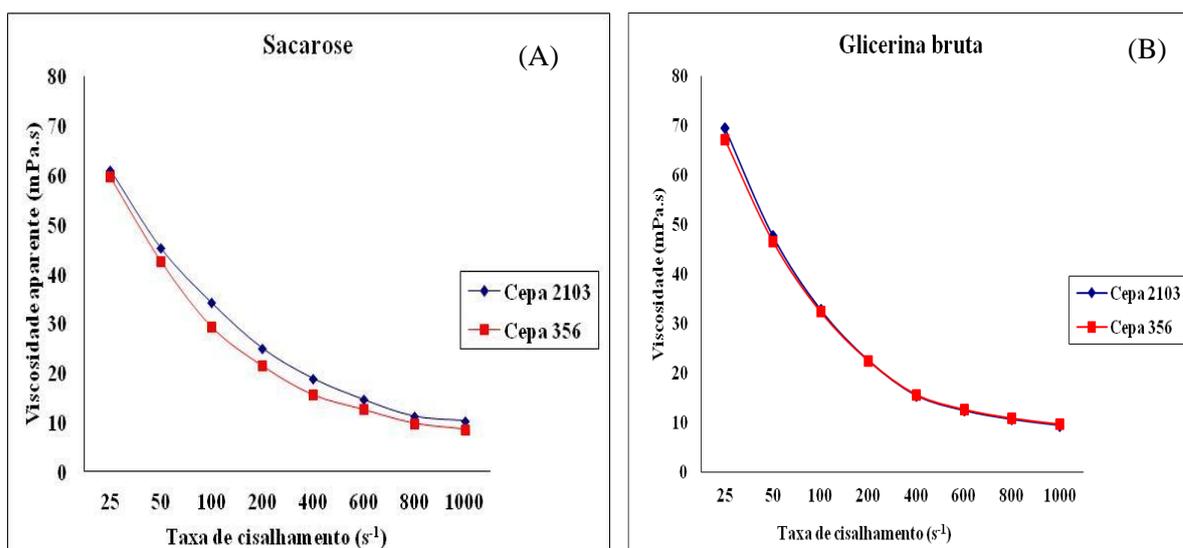


Figura 15. Variação da viscosidade aparente das soluções aquosas a 0,5% das gomas xantana obtidas por fermentação de sacarose (A) e glicerina bruta (B) em diferentes cepas de *Xanthomonas* na temperatura de 25°C em diferentes taxas de cisalhamento.

A xantana sintetizada pela cepa *X. campestris mangiferaeindicae* 2103 no meio fermentativo controle (sacarose) apresentou viscosidades aparentes entre 61,03 a 10,26 mPa.s nas taxas de cisalhamento de 25 s^{-1} e 1000 s^{-1} , respectivamente, enquanto a goma xantana obtida por meio fermentativo alternativo (glicerina bruta), as viscosidades variaram de 69,57 a 9,39 mPa.s. A cepa *X. axonopodis* pv *manihotis* 356 produziu gomas com viscosidades de 59,65 a 8,62 mPa.s nas taxas de cisalhamento de 25 s^{-1} e 1000 s^{-1} , respectivamente, para o meio fermentativo controle e 67,16 a 9,62 mPa.s (Figura 15), entretanto, ambos perfis tiveram o mesmo comportamento pseudoplástico. Na indústria petrolífera, a pseudoplasticidade de suas soluções pode fornecer baixa viscosidade à broca de perfuração onde a taxa de cisalhamento é alta e alta viscosidade no espaço anular onde o cisalhamento é baixo (THOMAS, 2001; NAVARRO, 1997).

5.2.2 Influência da concentração da goma, temperatura e taxa de cisalhamento no comportamento reológico da xantana sintetizada pela cepa 2103 em shaker e aplicação na área petroquímica

As Figuras 16, 17 e 18 mostram o comportamento pseudoplástico das soluções de goma xantana obtida após 120h de fermentação da sacarose (substrato controle) e glicerina bruta e comercial (substratos alternativos), respectivamente, pela cepa de *Xanthomonas* 2103.

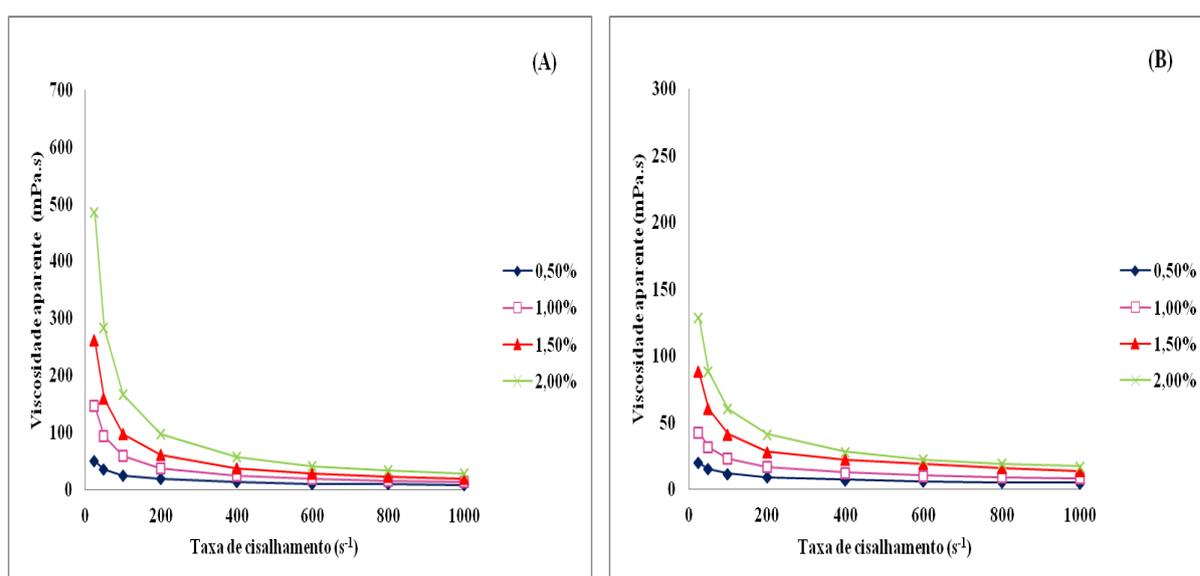


Figura 16. Variação da viscosidade aparente da goma xantana produzida pela cepa 2103 a partir da sacarose em função da taxa de cisalhamento de 25 s^{-1} a 1000 s^{-1} fixando a temperatura em 25°C (A) e 85°C (B) e em diferentes concentrações.

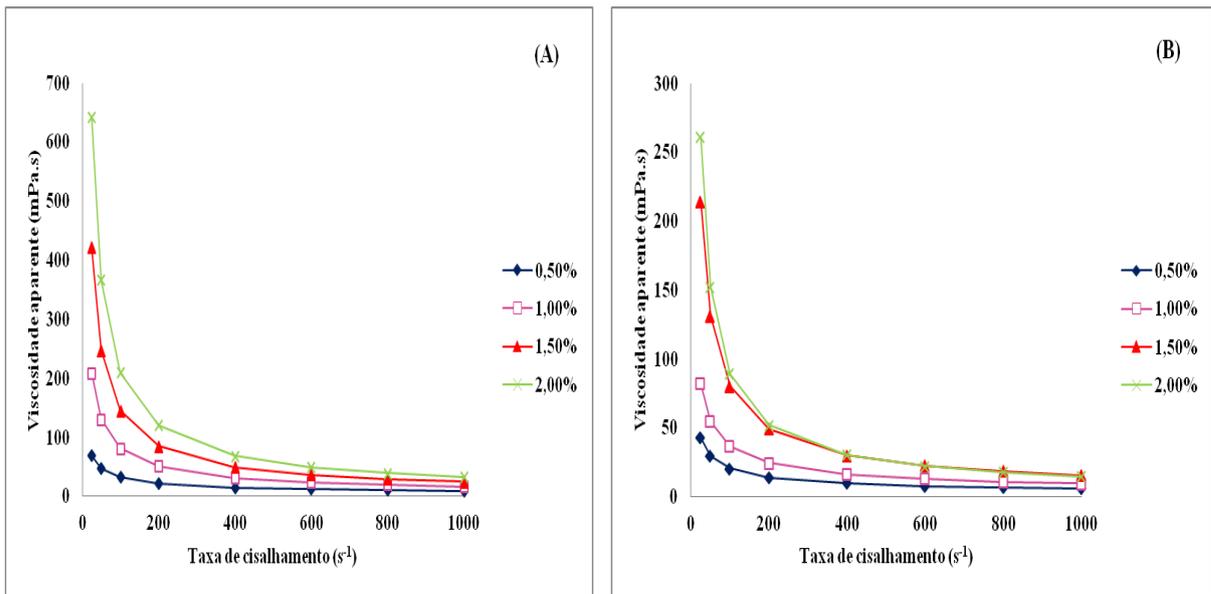


Figura 17. Variação da viscosidade aparente da goma xantana produzida pela cepa 2103 a partir da glicerina bruta em função da taxa de cisalhamento de $25s^{-1}$ a $1000s^{-1}$ fixando a temperatura em 25°C (A) e 85°C (B) e em diferentes concentrações.

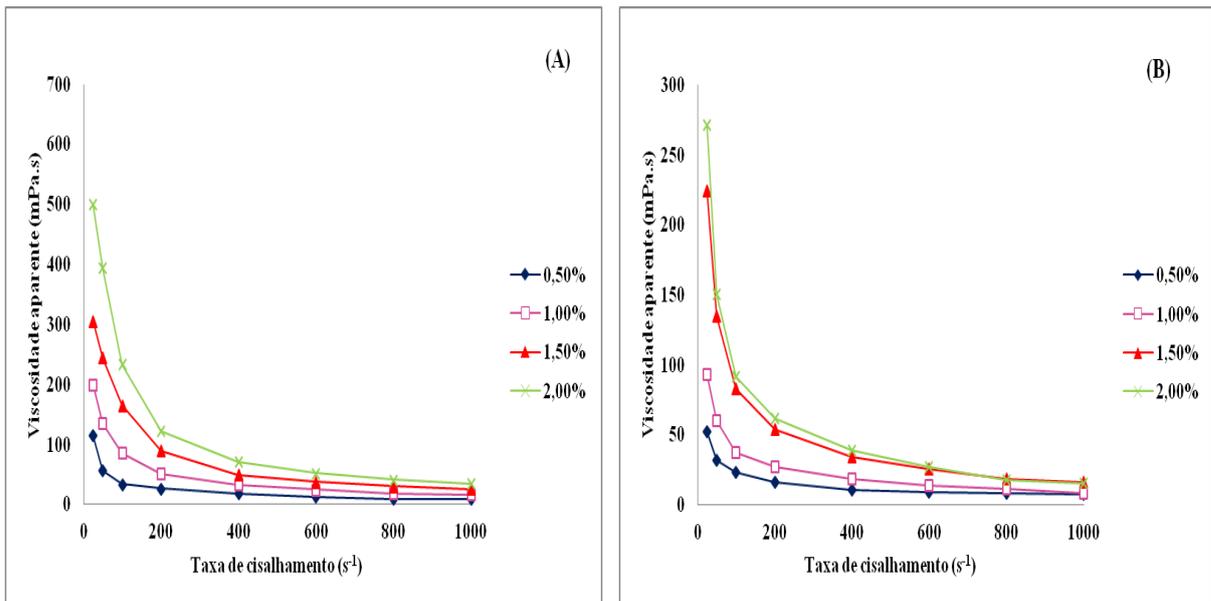


Figura 18. Variação da viscosidade aparente da goma xantana produzida pela cepa 2103 a partir da glicerina comercial em função da taxa de cisalhamento de $25s^{-1}$ a $1000s^{-1}$ fixando a temperatura em 25°C (A) e 85°C (B) e em diferentes concentrações.

Os comportamentos da variação da viscosidade aparente mostrados nas Tabelas 16, 17 e 18 evidenciam a pseudoplasticidade em todas as xantanas, isto é, a viscosidade aparente decresce com o aumento da taxa de cisalhamento. Comportamento já esperado em soluções

poliméricas de polissacarídeos microbianos (PADILHA, 2003; SCAMPARINI; LUVIELMO, 2009).

Na indústria petrolífera, a pseudoplasticidade de suas soluções pode fornecer baixa viscosidade à broca de perfuração onde a taxa de cisalhamento é alta e alta viscosidade no espaço anular onde o cisalhamento é baixo (BYONG, 1996).

López *et al.* (2004) relatam valores de viscosidade aparente de 700 mPa.s para goma xantana obtida com fermentação da casca de melão seca em concentrações de 2,0% da solução aquosa de goma xantana à 25°C e taxa de cisalhamento de 20s⁻¹. Portanto, para condições são semelhantes às usadas neste trabalho e constata-se pela Figura 17, no qual a viscosidade máxima da goma xantana obtida por fermentação da glicerina bruta pela cepa 2103 é similar (642,56 mPa.s).

Nery (2007) relata viscosidade de aproximadamente 100 mPa.s, 150mPa.s e 600mPa.s para goma xantana obtida por fermentação do soro de leite, casca de maracujá e casca de coco, respectivamente, na concentração de 2,0% da solução aquosa de xantana a 25°C e 25s⁻¹. Resultados menores quando comparados com o obtido para goma xantana da fermentação da glicerina bruta (Figura 17) nas mesmas condições.

Os parâmetros reológicos, o índice de consistência (K) e o índice de fluxo (n), foram determinados através do modelo de Ostwald-de Waele a partir da regressão de potência. A Tabela 12 apresenta esses parâmetros em função da variação da concentração de solução aquosa das gomas xantana resultante do meio controle e alternativo, e em diferentes temperaturas.

A Tabela 12 mostra que as soluções de gomas xantanas testadas apresentam comportamento pseudoplástico ($n < 1$). É observado, que independente das concentrações de xantana, com o aumento da temperatura, a solução aquosa torna-se menos pseudoplástica, isto é, apresenta valores de índice de fluxo maiores e o de consistência menor. Também se observa que quanto menor a concentração de xantana, menos pseudoplástico é a solução, um comportamento esperado devido a maior quantidade de água, um solvente Newtoniano (LUPORINI; BRETAS, 2008).

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Tabela 12. Parâmetros reológicos que caracterizam a pseudoplasticidade do biopolímero sintetizado pela cepa *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 sintetizada em meio fermentativo contendo sacarose, glicerina bruta e glicerina comercial.

T(°C)	Goma Xantana											
	Sacarose				Glicerina bruta				Glicerina comercial			
	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%
	n											
25	0,52	0,35	0,29	0,23	0,45	0,32	0,23	0,19	0,41	0,30	0,21	0,17
45	0,58	0,37	0,30	0,24	0,45	0,32	0,24	0,23	0,44	0,33	0,22	0,19
65	0,66	0,49	0,35	0,29	0,51	0,41	0,24	0,23	0,50	0,39	0,24	0,21
85	0,63	0,56	0,47	0,39	0,47	0,41	0,29	0,22	0,48	0,40	0,30	0,23
	K											
25	234,60	1208,30	2045,50	5886,50	419,47	1858,90	5010,70	8630,90	456,34	1920,70	5289,40	8645,50
45	133,10	901,40	2133,70	4957,70	399,40	1759,70	4678,30	6581,60	412,56	1801,34	4877,87	6683,30
65	68,00	359,90	1409,90	3168,40	244,42	711,21	4418,70	5512,10	313,33	765,50	4599,91	5687,40
85	66,60	117,60	459,60	1133,60	240,74	537,05	2105,40	3179,10	262,17	587,05	2356,90	3199,80

O índice da consistência tende a aumentar com o aumento da concentração de goma xantana, comportamento visto na Tabela 12, o que explica o grau de resistência do fluido de xantana diante do escoamento na perfuração de poços de petróleo (BORGES, 2007). Alto valor de K é desejável em fluidos de perfuração e recuperação terciária de petróleo (EOR), pois alta viscosidade é necessária para manter em suspensão os cascalhos gerados durante a perfuração (SHAH; ASHTAPUTRE, 1999).

Os valores de índice de fluxo para as gomas xantana obtidas da fermentação da glicerina bruta e comercial foram maiores do que pseudoplasticidade obtidas das apresentadas da fermentação da sacarose. E os índices de consistência da xantana (glicerina bruta e comercial) foram bem maiores, aproximadamente 2 vezes a mais que os da sacarose, o que provavelmente está relacionado com a estrutura química da xantana.

Baixos valores de índice de fluxo (n) são desejáveis para facilitar a injeção do fluido e melhorar a taxa de perfuração (CANDIA; DECKWER, 1999; BORGES, 2007). Ahmed (2003) relata que com o aumento da concentração das soluções de goma xantana ocorre simultaneamente o decréscimo nos valores do índice de fluxo (n).

Um polímero utilizado na recuperação avançada de petróleo (EOR) deve possuir um índice de fluxo desejado (Tabela 13), com a finalidade de melhorar a capacidade de limpeza do poço e a velocidade de perfuração, facilitando assim, sua injeção (SHAH; ASHTAPUTRE, 1999).

Tabela 13. Parâmetros reológicos obtidos pela solução de goma xantana obtida da fermentação da sacarose e da glicerina bruta pela cepa 2103 comparados com o da goma comercial, numa concentração de 0,5%, a 25°C e 400s⁻¹.

Goma Xantana	Parâmetros	
	Viscosidade aparente (mPa.s)	n
Fermentação da sacarose	12,83 ± 0,12	0,52
Fermentação glicerina bruta	15,44 ± 0,10	0,45
Xantana comercial	18,43 ± 0,15	0,41
Valor desejado ¹	> 15	< 0,40

¹SHAH & ASHTAPUTRE (1999).

É observado na Tabela 13 que os resultados de viscosidade aparente e do índice de fluxo (n) foram satisfatórios para goma xantana obtida da fermentação da glicerina bruta e comercial. Enquanto o resultado obtido pela goma da fermentação da sacarose está fora do valor desejado.

As soluções de goma xantana são pseudoplástica e já vêm sendo usada em recuperação avançada de petróleo (EOR) em outros países, pois não tem até o momento nenhum outro polímero em escala comercial que supere suas qualidades, devido às suas propriedades físico-químicas. Suas propriedades de viscosidade, resistência a tensões de cisalhamento, tolerância a diferentes temperaturas e a salinidade, fazem com que o biopolímero seja ideal para a extração secundária de óleo (TEIXEIRA; ROCHA, 2005). O limitante, entretanto, é seu alto custo para esta finalidade, pois grandes quantidades de goma são necessárias. Portanto, a obtenção de goma xantana por fermentação de glicerina bruta residual do biodiesel representa uma diminuição do custo de produção e torna-se uma alternativa viável para esta aplicação.

5.3 ESTUDO DE FERMENTAÇÃO DA GLICERINA BRUTA COM AS CEPAS SELECIONADAS

5.3.1 Curvas de crescimento bacteriano

Para avaliar os múltiplos estágios foram construídas curvas do crescimento microbiano para *X. axonopodis* pv *manihotis* 356 e *X. campestris mangiferaeindicae* 2103 no inóculo com o objetivo de obter informações relativas à faixa de absorvância (620 nm) correspondente ao ótimo da fase log e a concentração celular a esta faixa.

A biomassa formada durante a incubação do inóculo das cepas 356 e 2103 foram acompanhadas por densidade óptica (DO) à 620nm, em espectrofotômetro, baseando-se na medida de turvação do meio em função da quantidade de células em suspensão. O método apresenta a vantagem de ser de rápida execução, envolvendo equipamentos relativamente simples. Tais informações foram importantes para se trabalhar com o inóculo na mesma faixa de concentração celular, resultando assim em produções mais reprodutíveis (BERWANGER, 2005). As curvas podem ser observadas nas Figuras 19 e 20, onde se verifica que a máxima velocidade de crescimento das duas cepas ocorrem ao final da fase logarítmica em torno de 24 horas de incubação a temperatura de 28°C, com agitação de 180 rpm.

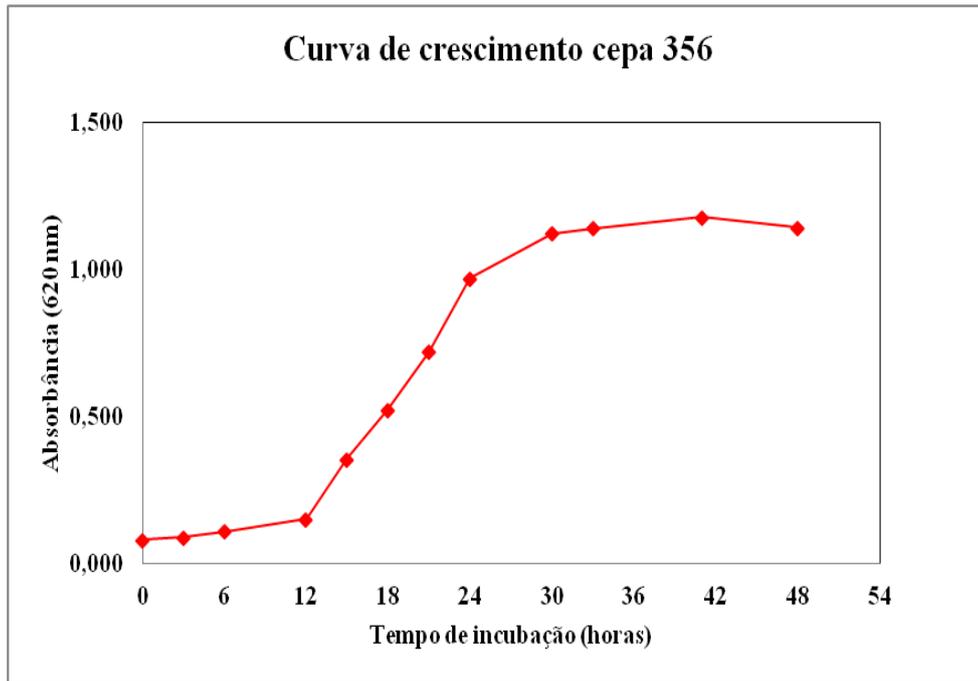


Figura 19. Curva de crescimento bacteriano da *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* 356, em meio YM, 28°C, 180 rpm, shaker.

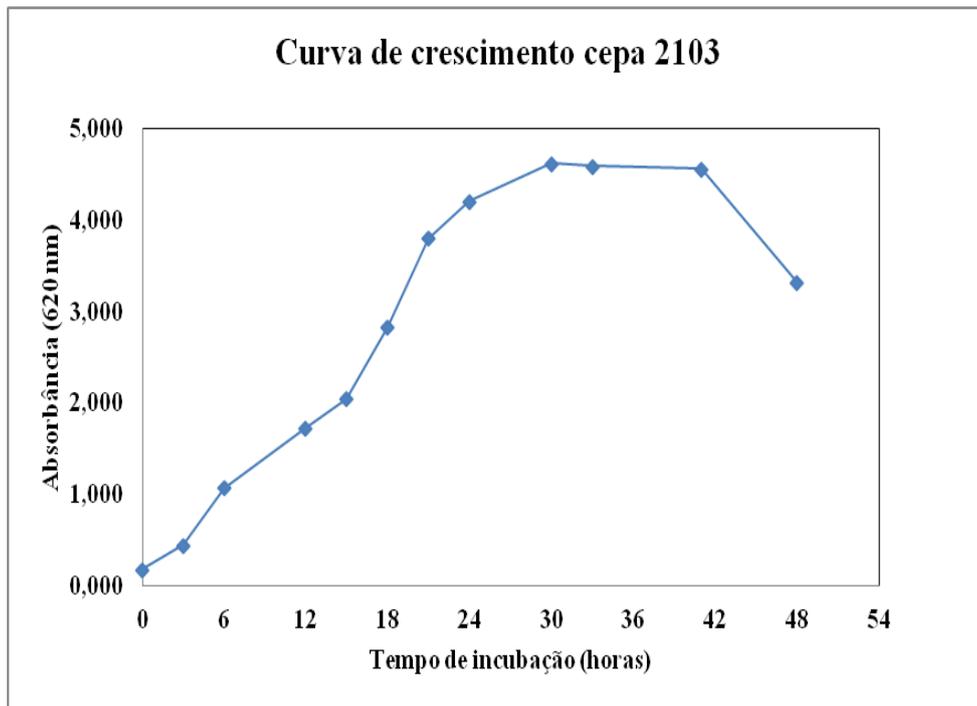


Figura 20. Curva de crescimento bacteriano da *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, em meio YM, 28°C, 180 rpm, shaker.

A faixa de tempo de 24 horas de incubação corresponde a uma concentração celular média de 10^{11} UFC/mL para as *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 e 10^{10} UFC/mL para *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* 356, sendo, portanto esta concentração celular foi utilizada como inoculo (Figura 19 e 20). Essa faixa (fase de crescimento exponencial ou log) as células se dividem firmemente, em ritmo constante e o crescimento celular é máximo, a população é praticamente uniforme em tempos de composição química, atividade metabólica e outras características.

A fase estacionária ocorre quando a fase log começa a diminuir, a população permanece constante, talvez pela exaustão de alguns nutrientes que reflete no número de divisões celulares. Nas Figuras 19 e 20, este intervalo de tempo aconteceram entre 30-42h para ambas as cepas.

O suprimento da produção de goma xantana enquanto constrói-se a massa celular requer múltiplos estágios de desenvolvimento do inóculo (PETERS *et al.*, 1989; PONS *et al.*, 1989; NERY, 2007).

5.3.2 Influência da concentração de glicerina bruta e do inóculo do meio fermentativo na produção e viscosidade aparente de xantana pela cepa 356

A cepa 356 foi selecionada para testar a influência da concentração da glicerina bruta (2 a 6,8%) e do percentual de inóculo (5,5 a 20%) do meio fermentativo (suplementado com 0,01% de uréia e 0,1% de KH_2PO_4) através de um delineamento fracionado, buscando avaliar a influência de variáveis independentes (composição do substrato) sobre as respostas (produção de goma xantana e viscosidade aparente) nas condições fermentativa de 28°C, agitação de 250 rpm e tempo de 120 horas em shaker. A Tabela 14 mostra os resultados desse estudo com dados de produção da goma xantana e de viscosidade aparente.

Para as respostas de produção de goma xantana e a de viscosidade aparente foram calculados os coeficientes de regressão e o desvio padrão, mostrados na Tabela 14. Para produção e viscosidade aparente, todos os parâmetros foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$), com exceção do termo de interação entre as variáveis para produção e o parâmetro quadrático (segundo grau) da concentração de glicerina bruta para a viscosidade aparente.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Tabela 14. Matriz do planejamento experimental (valores codificados e reais) com respostas de produção de xantana e viscosidade aparente obtida por fermentação glicerina bruta por 120 horas pela cepa 356 em *Shaker*.

Ensaio	Glicerina bruta (v/v)	Inóculo (% v/v)	Produção de goma xantana (g.L ⁻¹)				Viscosidade aparente (mPa.s, 0,5%, 25s ⁻¹ , 25°C)			
1	-1 (2,00)	-1 (8,0)	0,3762 ± 0,12				46,01 ± 0,10			
2	-1 (2,00)	+ (20,0)	1,3831 ± 0,10				102,60 ± 0,11			
3	+1 (6,00)	-1 (8,0)	0,8281 ± 0,09				48,71 ± 0,12			
4	+1 (6,00)	+ (20,0)	1,3337 ± 0,13				56,69 ± 0,11			
5	-1,41 (1,17)	0 (14,0)	0,5600 ± 0,12				89,60 ± 0,12			
6	+1,41 (6,83)	0 (14,0)	1,2338 ± 0,08				51,66 ± 0,09			
7	0 (4,00)	-1,41 (5,5)	0,5700 ± 0,11				39,39 ± 0,13			
8	0 (4,00)	+1,41 (22,5)	1,3725 ± 0,10				64,86 ± 0,12			
9*	0 (4,00)	0 (14,0)	0,6169 ± 0,10				81,89 ± 0,11			
10*	0 (4,00)	0 (14,0)	0,6294 ± 0,11				82,59 ± 0,10			
11*	0 (4,00)	0 (14,0)	0,6613 ± 0,11				82,54 ± 0,10			
Tratamento estatístico			R ²	dp	t(5)	p	R ²	dp	t(5)	p
Média			+ 0,64	0,06	10,26	0,000151	+ 82,34	0,04	10,26	0,000001
Glicerina (v/v) (L)			+ 0,34	0,07	4,47	0,006603	- 24,22	0,03	4,47	0,001011
Glicerina (v/v) (Q)			+ 0,28	0,09	3,12	0,026289	- 10,64	0,07	3,12	0,052426
Inóculo (%) (L)			+ 0,67	0,07	8,82	0,000312	+ 25,15	0,05	8,82	0,000849
Inóculo (%) (Q)			+ 0,37	0,09	4,05	0,009798	- 29,15	0,08	4,05	0,000959
Interação 1L x 2L			- 0,25	0,10	-2,34	0,066707	- 24,31	0,09	-2,34	0,004618
Equação			P = 0,64+0,34 x G+0,28 x (G) ² +0,67 x I+0,37 x (I) ² , R ² =0,96				V = 82,34 – 24,22 x G – 10,64 x (G) ² +25,15 x I – 24,31 x (I) ² R ² =0,97			

* Pontos centrais. G = Concentração de glicerina; I= Percentual de Inoculo; P = Produção de goma xantana.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Analisando os resultados iniciais de produção e viscosidade aparente da goma xantana obtidos pela cepa 356 e na mesma escala fermentativa, a Tabela 11 apresentou $1,24 \pm 0,10 \text{ g.L}^{-1}$ de produção de xantana com viscosidade de $67,16 \text{ mPa.s}$. Portanto com a variação da concentração da glicerina bruta e do inóculo do meio fermentativo, conforme mostrado na Tabela 11, o ensaio 2 (2,0% de glicerina e 20% de inóculo) obteve-se $1,38 \pm 0,10 \text{ g.L}^{-1}$ de produção de xantana e $102,60 \text{ mPa.s}$ de viscosidade aparente, correspondendo um aumento significativo de aproximadamente de 11,3% para produção de xantana e 52,7% para viscosidade aparente.

Os experimentos 5, 9, 10 e 11 (pontos centrais) também resultaram uma goma xantana com maior viscosidade. Observa-se na superfície de resposta obtida a partir do modelo empírico codificado (Figura 11) que existe uma tendência de encontrar uma faixa ótima de viscosidade de goma xantana quando diminuir a concentração de glicerina e aumentar o percentual de inóculo. É necessário o aumento dos valores de inóculo e a diminuição da concentração de glicerina utilizada para visualizar melhor o ponto máximo de viscosidade de goma xantana.

Observa-se na superfície de resposta, na Figura 21, obtida a partir do modelo empírico codificado que existe uma tendência de encontrar uma faixa ótima de produção de goma xantana quando aumentou a concentração de glicerina e o percentual de inóculo adicionado. É necessário o aumento dos valores da concentração de glicerina e de inóculo utilizados para visualizar melhor o ponto ótimo de produção de goma xantana.

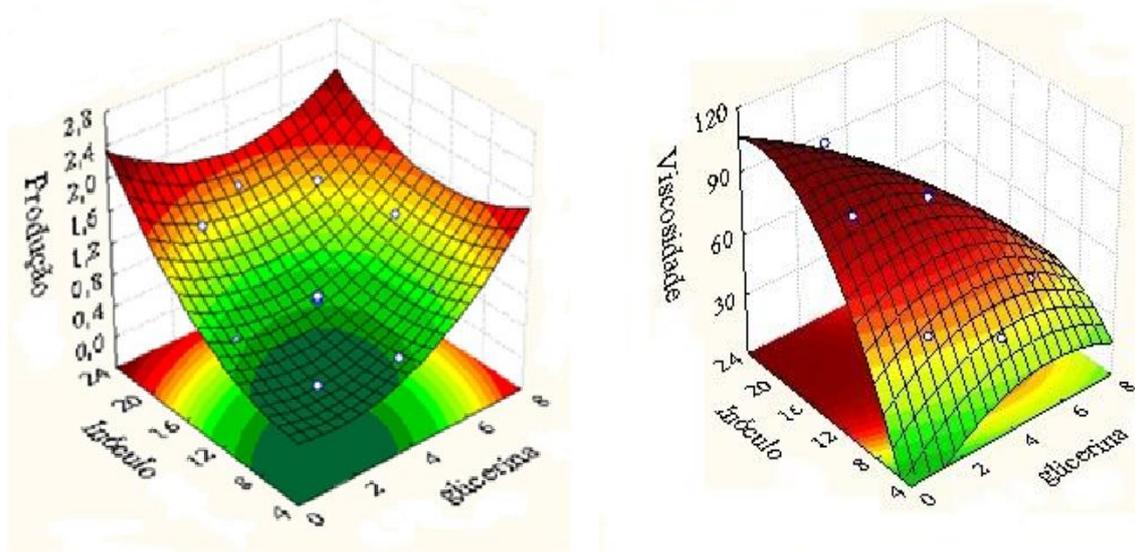


Figura 21. Superfície de resposta com o comportamento da produção (g.L^{-1}) e viscosidade aparente (mPa.s) da goma xantana pela cepa 356 em relação à concentração (%) de glicerina bruta e inóculo.

Aliada à seleção de cepas capazes de se adaptar ao substrato alternativo e biossintetizar polímero, é fundamental aprofundar estudos referentes à composição do meio fermentativo que influenciam valores de produção e viscosidade, buscando maximizar a produção e qualidade do produto resultante.

As Equações 9 e 10, apresentadas na Tabela 14, apresentam o modelo empírico codificado obtido para a produção e a viscosidade de goma xantana, respectivamente, em função das variáveis independentes estudadas. O parâmetro não significativo foi adicionado à falta de ajuste para a análise de variância (ANOVA).

$$P = 0,64 + 0,34 \times G + 0,28 \times (G)^2 + 0,67 \times I + 0,37 \times (I)^2 \quad (\text{Equação 9})$$

$$V = 82,34 - 24,22 \times G - 10,65 \times (G)^2 + 25,15 \times I - 29,15 \times (I)^2 \quad (\text{Equação 10})$$

Onde: P = Produção (g.L⁻¹)

V = Viscosidade da goma (mPa.s)

G = Concentração de glicerina (%)

I = Percentual de Inóculo (%)

Analisando os dados da ANOVA, verifica-se que o coeficiente de correlação obtido foi de 0,96 e o F calculado foi em torno de 2,4 vezes maior que o valor Tabelado, permitindo a validação do modelo codificado de segunda ordem (Equação 9).

Analisando os dados da ANOVA, verifica-se que o coeficiente de correlação obtido foi de 0,97 e o F calculado foi em torno de 3,1 vezes maior que o valor Tabelado, permitindo a validação do modelo codificado de segunda ordem (Equação 10).

A Figura 22 demonstra a influência do tempo de fermentação na produção e na viscosidade aparente de goma xantana obtida utilizando a cepa 356. Foi constatado máximas produção e viscosidade aparente do biopolímero em 120 horas de fermentação, 1,39 g.L⁻¹ e 102,60 mPa.s, respectivamente.

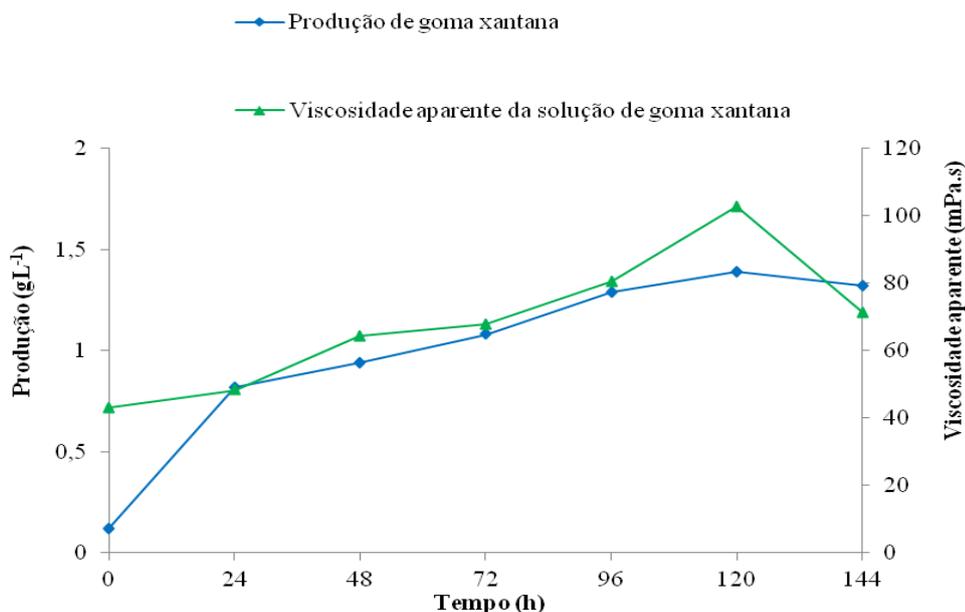


Figura 22. Efeito do tempo de fermentação em relação à produção (g.L^{-1}) e viscosidade (mPa.s) de goma xantana obtida pela cepa 356 nas condições do ensaio 2 (Tabela 14).

Através dos experimentos realizados, constatou-se que o tempo de fermentação em que houve maior produção de goma xantana de melhor qualidade em *shaker* pela cepa 356 foi de 120 h, além de que foi possível observar que nas superfícies de resposta obtidas através do planejamento estatístico realizado existe uma tendência que em concentrações de 2,0 e 4,0% de glicerina bruta e com o aumento do percentual de inóculo seria possível obter maiores produções de goma xantana.

A variação da concentração da glicerina bruta e do inóculo (Tabela 14) resultou em um aumento de produção de goma xantana aproximadamente 12% comparada com o rendimento de xantana apresentada na Tabela 11. A viscosidade aparente da goma também foi melhorada correspondendo 1,5 vezes superior à obtida da xantana na Tabela 11.

5.3.2.1 Influência da fermentação em bioreator na produção de xantana, massa celular e viscosidade aparente do polímero produzido pela cepa 356

A produção de goma xantana pela cepa *Xanthomonas axonopodis pv. manihotis* 356 a partir da fermentação da glicerina bruta foi testada em maior escala, por fermentação em batelada, em bioreator de 4,5 L visando um aumento na produção do polímero. Portanto, as condições fermentativas foram similares às adotadas na escala em *shaker*, utilizando-se a glicerina bruta (2% m/v) como substrato alternativo minimamente suplementado com uréia e

KH_2PO_4 , e 20% (m/v) de inóculo. A fermentação no bioreator foi realizada a 28°C numa agitação de 400 rpm e 1,0 vvm de O_2 dissolvido (aeração). Essas condições fermentativas e operacionais foram utilizadas para avaliar o comportamento da produção da goma xantana, viscosidade aparente da xantana e do caldo fermentativo ao longo do tempo fermentativo de 120 horas, em intervalos de 24 horas (Figura 23).

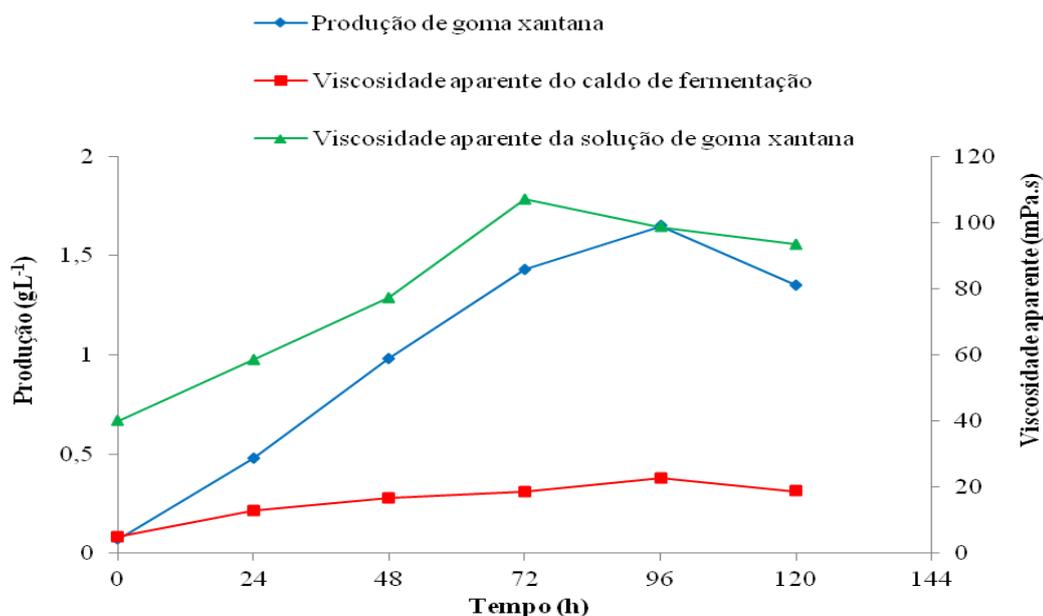


Figura 23. Comportamento da produção de goma xantana e da viscosidade aparente da solução aquosa de xantana (0,5% m/v, 25°C , 25s^{-1}) e do caldo de fermentação ao longo da fermentação de 120 horas da glicerina bruta pela cepa 356 em bioreator, com aeração fixa de 1,0 vvm e rotação de 400 rpm.

A produção de xantana pela cepa 356 aumentou continuamente até 96 horas atingindo $1,65 \text{ g.L}^{-1}$, após esse tempo houve uma queda de aproximadamente 18% da produção do polímero até de 120 horas (Figura 23). A viscosidade aparente das xantanas aumentou continuamente de 0 horas até 72 horas com resultado máximo de $107,16 \text{ mPa.s}$, e a partir deste ponto diminuiu até o final do período de fermentação (120 horas) resultando uma perda de 21% aproximadamente na viscosidade.

Padilha (2003) relata que os meios fermentativos obtidos por linhagens de *Xanthomonas* demonstraram que a influência do tempo de incubação na produção de polímero, onde a cepa *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 289 apresentou maior de concentração em ambas as condições testadas, 72 e 96 horas, $6,9 \text{ g.L}^{-1}$ e $7,9 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, utilizando sacarose como fonte de carbono no meio fermentativo. As

viscosidades aparentes foram aproximadamente 240 mPa.s (72 horas) e 320 mPa.s (96 horas), numa taxa de cisalhamento de 25 s^{-1} e 25°C a 1,0% de solução aquosa de xantana.

Foi observado que a viscosidade aparente do caldo de fermentação alcançou o ponto máximo no tempo fermentativo de 96 horas similar ao comportamento da produção (Figura 23). Essa viscosidade pode ser usada como indicador da produção de goma xantana, entretanto não refletem a qualidade do polímero produzido (FORNARI, 2006). Segundo Antunes *et al.* (2000), alta viscosidade do caldo pode ser decorrente da alta concentração de polímeros com baixa qualidade.

Visando aumentar a produção de xantana utilizando a cepa 356 e adotando o tempo de fermentação em 72 horas, com melhor qualidade da goma devido a maior viscosidade aparente aliada à uma maior produção, foram observados os resultados de produção de xantana e sua viscosidade aparente bem como a massa celular, variando a agitação em 200 e 300 rpm, porém mantendo as mesmas condições fermentativas e operacionais citadas no estudo na agitação a 400 rpm (Figura 23). A Tabela 15 apresenta os resultados de produção e viscosidade aparente da goma xantana, bem como a biomassa celular no tempo de 72 horas de fermentação.

Tabela 15. Produção de xantana, massa celular e sua viscosidade aparente a 0,5% (m/v), 25°C e 25 s^{-1} sintetizada pela cepa 356 em bioreator a 200, 300 e 400 rpm e com aeração fixa de 1,0 vvm após 72 horas de fermentação.

Agitação (rpm)	Produção (g.L^{-1})	Massa celular (g.L^{-1})	Viscosidade aparente (mPa.s)
200	2,04	0,80	41,95
300	2,13	0,81	79,07
400	1,43	0,71	107,16

A produção da goma xantana foi maior utilizando a agitação de 300 rpm correspondendo a um aumento de 4,22% comparada com o meio que utilizou 200 rpm de agitação e 22,53% maior do que a produzida sob agitação de 400 rpm. Esse aumento influenciou nos resultados de massa celular, onde quanto maior a produção, maior a quantidade de biomassa gerada (Tabela 15). O melhor resultado de viscosidade aparente foi para o meio que utilizou a agitação de 400 rpm e a menor viscosidade foi da solução aquosa de xantana obtida na agitação de 200 rpm.

Mudando a fermentação em *shaker* para bioreator com variação de agitação do meio fermentativo (Tabela 15), houve um aumento na produção de xantana ($2,13 \text{ g.L}^{-1}$) quando comparada com as gomas, obtidas em *shaker*, das Tabelas 11 ($1,24 \text{ g.L}^{-1}$) e 14 ($1,39 \text{ g.L}^{-1}$) e uma redução do tempo de fermentação de 120 horas para 72 horas (Tabela 15). Entretanto,

estes incrementos resultaram um aumento significativo na produção de goma xantana quanto comparados com o alto rendimento alcançado com a cepa 2103 (Tabela 11). Neste contexto, passou-se a estudar a fermentação em bioreator com a cepa 2103.

5.3.3. Influência da fermentação em bioreator na produção de xantana, massa celular e viscosidade aparente do polímero pela cepa 2103

5.3.3.1 Respostas ao longo da fermentação

Como ferramentas estatísticas, um planejamento fatorial em estrela DCCR 2^2 com 4 pontos axiais e triplicata no ponto central que resultou em 11 ensaios (Tabela 16) foi utilizado para estudar as interações entre duas variáveis relevantes do processo de fermentação: aeração (0,7 a 1,5 vvm) e velocidade de agitação (300 a 700 rpm). Os ensaios foram realizados utilizando um fermentador com 4,5 L (3,0 L útil) de capacidade como bioreator, e todos os parâmetros de processamento foram monitorados *online* na linha. A temperatura ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) foi mantida constante ao longo de todos os ensaios e o pH do meio foi mantido inicialmente a $7,0 \pm 0,1$. As amostras fermentadas, contendo um volume líquido composto de 3,0L de meio composto de glicerina bruta (2% m/v) minimamente suplementada com uréia (0,01% m/v) e K_2HPO_4 (0,1% m/v) e 20% de inóculo da cepa 2103 foram retiradas a intervalos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h para as determinações de massa de células e produção de xantana (Figura 24).

Os pontos centrais (E9, E10 e E11) apresentaram valores de biomassa mais altos que os demais ultrapassando 3,0 g/L (Figura 24). Fazendo uma comparação com a produção de goma xantana, os pontos centrais, com a taxa de aeração de 1,0vvm e agitação de 500rpm, mostraram que para 6,4g/L de xantana tem-se 3,3 g/L de massa celular gerada para um tempo de produção de 120 h, diferente, por exemplo, no experimento 5 (E5), com taxa de aeração de 0,5vvm e agitação de 500rpm, que com a mesma agitação e menor aeração (metade do ponto central) no mesmo tempo de 120 h de produção tem aproximadamente 2,0g/L de massa celular gerada na produção de 5,0g/L de goma xantana.

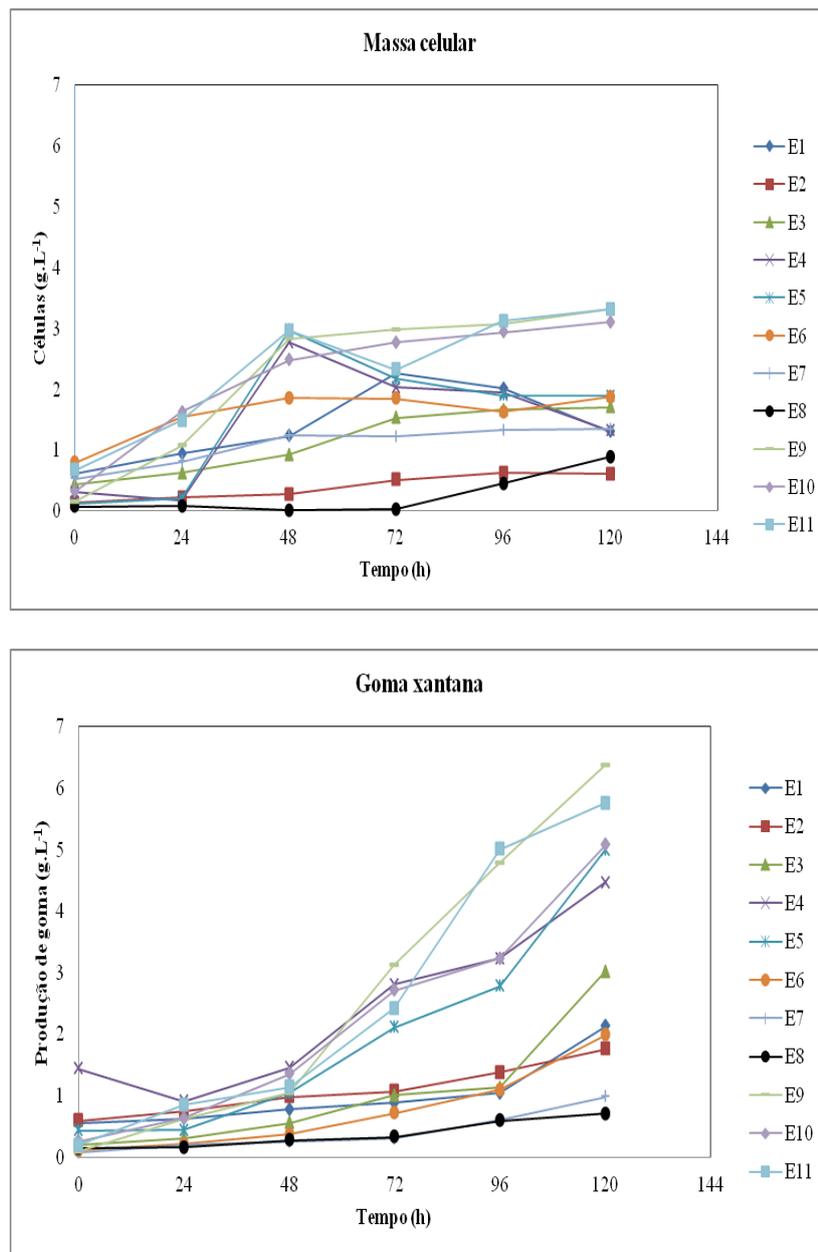


Figura 24. Perfil do tempo da produção de massa celular e de goma xantana durante a fermentação do meio contendo glicerina bruta com *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 em bioreator em diferentes taxas de agitação e aeração.

O efeito combinado dos parâmetros de processamento sobre as produções de xantana e de células de *Xanthomonas* e suas propriedades bioquímicas e reológicas foram estudadas. Constata-se que as produções de células e de goma xantana durante o processo fermentativo foram fortemente influenciadas pela agitação e aeração (Figura 24).

A variação da taxa de oxigênio dissolvido e do pH ao longo do tempo até 120 horas, foi monitorada durante a fermentação da glicerina bruta com a cepa 2103 nas condições

operacionais do ponto otimizado de 1,0 vvm de aeração e 500 rpm de agitação conforme mostrado da Figura 25.

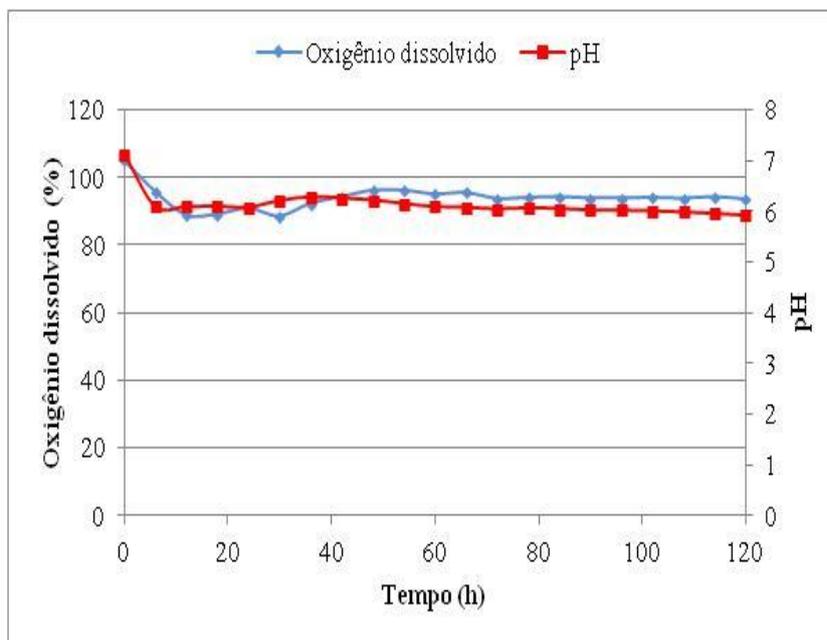


Figura 25. Perfil da variação do oxigênio dissolvido e do pH durante a fermentação do meio contendo a glicerina bruta com *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 em bioreator com taxa de aeração de 1,0vvm e agitação de 500 rpm.

O pH do meio fermentado foi ajustado inicialmente a 7,0, ao longo da fermentação em bioreator, o pH decaiu para 6,0 e manteve constante nesse pH até o período de 120 horas (Figura 25). O pH é um fator operacional que pode influenciar na produção de xantana. A maioria dos pesquisadores aponta o pH neutro como ótimo para o crescimento da *Xanthomonas campestris*, sendo que este pode decrescer até 5,0 durante a produção de xantana, devido aos grupos ácidos presentes no polímero. Quando o pH é controlado, a produção da goma cessa uma vez que a fase de crescimento estacionária seja atingida, e este efeito é independente do álcali usado para controlar o pH. Quando o pH não é controlado, a produção da goma continua durante a fase estacionária de crescimento (SCAMPARINI; LUVIELMO, 2009; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Outro parâmetro importante é o oxigênio dissolvido no meio fermentativo. Na Figura 25 representa uma taxa de aeração de 1,0 vvm e agitação de 500 rpm ao longo da fermentação e constata-se que no início da fermentação até 36 horas houve uma variação da taxa de oxigênio dissolvido no meio e de 38 a 120 horas de fermentação manteve numa faixa constante de 95 a 100% de oxigênio. A agitação e a aeração são parâmetros necessários para

evitar condições de anaerobiose decorrentes da alta viscosidade do meio pela formação do polissacarídeo, visto que a bactéria é estritamente aeróbia. Logo, a combinação adequada, para os níveis destes parâmetros, deve ser estudada para evitar a limitação na transferência de oxigênio ou condições de estresse hidrodinâmico (SUTHERLAND, 1993; CASAS *et al.*, 2000). A aeração é requerida para se obter produção de goma em processos fermentativos, aumentos nos níveis de agitação resultam em níveis de produção mais altos, o que ocorre também para o crescimento celular. Em baixas velocidades ocorrem limitações de oxigênio resultando em menores produções de gomas com baixo peso molecular. Os efeitos benéficos do aumento da agitação são atribuídos à transferência de nutrientes e oxigênio necessários para a formação de goma xantana (BRANDÃO, 2008; PAPAGIANNI *et al.*, 2001).

5.3.3.2 Respostas de todos os ensaios fermentativos a 120 horas de fermentação

A Tabela 16 é apresentado a matriz do planejamento experimental com variáveis independentes (agitação e aeração) e as respostas (produção de goma xantana e de massa celular e viscosidade aparente).

Analisando os resultados de produção e viscosidade aparente da goma xantana produzida em shaker, obtidos pela mesma cepa 2103. Na Tabela 11, observa-se $5,5 \pm 0,10$ g.L⁻¹ de produção de xantana com viscosidade de 69,50 mPa.s. Com a variação da aeração e agitação no meio fermentativo (bioreator 4,5L), conforme mostrado na Tabela 16, no ensaio 9 (1,0 vvm de aeração e 500 rpm de agitação) obteve $6,34 \pm 0,10$ g.L⁻¹ de produção de xantana e 252,38 mPa.s de viscosidade aparente, correspondendo um aumento de aproximadamente de 15,3% para produção de xantana e aumento significativo para viscosidade aparente de 263,14%.

Alta velocidade pode resultar em dano celular por “stress” hidrodinâmico e em agitação baixa, o baixo rendimento de goma e de células (biomassa) é favorecido devido à limitação na transferência de oxigênio (CASAS *et al.*, 2000; SCAMPARINI; LUVIELMO, 2009). Também foi verificado que os ensaios 5 (500 rpm de agitação e 0,5 vvm de aeração), 4 (640 rpm de agitação e 1,3 vvm de aeração) e 3 (360 rpm de agitação e 1,3 vvm de aeração) também apresentaram boa produção de goma xantana.

A produção de massa celular e a viscosidade aparente dependem da aeração e agitação, pois apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$). Enquanto que a produção de goma xantana apenas depende da variável de agitação (Tabela 16).

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Tabela 16. Matriz do planejamento experimental com valores reais e codificados de aeração e agitação (variáveis independentes), e as respectivas respostas (variáveis dependentes) após 120 h do processo, pela cepa 2103 em bioreator.

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes								
	Aeração (vvm)	Agitação (rpm)	Goma Xantana (g.L ⁻¹)			Massa celular (g.L ⁻¹)			Viscosidade aparente (mPa.s, 0,5%, 25s ⁻¹ , 25°C)		
1	-1 (0,7)	-1 (360)	2,13 ± 0,11			1,30 ± 0,11			87,34 ± 0,10		
2	-1 (0,7)	+1 (640)	1,76 ± 0,13			0,61 ± 0,13			64,82 ± 0,08		
3	+1 (1,3)	-1 (360)	3,02 ± 0,10			1,71 ± 0,14			104,24 ± 0,09		
4	+1 (1,3)	+1 (640)	4,47 ± 0,11			1,32 ± 0,13			152,68 ± 0,10		
5	-1,41 (0,5)	0 (500)	5,00 ± 0,15			1,89 ± 0,11			129,59 ± 0,12		
6	+1,41 (1,5)	0 (500)	1,98 ± 0,12			1,87 ± 0,12			152,56 ± 0,10		
7	0 (1,0)	-1,41 (300)	0,98 ± 0,11			1,35 ± 0,10			112,78 ± 0,10		
8	0 (1,0)	+1,41 (700)	0,71 ± 0,13			0,89 ± 0,13			84,02 ± 0,13		
9*	0 (1,0)	0 (500)	6,34 ± 0,10			3,13 ± 0,11			252,38 ± 0,12		
10*	0 (1,0)	0 (500)	5,08 ± 0,11			3,11 ± 0,10			250,00 ± 0,11		
11*	0 (1,0)	0 (500)	5,76 ± 0,11			3,32 ± 0,12			235,00 ± 0,11		
Tratamento estatístico			CR**	dp	p	CR**	dp	p	CR**	Dp	p
Aeração (vvm) (L)			5,14	0,13	0,74	0,14	0,13	0,079	2354,51	0,13	0,03***
Aeração (vvm) (Q)			0,06	0,11	0,07	2,92	0,07	0,004***	18171,35	0,07	0,004***
Agitação (rpm) (L)			29,26	0,15	0,73	0,37	0,10	0,034***	27,21	0,10	0,63
Agitação (rpm) (Q)			0,82	0,10	0,01***	6,82	0,08	0,001***	34412,71	0,08	0,002***
Interação 1L x 2L			5,13	0,19	0,29	0,02	0,19	0,324	1258,83	0,19	0,06
Equação			P = 5,74 - 2,28 x (Ag) ² R ² =0,76			C = 3,19 - 0,72 x (Ae) ² - 0,22 x Ag - 1,09 x (Ag) ² R ² =0,95			V = 245,79 + 17,15 x Ae - 56,72 x (Ae) ² - 78,06 x (Ag) ² R ² =0,95		

* Pontos centrais. ** Coeficiente de regressão. ***Efeito significativo (p<0,05). P= produção (g.L⁻¹), C= formação de células (g.L⁻¹), Ae = Aeração, e Ag = Agitação.

A agitação e a aeração são parâmetros necessários para evitar condições de anaerobiose decorrentes da alta viscosidade do meio pela formação do polissacarídeo, visto que a bactéria é estritamente aeróbia. Logo, a combinação adequada, para os níveis destes parâmetros, deve ser estudada para evitar a limitação na transferência de oxigênio ou condições de estresse hidrodinâmico (SUTHERLAND, 1993; CASAS *et al.*, 2000).

Casas *et al.* (2000) observaram dois efeitos com o aumento da velocidade de agitação: aumento na taxa de transferência de massa de oxigênio associada a um dano celular. Em velocidades mais altas (800 rpm/min) o crescimento celular e a produção de goma xantana são menores, provavelmente devido ao dano celular por “stress” hidrodinâmico; e em velocidades muito baixas (100 rpm/min) também se observou menor crescimento de biomassa e produção de goma xantana, devido à limitação na transferência de oxigênio.

As soluções aquosas das gomas produzidas após 120 horas em todos os ensaios do planejamento apresentaram comportamento pseudoplástico (Tabela 17), ou seja, a viscosidade aparente, obtida pelo modelo cinético de Ostwald-de-Waele ou lei da potência, decresceu com o aumento da taxa de cisalhamento (Figura 26). Esse comportamento é característico da goma xantana (MULCHANDANI *et al.*, 1988; TEIXEIRA, 2005).

Tabela 17. Resultados dos parâmetros n e K com variação da temperatura.

T °C	Ensaio							
	1		2		3		4	
	n	K	n	K	n	K	n	K
25	0,4963	441,93	0,5047	319,24	0,5881	392,49	0,4894	789,88
45	0,5252	322,03	0,5171	250,56	0,6145	281,55	0,511	626,74
65	0,4968	337,02	0,4986	208,93	0,6354	197,41	0,4907	575,35
85	0,4851	289,44	0,5229	143,82	0,6366	156,33	0,4831	466,26
T °C	5		6		7		8	
	n	K	n	K	n	K	n	K
	25	0,5571	539,15	0,5781	593,26	0,3968	786,10	0,4902
45	0,5800	386,00	0,6236	387,16	0,3756	773,91	0,5036	376,47
65	0,6097	254,10	0,6574	285,69	0,2650	1129,0	0,4982	336,00
85	0,5714	246,46	0,5927	205,97	0,3946	500,0	0,4795	306,85
T °C	9		10		11			
	n	K	n	K	n	K		
	25	0,3968	1759,10	0,3911	1759,90	0,3784	1771,70	
45	0,4153	1488,90	0,4020	1483,30	0,3854	1568,50		
65	0,4637	882,390	0,4330	987,33	0,4345	997,96		
85	0,3817	951,95	0,3503	1044,31	0,3606	973,77		

A viscosidade de soluções aquosas das diferentes xantanas foi avaliada em distintas temperaturas. Através do ajuste do modelo de Ostwald-de-Waele foram determinados o índice

de consistência (K) e o índice de fluxo (n) como mostrado na Tabela 17, pois este é um dos modelos mais utilizados para descrever o comportamento de fluidos em campos petrolíferos. O ajuste do modelo de Ostwald-de-Waele aos dados experimentais demonstrou que todos os coeficientes de correlação foram superiores a 0,99, indicando uma boa representação dos valores experimentais pelo modelo.

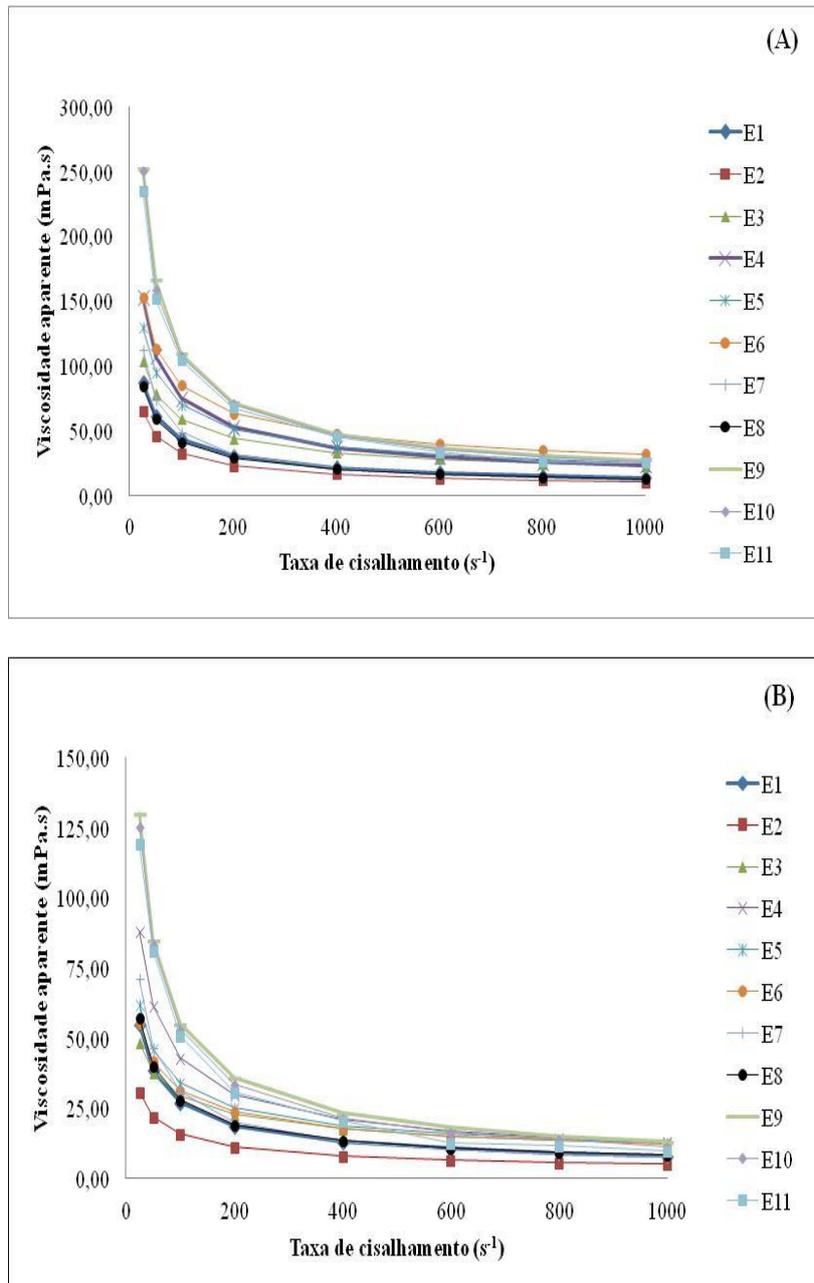


Figura 26. Comportamento pseudoplástico das gomas xantana dos 11 ensaios com a variação da temperatura 25°C (A) e 85°C (B).

Baixos valores de n são desejáveis em fluidos de perfuração para facilitar a injeção do fluido e melhorar a taxa de perfuração (CANDIA; DECKWER, 1999; BORGES, 2007).

Foi observado que o índice de consistência (K), que depende da concentração de goma xantana, diminui com o aumento da temperatura.

Um valor de K alto é desejável em fluidos de perfuração, pois alta viscosidade é necessária para manter em suspensão os cascalhos gerados durante a perfuração (SHAH; ASHTAPUTRE, 1999). Cabe salientar que os parâmetros reológicos K e n são dependentes da concentração de xantana e da qualidade do polímero (CANDIA; DECKWER, 1999).

A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) aplicada para otimizar as condições de fermentação de glicerina bruta de co-produtos do biodiesel pela cepa 2103 *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* foi eficaz. Um modelo matemático foi desenvolvido para mostrar o efeito de cada um dos parâmetros de fermentação e as suas interações na produção de goma xantana, de massa celular e de viscosidade aparente.

O modelo previu o rendimento celular máximo de 3,19 g.L⁻¹ quando se utiliza a velocidade de agitação e aeração de 500 rpm e 1,0 vvm, respectivamente, enquanto que com um rendimento máximo de xantana 5,74 g.L⁻¹ e 245,79 mPa.s de viscosidade surgiram nas mesmas condições de agitação e aeração anteriores. Estes valores previstos também foram verificados nos experimentos de validação (Tabela 16). A excelente correlação entre os valores previstos e observados justifica a validade do modelo de resposta. Os resultados da fermentação no bioreator também mostraram que o meio de cultura otimizado atingiu a mesma quantidade de massa celular (3,19 g.L⁻¹), e aumentou a goma xantana (6,34 g.L⁻¹) e melhorou a qualidade da goma xantana (252,38 mPa.s) por fermentação da glicerina bruta do biodiesel pela cepa 2103, podendo ser utilizada comercialmente em um processo de fermentação em grande escala, resultando um polímero de menor custo.

A Figura 27 mostra o comportamento da distribuição experimental entre os valores previstos e valores observados validando a metodologia RSM.

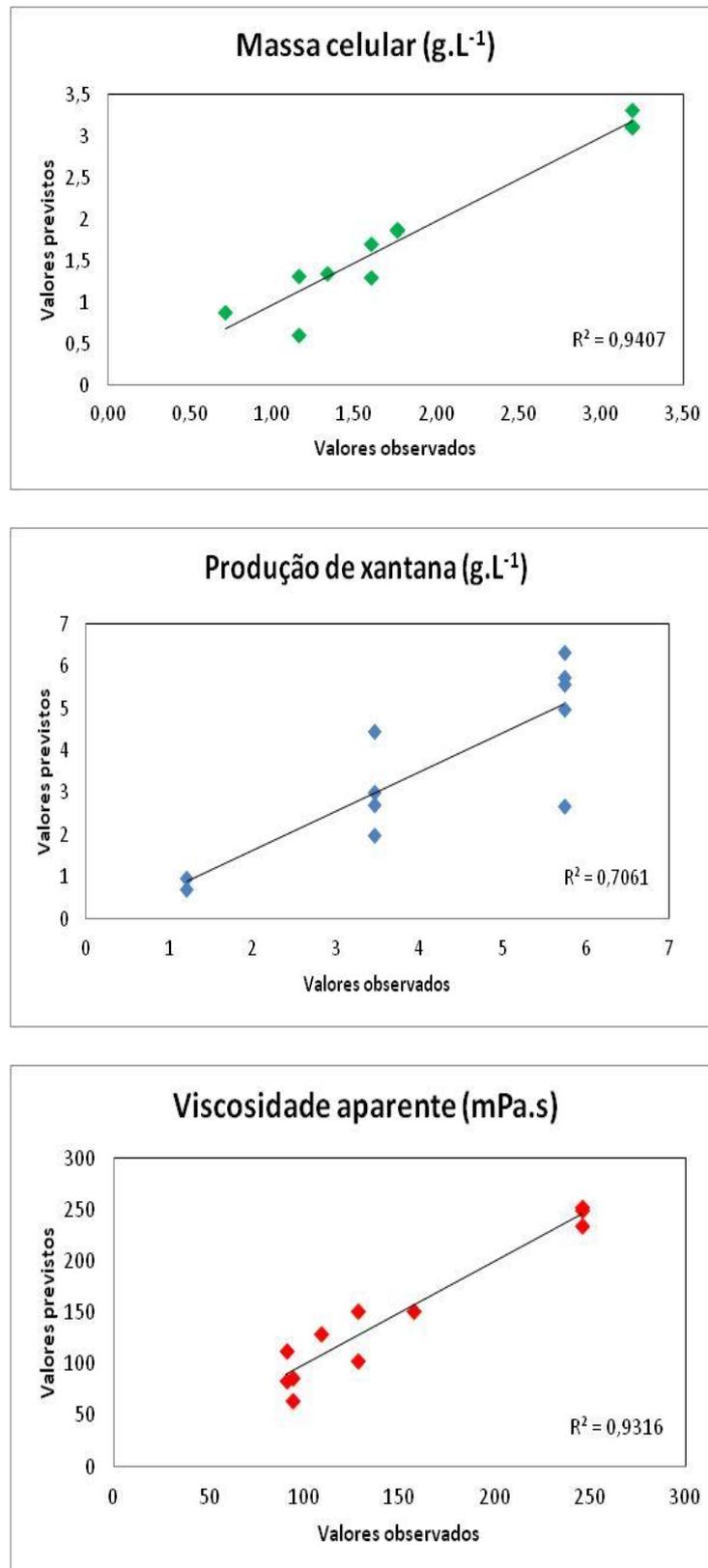


Figura 27. Comportamento da distribuição experimental entre os valores previstos x valores observados pelo modelo matemático da massa celular, produção da goma xantana e viscosidade aparente.

Os valores observados foram gerados pelo software Statistic 7.0 e comparados com os valores previstos e calculados através das equações geradas para o efeito significativo ($p < 0,05$) para massa celular, produção de goma xantana e viscosidade aparente, mostrados na Tabela 16. A Figura 27 mostra uma ótima correlação entre o observado e o calculado através das equações para massa celular, produção de goma xantana e viscosidade aparente. Os coeficientes de determinação (R^2) foram acima de 90% para massa celular e viscosidade, ambos dependentes da aeração e agitação, enquanto para produção de xantana ficou acima de 70%, apenas dependente da agitação sem influência da aeração (Tabela 16).

5.3.3.3 Respostas a 120 horas de fermentação no ponto otimizado

Todos os experimentos mostraram produção de goma xantana, sendo que o ponto central (E9, E10 e E11), com taxa de aeração de 1,0vvm e agitação de 500rpm, apresentaram melhores resultados de produção de goma xantana a 120 horas de fermentação. As menores produções foram encontradas em ensaios com menor e maior velocidade de agitação, isso porque em velocidade mais alta causa dano celular por “stress” hidrodinâmico e em agitação baixa, o baixo rendimento de goma e de células (biomassa) é favorecido devido à limitação na transferência de oxigênio (CASAS *et al*, 2000; SCAMPARINI; LUVIELMO, 2009).

Para a reposta de produção de goma foram calculados os coeficientes de regressão e os desvios padrão, mostrados na Tabela 16, o que mostra que apenas a variável agitação foi significativa. O parâmetro quadrático (segundo grau) da agitação foi significativo com significância $> 76,0\%$ de confiança e com $p < 0,05$ (Figura 28).

A equação apresentada na Tabela 16 para produção de goma xantana utilizou o modelo empírico codificado obtido para a produção de xantana em função das variáveis independentes estudadas. O parâmetro não significativo foi adicionado à falta de ajuste para a análise da variância. E analisando os dados da ANOVA, foi verificado que o coeficiente de correlação obtido foi de 0,76 e o F (de ajuste) foi menor que 9,0 e F calculado foi em torno de 2,4 vezes maior que o valor Tabelado, permitindo a validação do modelo codificado de segunda ordem.

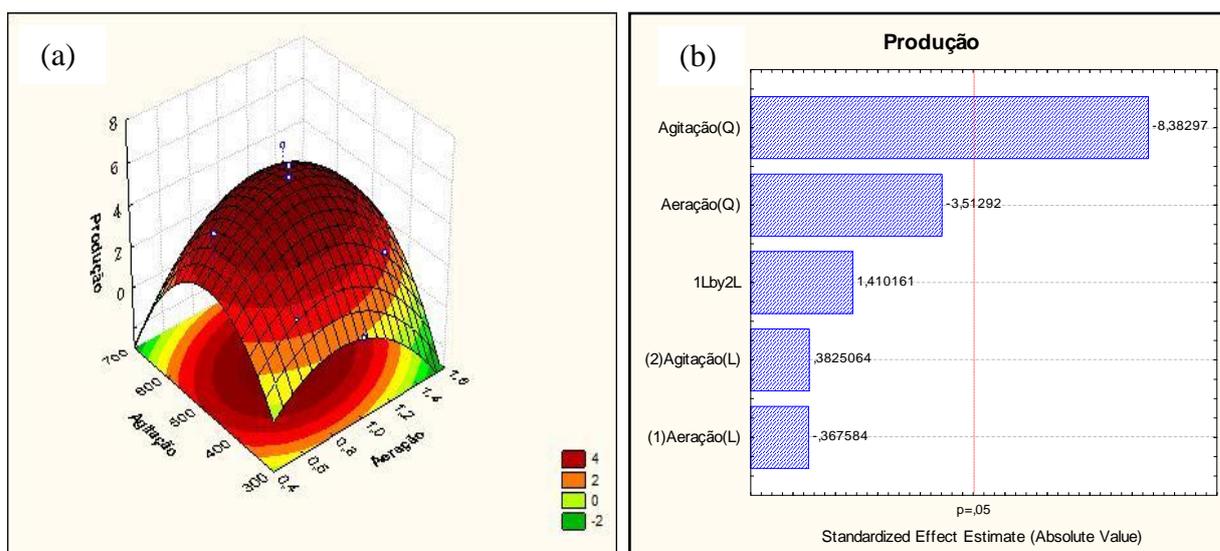


Figura 28. Superfície de resposta (a) e gráfico de Pareto (b) com o comportamento da produção, g.L^{-1} , de goma xantana (cepa 2103) em relação à agitação (rpm) e aeração (vvm).

Para massa celular, o comportamento foi o mesmo. Esse comportamento é apresentado na Figura 29. Os coeficientes de regressão e os desvios padrão foram calculados segundo a equação presente na Tabela 16, o que mostra que as variáveis agitação e aeração foram significativas, com significância $> 95,0\%$ de confiança e com $p < 0,05$ (Figura 29).

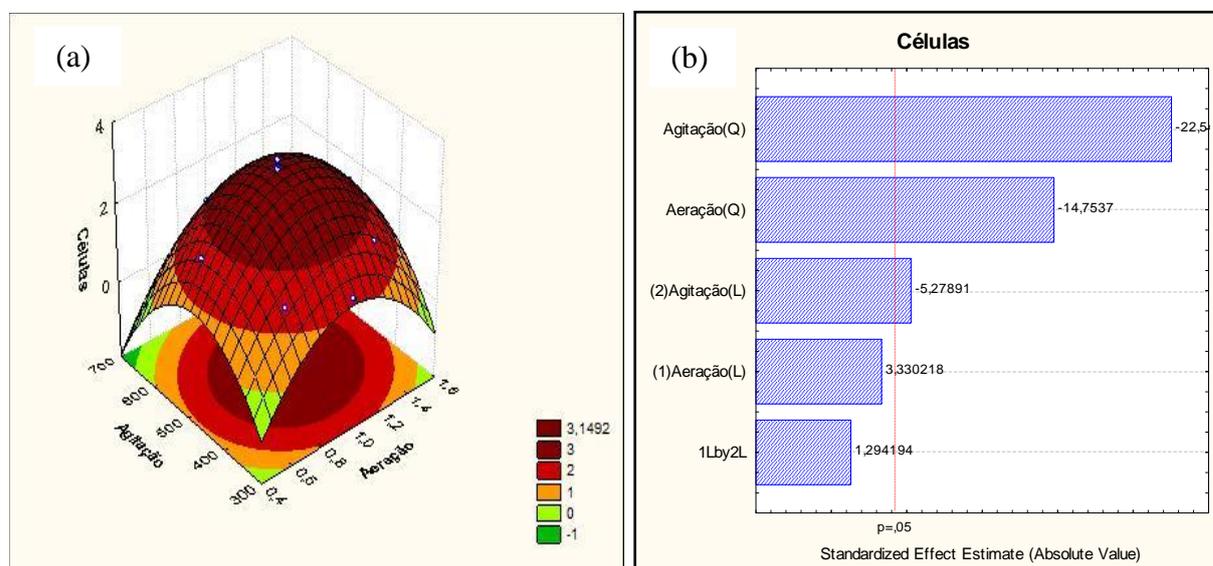


Figura 29. Superfície de resposta (a) e gráfico de Pareto (b) com o comportamento da massa celular, g.L^{-1} , (cepa 2103) em relação à agitação (rpm) e aeração (vvm).

A Tabela 16 mostrou que as melhores respostas de viscosidade aparente foram obtidos pelos pontos centrais, precisamente no ensaio 9, com agitação de 500 rpm e 1,0 vvm de aeração. Também foi verificado que os ensaios 4 (640 rpm de agitação e 1,3 vvm de

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

aeração) e 6 (500 rpm de agitação e 1,5 vvm de aeração) também apresentaram boa viscosidade aparente.

Para a resposta de viscosidade aparente foram calculados os coeficientes de regressão e os desvios padrão, mostrados na Tabela 16, o que mostra que as variáveis, agitação e aeração, foram significativas. O parâmetro quadrático (segundo grau) da agitação e da aeração foi significativo com significância > 95,0% de confiança e com $p < 0,05$ (Figura 30).

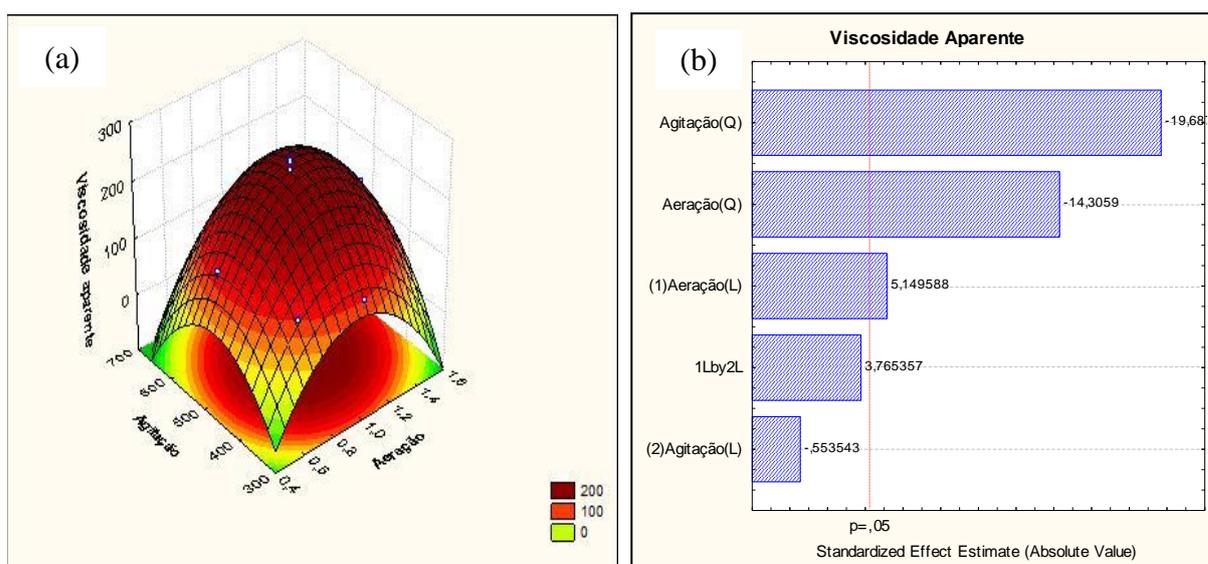


Figura 30. Superfície de resposta (a) e gráfico de Pareto (b) para viscosidade aparente, mPa.s, de goma xantana (cepa 2103) em relação à agitação (rpm) e aeração (vvm).

O aumento de escala de fermentação da glicerina bruta de shaker (80mL, Tabela 11) para bioreator (4,5L, Tabela 16) com a cepa 2103 não resultou no aumento da produção e redução do tempo de fermentação, mas resultou no aumento da viscosidade em aproximadamente 3 vezes. Portanto, uma menor quantidade do polímero pode ser usada como aditivo para a mesma função.

5.3.4 Resposta a 120 horas de fermentação - consumo de substrato e produção de goma xantana durante a fermentação do ensaio no ponto otimizado

As Figuras 31 e 32 apresentam os cromatogramas da separação da glicerina bruta antes e depois da fermentação a 120 horas e o perfil do consumo de glicerina bruta, concentração de biomassa e produção de goma xantana ao longo de fermentação, respectivamente, pela cepa 2103.

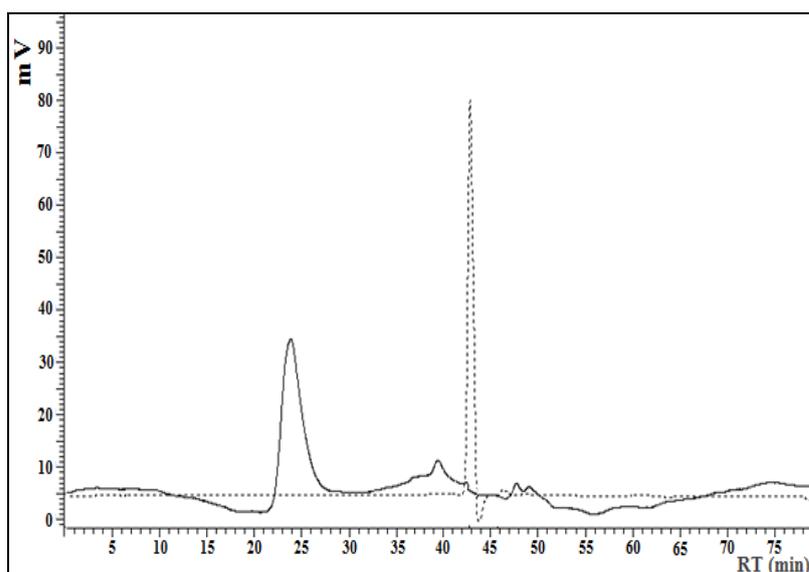


Figura 31. Cromatogramas da solução aquosa da glicerina bruta antes da fermentação com tempo de retenção de 23,55 minutos (----) e após 120 h de fermentação com tempo de retenção de 43,0 minutos (—).

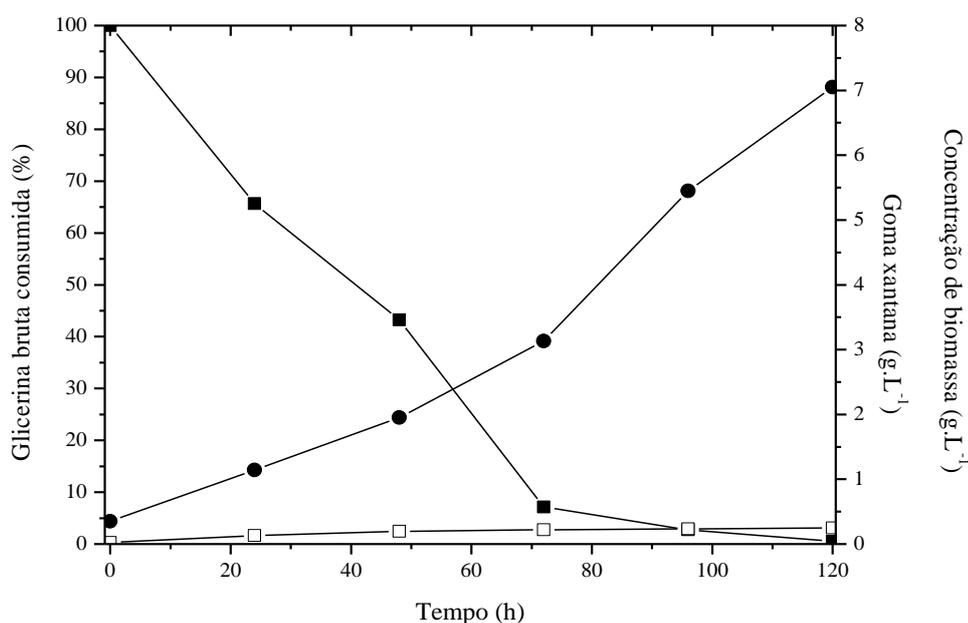


Figura 32. Comportamento do consumo da glicerina bruta, concentração de biomassa e produção de goma xantana pela cepa de *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103. (■) glicerina bruta (100% corresponde a 20 g.L⁻¹), (□) concentração de biomassa, e (●) goma xantana, a 500 rpm e 1,0 vvm (ponto otimizado).

Na Figura 32 é observado que a produção de goma xantana continua a aumentar durante as 120 h de fermentação até que toda a glicerina bruta seja completamente consumida. Em geral, durante a fermentação ocorre um aumento acentuado na produção de goma de xantana, seguido por um declínio devido à falta de uma fonte de carbono e a consequente

degradação do polímero por depolimerases liberados para o meio (DRUZIAN; PAPLIARINI, 2007; DINIZ; DRUZIAN; AUDIBERT, 2012).

Portanto, observou-se que a presença da glicerina bruta em meio fermentativo estimulou a produção de goma xantana, embora a glicose e a sacarose sejam as fontes de carbono convencionais utilizadas comercialmente. Outros estudos envolvem o uso de glicerina bruta em meios de cultura como no estudo da levedura *Yarrowia lipolytica* que produz ácido cítrico, quando cultivada em glicose ou glicerina bruta (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002). Várias pesquisas também investigaram e demonstrou que a goma xantana pode ser obtido a partir de resíduos agrícolas e industriais, utilizando fontes de carbono mais baratas, tal como o ácido cítrico (JANA; GHOSH, 1995), o soro de mandioca (BRANDÃO; ESPIRIDIDÃO; DRUZIAN, 2010) e o soro de leite (NERY *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009), uma vez que a utilização de glicose ou sacarose é um fator crítico para o custo de produção desse polissacarídeo (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

Para alcançar uma produção elevada de xantana, é necessário o acompanhamento regular do crescimento das células e a biossíntese de polissacarídeos durante o processo. A concentração de glicerina bruta de 2,0% adotada nessa fermentação foi considerada ótima para a biossíntese de xantana durante a fermentação, uma vez que este meio alternativo proporcionou melhores condições para o crescimento e acúmulo de goma xantana que a sacarose. Isto é consistente com diferentes estudos sobre as exigências nutricionais para a fermentação com *Xanthomonas*, visando à sustentabilidade do processo em relação ao custo-benefício da produção (CASAS *et al.*, 2000; GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000; DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007).

5.3.4.1 Cinética de consumo de glicerina bruta e formação de goma xantana no ponto otimizado

As relações cinéticas entre crescimento microbiano e a formação do biopolímero são importantes para definir a viabilidade econômica do processo de obtenção, bem como sua transferência para escala industrial. A velocidade e eficiência de formação de polímero são influenciadas pela natureza dos fatores limitantes de crescimento, quantidade de oxigênio dissolvido no meio, pH e temperatura.

O estudo cinético consiste na análise da evolução dos valores de concentrações iniciais, intermediários e finais de biomassa (X), substrato (S) e produto (P), em função do tempo. Partindo dos resultados obtidos da otimização, os estudos foram conduzidos utilizando

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

a goma xantana sintetizada sob agitação de 500 rpm, pH 7,0 e taxa de transferência do oxigênio de 1,0 vvm a 28°C por 120 horas no bioreator de 4,5 L (ponto otimizado). Alíquotas do meio fermentado foram coletadas assepticamente a cada 24 horas e avaliados as concentrações em gL^{-1} de substrato consumido, biomassa e de produto formado (Figura 32).

Nas primeiras 48 horas de fermentação, a formação de biomassa foi bastante acentuada, mantendo um crescimento pouco significativo até o final do processo. Quanto à formação de produto, houve aumento significativo após 48h, atingindo o máximo em 120 horas de fermentação ($6,37 \text{ gL}^{-1}$), instante em que praticamente se encerra o consumo da fonte de carbono disponível (glicerina bruta) (Tabela 18). Estes resultados constataam que a cepa 2103, nas condições de processo selecionadas no ponto otimizado, apresenta excelente capacidade de utilizar a glicerina bruta para a síntese de goma xantana, atingindo um consumo máximo de 93,37% após 120 horas de fermentação.

Tabela 18. Rendimentos ao longo de 120 horas de fermentação do ponto otimizado.

Parâmetros cinéticos	Tempo de fermentação (h)					
	0	24	48	72	96	120
Glicerina bruta* (g.L^{-1})	25,23±0,15	12,82±0,17	12,33±0,19	8,40±0,13	1,68±0,15	1,67±0,17
Biomassa* (g.L^{-1})	0,15±0,10	1,07±0,09	2,83±0,07	2,98±0,11	3,08±0,10	3,31±0,09
Goma xantana* (g.L^{-1})	0,09±0,12	0,62±0,10	1,04±0,12	3,13±0,11	4,79±0,15	6,37±0,09
$Y_{X/S}$	0,000	0,074	0,208	0,168	0,124	0,134
$Y_{P/S}$	0,000	0,042	0,073	0,181	0,199	0,266
Conversão S/X (%)	0,000	7,41	20,70	16,80	12,44	13,41
Conversão S/P (%)	0,000	4,27	7,36	18,06	19,96	26,65

* Médias em triplicatas.

$Y_{X/S}$ = Fator da conversão de substrato em biomassa.

$Y_{P/S}$ = Fator da conversão de substrato em produto.

Conversão S/X = % conversão do substrato em biomassa.

Conversão S/P = % conversão do substrato em produto.

O fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) nas 72 horas de fermentação deste trabalho (0,168) foi menor do que os obtidos por alguns autores: 0,33 (SERRANO-CARREON *et al.*, 1998); 0,31 (LETISSE *et al.*, 2001). E superior a 0,07 (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000); 0,04 (ROTTAVA, 2005).

A análise dos fatores de conversão mostra que quanto menor for o fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), melhor para o processo, pois ($Y_{X/S}$) baixos que mais substrato está disponível para ser convertido em produto, segundo Woiciechowki (2001) apud Rottava (2005).

Quanto ao fator de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$), o valor ao longo da fermentação atingido foi de 0,266, cerca de duas vezes maior do que o $Y_{X/S}$. Isso indica que a maior parte da glicerina bruta é utilizada para a formação de goma xantana pela cepa 2103, coincidindo com a máxima produção nesse ponto (6,373 gL⁻¹, Tabela 18).

O fator de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$) nas 72 horas de fermentação foi de 0,181 (Tabela 18) foi inferior ao encontrado por Ramos (2011) que obteve taxa máxima de 0,262 com goma xantana produzida em água produzida da indústria de petróleo. Rottava (2005) obteve valores entre 0,147 e 0,422 de conversão de sacarose em goma xantana avaliando 10 diferentes linhagens de *Xanthomonas*.

A conversão de substrato em goma xantana da cepa 2103 nestas condições de fermentação da glicerina bruta foi de 19,96% no tempo de fermentação 96 horas (Tabela 18). Rottava (2005) realizou estudos de várias cepas de *Xanthomonas*, onde a conversão de substrato em xantana variou de 14,66% a 28,66% em 96 horas de fermentação, e Ramos (2011) obteve 27,91% no mesmo período de tempo.

Segundo Moreira *et al.*, (2001), os rendimentos de goma xantana dependem da composição do meio e da linhagem da bactéria *X. campestris* utilizada, devido a possibilidade da deficiência de fonte de nitrogênio no meio, tornando a relação C:N inadequada o que dificulta a conversão de substrato em produto.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA GOMA XANTANA OBTIDA NO PONTO OTIMIZADO: ANÁLISE TÉRMICA, MASSA MOLECULAR E COMPOSIÇÃO MONOMÉRICA

5.4.1. Análise Térmica

A Figura 33 apresenta as curvas termogravimétricas TG e suas derivadas DTG para as xantanas, controle (GX Sacarose) e alternativo (GX Glicerina bruta) comparadas com a xantana aplicada comercialmente na área de petróleo (GX Comercial), quando submetidas a uma razão de aquecimento de 10°C min⁻¹, entre 0 e 400°C.

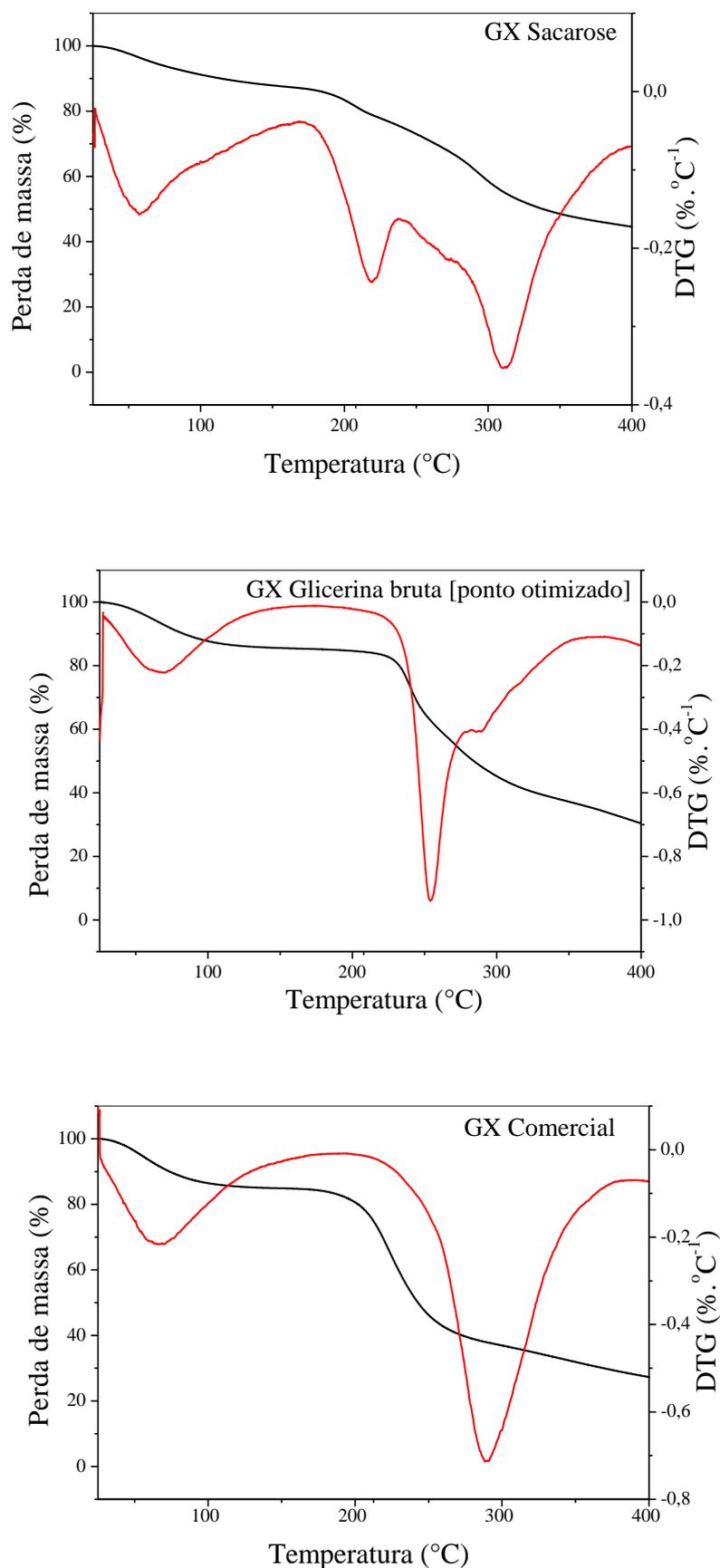


Figura 33. Curvas TGA e derivada (DTG) para as gomas xantana obtidas com a cepa 2103 por fermentação da sacarose (controle), glicerina bruta e xantana comercial.

A goma xantana obtida pela fermentação da glicerina bruta no ponto otimizado (0,1vvm de aeração e 500rpm de agitação) em bioreator 4,5L pela cepa 2103 foi caracterizada e comparada com as propriedades da xantana obtida pela fermentação da sacarose pela mesma cepa, além da goma xantana comercial. Para um estudo de estabilidade térmica da goma xantana, a técnica de termogravimetria (TGA) foi utilizada.

Na Figura 33 são observadas as perdas de massas das gomas xantana, onde constata-se um processo de desidratação (perda da água estrutural), seguido da degradação do biopolímero e carbonização da massa da xantana (VILLETTI *et al.*, 2002; HORN, 2008), cujas percentagens de perda e intervalos de temperatura, para em cada etapa das curvas de TGA das xantanas, são apresentados na Tabela 19.

Os resultados experimentais mostrados na Figura 33 indicam que a curva TGA referente à goma xantana obtida por fermentação da glicerina bruta apresenta um comportamento similar ao da curva da goma xantana comercial, sendo observado que a curva TG/DTG apresenta dois eventos características.

Tabela 19. Evento térmico, percentagens de perda de massa e intervalos de temperatura das gomas xantana GX Sacarose, GX Glicerina bruta e GX Comercial.

Goma Xantana	Evento térmico	Intervalo de temperatura (°C)	Temperatura de perda máxima de massa (°C)	Perda de Massa (%)
GX Sacarose	Perda de água superficial e estrutural	23,50 – 36,41	58,39	3,59
	Sacarose não convertida	170,57 – 237,69	218,35	9,45
	Degradação do polímero	277,42 – 384,98	310,58	31,97
Massa final				54,99
GX Glicerina bruta	Perda de água superficial e estrutural	24,80 – 68,71	52,27	6,33
	Degradação do polímero	220,41 – 279,56	252,96	49,90
	Glicerina não convertida	282,24 – 298,19	291,76	1,62
Massa final				42,15
GX Comercial	Perda de água superficial e estrutural	23,65 – 67,26	45,52	5,88
	Degradação do polímero	226,54 – 339,94	289,23	48,72
Massa final				45,40

Observa-se por comparação das temperaturas nas perdas máximas de decomposição do polímero que a goma xantana obtida por fermentação da glicerina bruta é similar ao da

goma xantana comercial, mostrando estabilidade térmica. Zohuriaan e Shokrolahi (2004) estudaram curvas térmicas de gomas naturais e modificadas, onde a goma xantana comercial (Aldrich) apresentou dois eventos com perdas de massa máximas de 8,7% (perda de água superficial e estrutural) e 41,6% (decomposição do polímero) nas temperaturas de 74,6°C e 290,8°C, respectivamente.

5.4.2. Massa Molecular

Biopolímeros solúveis em água são usados em várias operações do campo petrolífero, principalmente na recuperação avançada de petróleo (EOR) e em fluidos de perfuração de poços de petróleo, onde são usados para redução de água na produção de óleo e modificação de perfil como incremento da força gel favorecendo a estabilização de poços e evitando danos a formação. A resistência térmica desses polímeros é de grande importância para manutenção das funções diante das variações de temperatura dos poços de petróleo (CAI; HUANG, 2001). As temperaturas do reservatório de poços de petróleo variam de 70°C para mais de 150°C. No entanto, para efeitos práticos, a aplicação de polímeros em campos petrolíferos é restrita em reservatórios contendo óleo (petróleo) com viscosidade de 10-100 cP a temperaturas abaixo de 80°C (SHAH; ASHTAPUTRE, 1999).

As massas molares (MM) das gomas xantanas obtidas pela fermentação da sacarose e de glicerina bruta pela cepa de *Xanthomonas* 2103 foram determinados e comparados com o massa molar da goma xantana comercial aplicada em fluido de perfuração.

A MM está diretamente associada às propriedades reológicas da xantana, pois o tamanho do polímero e a estrutura terciária que conferem à solução aquosa a propriedade de ser viscosa (GALINDO, 1994). A exata determinação da MM é difícil devido ao alto peso molecular, à rigidez molecular e à tendência de formar agregados em solução (BORN *et al*, 2002).

De acordo com García-Ochoa *et al.* (2000), a MM da xantana está na faixa de 2 a 20 x 10⁶ Da. Holzwarth (1976) e Rosalam; England (2006) encontraram valores de 3,2-3,72 x 10⁶ Da e 13-50 x 10⁶ Da, respectivamente. Esta variação nas massas molares é influenciada pelo tipo de cepa, condições operacionais do processo fermentativo, mas principalmente pela composição do substrato. Portanto, estas variáveis devem ser minuciosamente estudadas e definidas para resultar num polímero com homogeneidade e conseqüentemente com qualidade

reprodutível. Os cromatogramas resultantes da injeção dos padrões de dextranas de diferentes MM estão demonstrados na Figura 34.

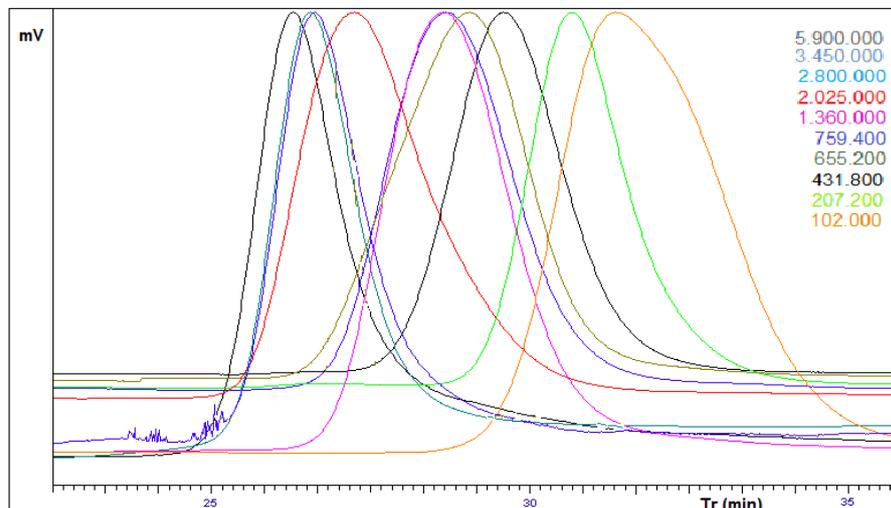


Figura 34. Cromatograma do perfil de eluição de padrões de dextranas com diferentes massas molares em GPC CLAE-IR usando as colunas Shodex SB 803, 804, 805 e 806 conectadas em série.

A partir dos cromatogramas, foi obtido os valores dos Tr (tempo de retenção) de cada padrão de dextrana (Tabela 20) e construída a curva de calibração do log MM de diferentes dextranas padrão versus Tr (min). A equação obtida dessa curva foi $y = -0,301x + 14,56$ com um coeficiente de correlação $R^2 = 0,97$.

Tabela 20. Tempos de retenção (Tr) dos padrões de dextranas com diferentes massas molares obtidas por GPC CLAE-IR usando as colunas Shodex SB 803, 804, 805 e 806 conectadas em série.

MM Dextranas	Tr (min)
102.000	31,56
207.200	30,83
431.800	29,75
655.200	29,2
759.400	28,83
1.360.000	27,29
2.025.000	27,22
2.800.000	26,91
3.450.000	26,68
5.900.000	26,43

Os cromatogramas GPC CLAE-IR das separações das gomas xantana são mostrados na Figura 35.

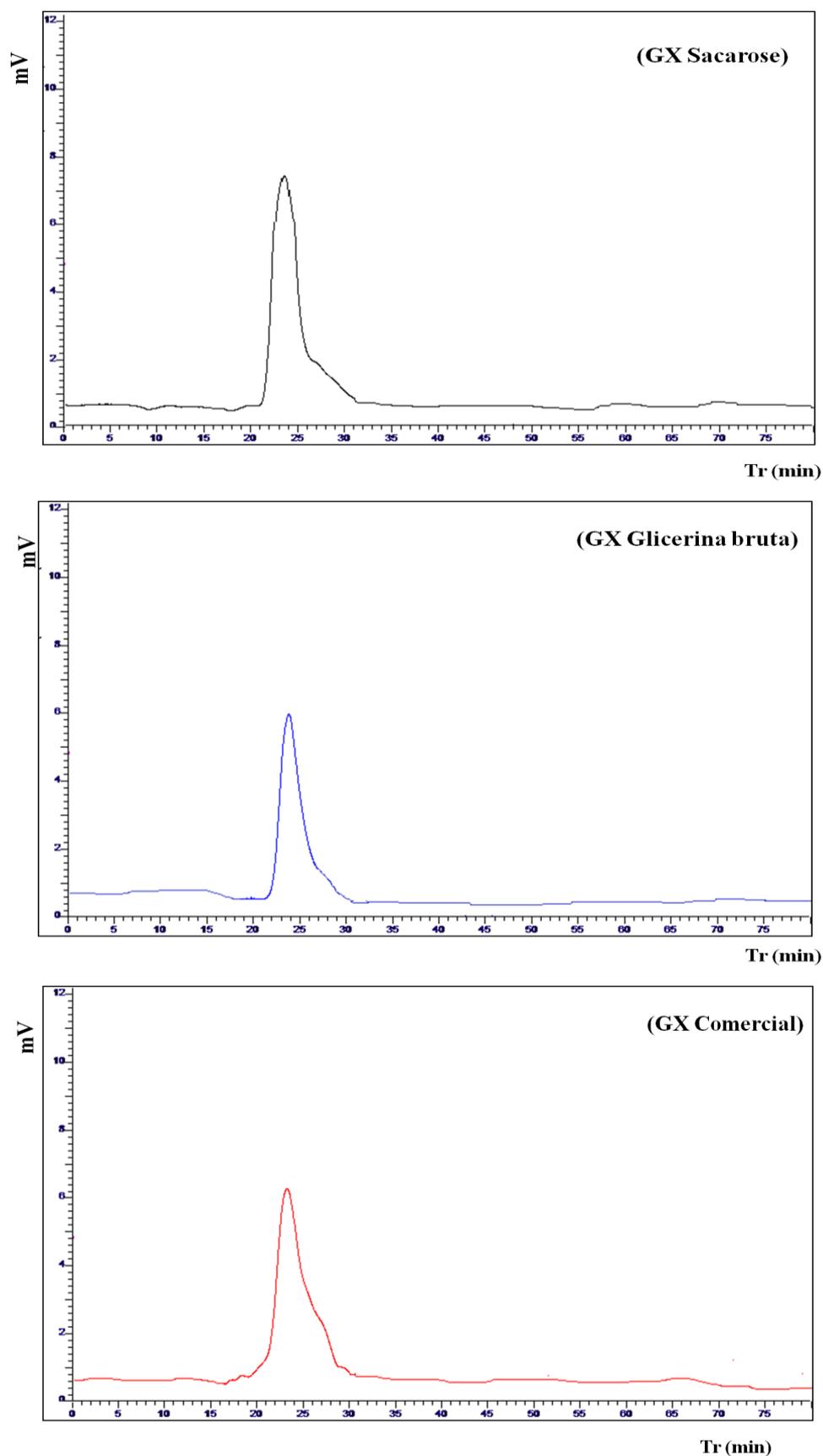


Figura 35. Cromatogramas GPC CLAE-IR separados em colunas Shodex SB 803, 804, 805 e 806 conectadas em série, das soluções aquosas da goma xantana obtida com sacarose com glicerina bruta e goma xantana comercial.

As diferenças observadas nas MMs médio ponderada das gomas xantana (Tabela 21) pode ser explicada com base na influência da composição do meio, as cepas de *Xanthomonas*, e as condições operacionais, que têm um impacto significativo sobre a estrutura molecular da goma sintetizada, gerando polissacarídeos com diferentes massas molares (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000). As diferenças encontradas podem ser atribuídas a glicerina, utilizado como substrato, enquanto que as gomas comerciais são obtidos a partir da fermentação da glicose.

Entretanto, constata-se uma MM maior de GX Glicerina bruta comparada com a da GX Sacarose, justificando a maior viscosidade aparente do biopolímero (Tabela 21). Vale ainda ressaltar que as escalas fermentativas para produção das gomas são diferentes, uma vez que a GX Comercial é obtida em escala industrial.

Tabela 21. Tempo de retenção (Tr), massa molar (MM) e da viscosidade aparente (μ) da goma xantana obtida da fermentação da sacarose e da glicerina bruta pela *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, comparada com a xantana comercial.

Goma Xantana	Tr (min)	MM x 10 ⁶ (Da)	μ^1 (mPa.s)
Obtida com sacarose	23,62	28,2	49,50
Obtida com glicerina bruta	23,55	29,6	69,50
Goma xantana comercial	23,26	36,2	140,80

¹0,5% solução aquosa de goma xantana a 25°C e 25 s⁻¹.

Observa-se que quanto menor o tempo de retenção maior é a massa molar da goma xantana e conseqüentemente a viscosidade aparente aumenta. Estes parâmetros são diretamente proporcionais e apresentam alta correlação (Figura 36).

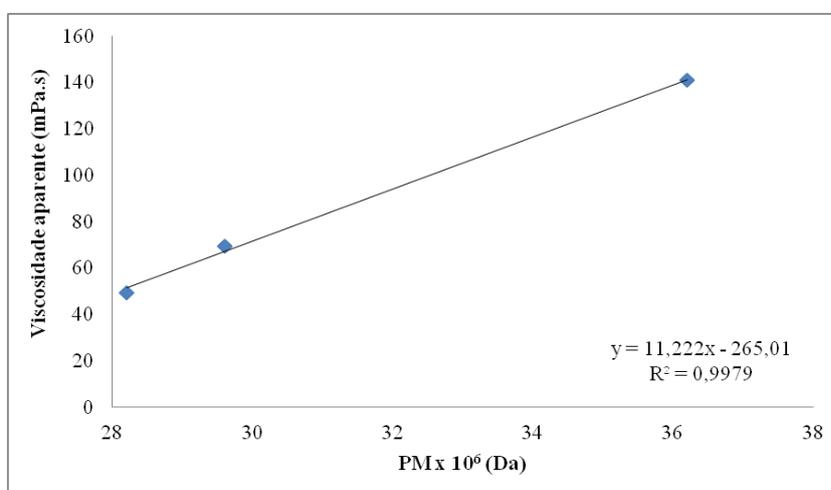


Figura 36. Correlação entre viscosidade aparente das gomas xantanas (mPa.s) e Massa molar (x10⁶ Da).

Segundo Katzbauer (1998), o alto peso molecular e a sua estrutura ramificada conferem a goma xantana uma alta viscosidade, mesmo em baixas concentrações. O uso de xantana com massa molar média ponderada, como a obtida em laboratório, resulta em géis mais aceitos pelos consumidores comparados àqueles preparados com a goma xantana comercial, por serem géis de baixa elasticidade, coesividade e mastigabilidade e por esse motivo são mais aceitos pelo consumidor (KIOSSEOGLOU *et al.*, 2003).

5.4.3. Composição Monomérica

Os cromatogramas resultantes da injeção dos padrões de açúcares (glicose e manose) e dos ácidos (glucurônico e pirúvico) bem como suas curvas de calibração estão mostrados nas Figuras 37 (A e B) e 38.

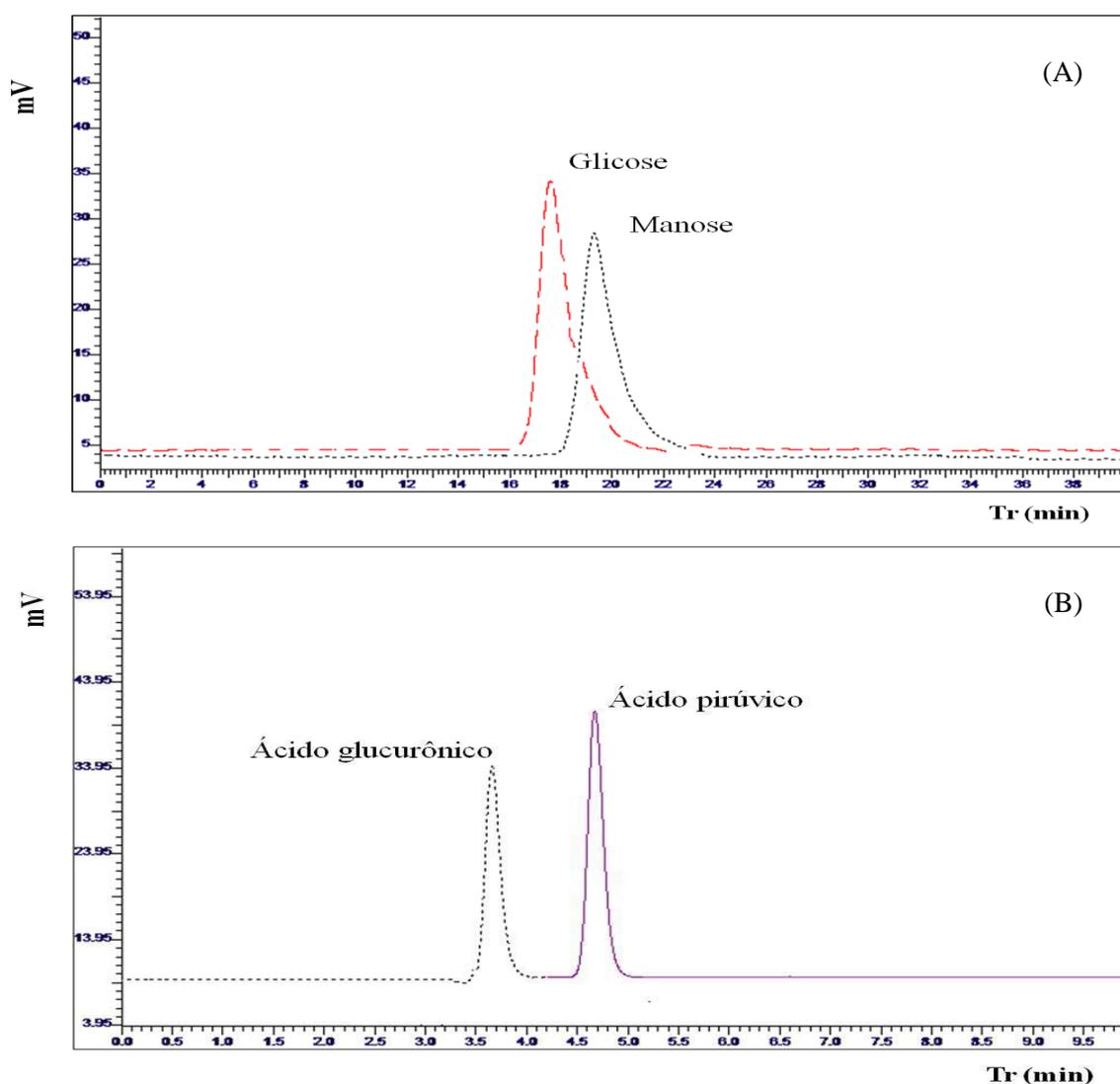


Figura 37. Cromatogramas dos padrões de açúcares (A) e ácidos (B) separados por CLAE-IR e UV, respectivamente.

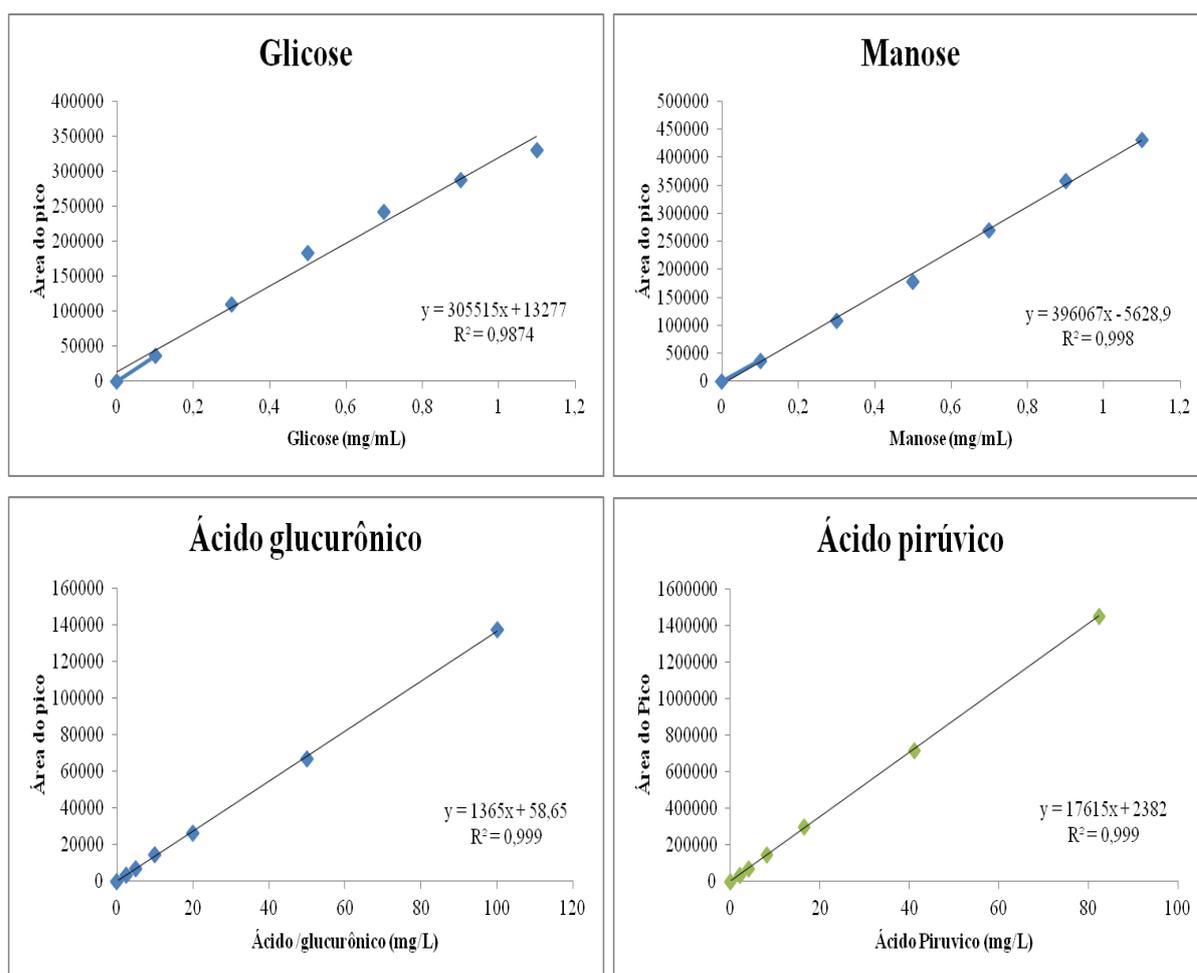


Figura 38. Curvas de calibração (área x concentração) dos açúcares (CLAE-IR) e dos ácidos (CLAE-UV).

Com as curvas de calibração dos padrões de açúcares e ácidos como mostrado na Figura 38 e os cromatogramas gerados dos açúcares e dos ácidos da goma xantana obtida da fermentação da glicerina bruna do ponto otimizado pela cepa 2103 (Figura 39) em bioreator 4,5L, foram calculados a percentagem dos monômeros e sua fração molar (Tabela 22).

A proporção glicose:manose:ácido glucurônico:ácido pirúvico foram similares na mesma condição de aeração e rotação usada na fermentação (Tabela 16).

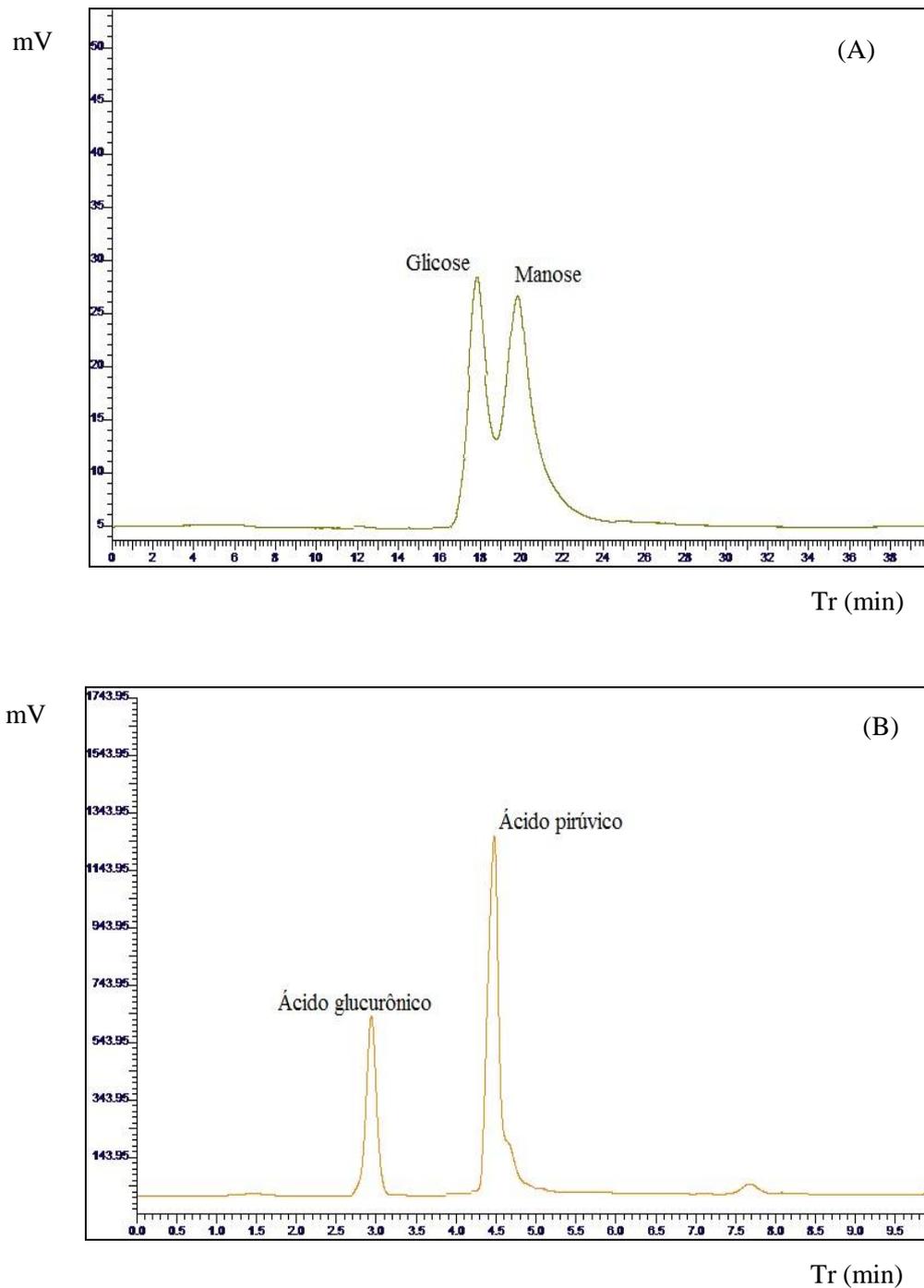


Figura 39. Cromatogramas dos açúcares (A) e ácidos (B) da goma xantana obtida pela fermentação da glicerina bruta com a cepa 2103 (ponto otimizado).

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Tabela 22. Composição monomérica das gomas xantana obtidas no ponto otimizado de acordo com o planejamento experimental com valores reais e com variação da aeração e agitação conforme a Tabela 16.

Variáveis independentes			Variáveis dependentes			
Ensaio	Aeração (vvm)	Agitação (rpm)	Glicose (%)	Manose (%)	Ác. Glucurônico (%)	Ác. Pirúvico (%)
9*	0 (1,0)	0 (500)	36,4	34,7	8,9	19,8
10*	0 (1,0)	0 (500)	41,7	31,0	11,5	15,6
11*	0 (1,0)	0 (500)	37,6	29,1	13,1	20,2
Média			38,6	31,6	11,2	18,6
Fração Molar			3,3	2,8	1,0	1,6

* Pontos centrais.

Observando a Tabela 22, as gomas sintetizadas no ponto otimizado apresentaram em comum em sua estrutura a média de açúcares neutros, glicose e manose, e os ácidos, glucurônico e pirúvico. A composição monomérica obtida para essas gomas resultaram numa proporção molar média de 3,3;2,8;1,0;1,6, para glicose: manose: ácido glucurônico:pirúvico, resultando provavelmente uma estrutura primária composta por unidades repetidas de heptassacarídeos formadas por três unidades de glicose, três de manose e uma de ácido glucurônico, diferentemente da estrutura primária normalmente relatada por xantanas produzidas por fermentação de glicose que é formada por um pentassacarídeo, com duas de glicose, duas de manose e uma de ácido glucurônico (VENDRUSCOLO, 2005; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). A variação da quantidade desses açúcares e ácidos varia em função da cepa utilizada e das condições de cultivo (LINDEN; LORIENT, 1996).

Nos estudos de Lesley e Hochster (1959), o polímero produzido pela bactéria *Xanthomonas phaseoli* contém D-glucose, D-manose e D-ácido glucurônico na proporção de 1:1:1. Após este trabalho, Sloneker e Jeanes (1962) estudaram o polissacarídeo produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris* cepa NRRL B-1459, e verificaram que é composto de mesmos monômeros na proporção 2,8:3,0:2,0; além de ácido acético e ácido pirúvico, na proporção 1,73:0,63.

A goma xantana, produzida pela cepa 2103 a partir da fermentação da glicerina bruta, apresentou em média 38,6% de glicose, 31,6% de manose, 11,2% de ácido glucurônico e 18,6% de ácido pirúvico (Tabela 22). Outros conteúdos de açúcares e ácidos em xantana foram avaliados por Shatwell *et al.* (1990) conseguiram resultados de 40,2% de glicose, 36,0% de manose, 23,8% de ácido glucurônico e 4,4% de ácido pirúvico da goma xantana

obtida com a cepa *X. campestris pv campestris* 646, enquanto Kennedy; Bradshaw (1984) apud García-Ochoa *et al.* (2000) obteve resultados de 30,1% de glicose, 27,3% de manose, 14,9% de ácido glucurônico e 7,1% de ácido pirúvico da xantana obtida com a cepa *X. campestris*. O polissacarídeo xantana produzido por diferentes espécies de *Xanthomonas* contém normalmente glucose, manose e ácido glucurônico (BORGES; VENDRUSCOLO, 2008; GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

O conteúdo de piruvato é um indicador importante para a avaliação do comportamento reológico da xantana (BORGES; VENDRUSCOLO, 2008). A goma xantana, obtida pela fermentação da glicerina bruta pela cepa 2103, apresentou uma alta concentração de ácido pirúvico (Tabela 22). Segundo Sandford *et al.* (1979), o conteúdo de piruvato pode ser usado como um indicador da qualidade reológica, e assim, xantanas com alto conteúdo de piruvato (> 4%) apresentam viscosidade superior àquelas com conteúdo inferior de piruvato (0,5 a 3%). Para Smith *et al.* (1981), as amostras com alto teor de piruvato aumentam a viscosidade das soluções de xantana porque o substituinte piruvato promove a associação e formação da macroestrutura pelo aumento da afinidade polímero-polímero, comparativamente à afinidade polímero-solvente. De acordo com Tako e Nakamura (1984), a xantana desacetilada apresenta maior viscosidade em altas concentrações, quando comparada a xantana nativa. Este fenômeno foi atribuído à formação de associação intermolecular mais intensa devido à desacetilação.

A composição química não influencia apenas a viscosidade, mas também as propriedades viscoelásticas. O efeito da presença de piruvato na interação macromolecular pode aumentar a capacidade gelificante da xantana, quando combinada com outros polímeros. Essa característica gelificante é importante para aplicação em fluidos de perfuração, onde a força gel tem função para a eficiente suspensão dos cascalhos durante a perfuração dos poços. Xantanas com alto grau de piruvatação formam um gel altamente termoresistente, enquanto xantanas depiruvatadas ou naturalmente livres de piruvato reduzem a interação, depreciando a formação do gel (LECHNER *et al.*, 1996).

5.5 CARACTERIZAÇÃO DA GOMA XANTANA PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO DA GLICERINA BRUTA PELA CEPA 2103 PARA FLUIDOS DE PERFURAÇÃO

O comportamento pseudoplástico e os parâmetros reológicos das soluções de biopolímeros influenciam diretamente nos projetos de equipamentos, processamento e aplicação das gomas. Na indústria do petróleo, precisamente em fluidos de perfuração, essas

propriedades reológicas são de grande importância no que diz respeito à área de perfuração de poços de petróleo.

5.5.1 Caracterização da goma xantana produzida pela cepa 2103 em bioreator como viscosificante polimérico em fluido de perfuração

A goma xantana obtida da fermentação da glicerina bruta pela cepa *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 na condição do ponto otimizado (Tabela 16) foi avaliada como viscosificante de fluido para aplicação na perfuração de poços de petróleo.

Como primeira avaliação foram aplicados os ensaios e parâmetros exigidos pelas normas Petrobras (2003) e Petrobras (2009), respectivamente. Os parâmetros reológicos obtidos mostram que a goma xantana oriunda da fermentação da glicerina bruta apresentou índices de consistência e de fluxo dentro dos limites estabelecidos pela Petrobras (2009), e similares aos da goma xantana comercial, apesar de 20 e 10% menores, respectivamente, e após o envelhecimento do fluido houve aumento em ambos (Tabela 23).

Tabela 23. Índices reológicos exigidos pela norma Petrobras para aplicação da goma xantana como viscosificante polimérico em fluidos de perfuração.

Goma Xantana	K (consistência), mPa.s ⁿ		n (fluxo)	
	AR ¹	DR ²	AR	DR
Glicerina bruta	5822,8±0,10 ^{Aa}	6342,6±0,08 ^{Ab}	0,21±0,10 ^{Ac}	0,21±0,01 ^{Ac}
Comercial	7149,4±0,09 ^{Ba}	7849,3±0,09 ^{Bb}	0,23±0,11 ^{Ac}	0,23±0,09 ^{Ac}
Valor estabelecido	1000 mínimo		0,5 máximo	

¹ Antes do envelhecimento do fluido na estufa de rolamento à 25°C.

² Depois do envelhecimento do fluido na estufa de rolamento à 50°C por 16 horas.

Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os índices de fluxo caracterizam um comportamento não-Newtoniano por apresentar $n < 1$, característica de um fluido pseudoplástico (Tabela 23). Os valores dos géis (G_0 , G_{10} e G_{30}) também apresentaram resultados dentro dos limites exigidos (Tabela 24). Os valores de G_0 , G_{10} e G_{30} apresentados pela goma xantana obtida da fermentação da glicerina bruta são aproximadamente 10% maiores do que as da goma xantana comercial, provavelmente, devido ao alto grau de piruvatação (Tabela 22).

Tabela 24. Valores dos géis inicial (G_0), 10 minutos (G_{10}) e 30 minutos (G_{30}) exigidos pela norma Petrobras (2009) para aplicação da goma xantana como viscosificante polimérico em fluidos de perfuração após o envelhecimento dos fluidos.

Goma Xantana	G_0 , lbf/100ft ²	G_{10} , lbf/100ft ²	G_{30} , lbf/100ft ²
Glicerina bruta	9,0	14,0	18,0
Comercial	8,0	13,0	17,0
Valor desejado	7,0 mínimo	10,0 – 15,0	20,0 máximo

Segundo Borges et al. (2009), baixos valores de índice de fluxo (n) são desejáveis para fluidos de perfuração para facilitar a injeção do fluido e melhorar a taxa de perfuração, enquanto valores altos de K são desejáveis, pois alta viscosidade favorece a formação de géis consistentes e assim mantém em suspensão os cascalhos gerados durante a perfuração de poços (SHAH; ASHTAPUTRE, 1999). Cabe salientar que os parâmetros reológicos, K e n , são dependentes da concentração de xantana e da qualidade do polímero (CANDIA; DECKWER, 1999).

5.6 FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FLUIDO DE PERFURAÇÃO BASE ÁGUA COMPOSTO DE GOMA XANTANA E GLICERINA BRUTA COMO LUBRIFICANTE

Visando a aplicação da norma Petrobras (2003) no estudo de reologia depois do rolamento em estufa com sistema giratório, como simulação da perfuração de um poço, foram testadas as soluções aquosas das gomas xantana (fluidos 1 e 2) e soluções aquosas de xantana contendo glicerina bruta como um aditivo de melhoramento da viscosidade em fluidos de perfuração visando a diminuição da quantidade de goma xantana utilizada (fluidos 3 e 4) (Tabela 25). O índice de fluxo (n) se manteve constante após o envelhecimento dos 4 fluidos a 50°C por 16 horas. O índice de consistência (K) apresentou variação, ou seja, a solução aquosa com xantana obtida a partir da fermentação da glicerina bruta (Fluido 1) foi maior que o obtido no Fluido 2 contendo goma xantana comercial. A adição da glicerina bruta ao fluido como lubrificante (Fluido 3) resultou em aumento significativo ($p < 0,05$) do índice de consistência, muito diferente quando comparado com o comportamento do Fluido 4, o qual quase não foi alterado pela adição da glicerina bruta. Portanto, a glicerina bruta usada como aditivo do fluido potencializa um efeito considerado quando usada com a xantana obtida a partir da mesma glicerina bruta como substrato alternativo, e isso favorece outra

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

aplicabilidade da glicerina bruta como uma alternativa para os sérios problemas, tanto ambiental como econômico, que esse co-produto gera.

Tabela 25. Valores dos índices reológicos K (mPa.s) e n após o envelhecimento dos fluidos a 50°C por 16 horas.

Fluidos ¹	K (consistência), mPa.s ⁿ	n (fluxo)
1	6342,6	0,21
2	7849,3	0,23
3	9176,6	0,23
4	7706,8	0,23

¹Fluido 1 = Água (500mL) + 30g NaCL, 0,1g CaCl₂, 0,04g MgCl₂ + 2,15g de Goma xantana obtida da fermentação da glicerina bruta.

Fluido 2 = Água (500mL) + 30g NaCL, 0,1g CaCl₂, 0,04g MgCl₂ + 2,15g de Goma xantana comercial.

Fluido 3 = Água (500mL) + 30g NaCL, 0,1g CaCl₂, 0,04g MgCl₂ + 1,07g de Goma xantana obtida da fermentação da glicerina bruta + 1,07 de Glicerina bruta.

Fluido 4 = Água (500mL) + 30g NaCL, 0,1g CaCl₂, 0,04g MgCl₂ + 1,07g de Goma xantana comercial + 1,07g de Glicerina bruta.

Para a confirmação do comportamento pseudoplástico dos quatro fluidos, segundo a norma Petrobras, foi realizado o ajuste do modelo de Ostwald-de Waele aos dados experimentais, a partir da lei de potência. Estes resultados estão apresentados na Figura 40 (tensão cisalhante x taxa cisalhante) para após o envelhecimento dos fluidos por 50°C por 16 horas.

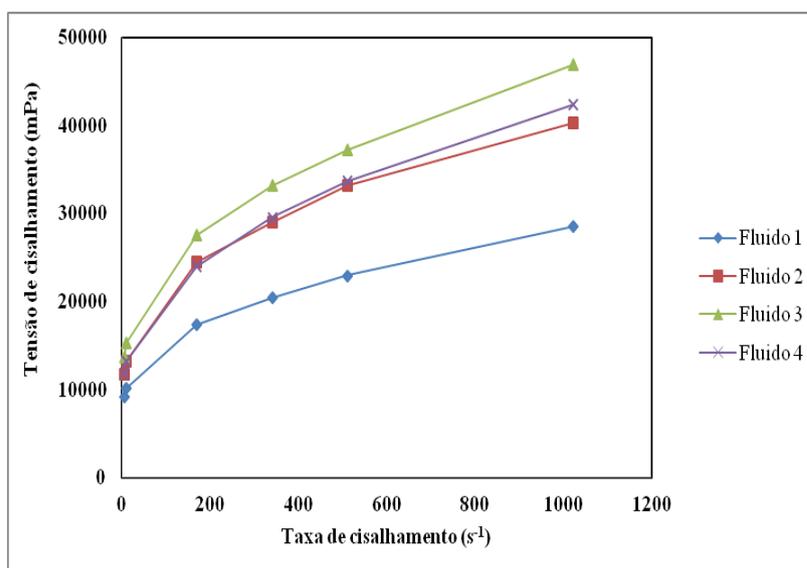


Figura 40. Comportamento dos fluidos após envelhecimento, avaliados segundo a variação da tensão de cisalhamento em diferentes taxas de cisalhamento.

Observa-se que os quatro fluidos apresentaram o mesmo comportamento com a variação da taxa de cisalhamento. O fluido 1 contendo goma xantana obtida por fermentação

da glicerina bruta apresentou os menores valores de taxa cisalhante, enquanto o fluido 3 contendo a mesma goma porém com adição de glicerina bruta como lubrificante apresentou os maiores valores (Figura 40).

Após a confirmação da adequação da goma xantana obtida por fermentação da glicerina bruta pela cepa de *Xanthomonas* 2103 em bioreator com as especificações das normas Petrobras para utilização do polímero como componente de fluido de perfuração de poços, essa goma e a comercial foram aplicadas em formulações comerciais de fluido de perfuração base água de acordo com o manual de fluidos da Carboflex (2011). Esse sistema de fluido de perfuração base água já é aplicado em várias companhias de serviço de fluido de perfuração e na própria Petrobras.

Para o melhor desempenho de um fluido de perfuração vários fatores devem ser considerados. Pode-se dizer que esses fatores são externos e internos em relação aos fluidos de perfuração. Fatores internos seriam as proporções ideais das quantidades de água, óleos, aditivos e outros. Fatores externos seriam os relacionados às condições da região a ser perfurada. Levando em conta os fatores internos, formulou-se fluidos contendo xantana e glicerina bruta para que se pudesse chegar a uma proposta mais adequada quanto a composição contendo menores quantidades de goma xantana, uma vez que é o componente mais caro da composição.

A Figura 41 mostra as proporções das 9 formulações dos fluidos de perfuração a base água, contendo diferentes quantidades (0,2 a 0,4%g) de goma xantana (comercial ou produzida por fermentação de glicerina bruta) e de glicerina bruta (1,0 a 4,0% m/m) em substituição ao lubrificante (ésteres graxos de polietileno glicóis), mantendo os demais constituintes (Água, Óxido de Magnésio, Cloreto de Magnésio II, Amido, CMC, Inibidor catiônico, Bactericida, Antiespumante, Carbonato de Cálcio e Baritina) em proporções fixas. O desempenho dos mesmos está relacionado na Tabela 26.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Tabela 26. Desempenho dos fluidos de perfuração contendo quantidades variáveis de goma xantana comercial (GX_{com}) ou a obtida por fermentação da glicerina bruta (GX_{gli}) com a cepa 2103 em bioreator 4,5L e de glicerina bruta como lubrificante.

F ¹	Goma xantana (%)	Glicerina bruta (%)	Respostas												
			Gel inicial (G ₀), lbf/100ft ²	Gel final (G ₁₀), lbf/100ft ²	L600 (cP)	L300 (cP)	L200 (cP)	L100 (cP)	L6 (cP)	L3 (cP)	Filtrado (mL)	VA (cP)	VP (cP)	CL (adm)	
GX _{gli}	1	0,20	1,00	4 ± 0,01	7 ± 0,02	38	17	14	10	4	3	4,2	19	21	0,22
	2	0,20	2,50	7 ^a ± 0,02	9 ± 0,05	48	33	26	19	6	5	5,5	24	15	0,15
	3	0,20	4,00	7 ^a ± 0,02	12 ^a ± 0,05	50	35	28	21	6	6	5,0	25	15	0,11
	4	0,30	1,00	9 ^b ± 0,03	13 ± 0,03	65	48	39	29	10	8	5,5	33	17	0,21
	5	0,30	2,50	9 ^b ± 0,02	12 ^a ± 0,03	61	44	36	27	10	8	5,2	31	17	0,14
	6	0,30	4,00	8 ± 0,05	8 ± 0,05	53	38	30	22	8	6	5,0	27	15	0,12
	7	0,40	1,00	9 ^b ± 0,02	14 ± 0,01	60	45	37	28	10	8	4,9	30	15	0,21
	8	0,40	2,50	10 ± 0,05	12 ^a ± 0,05	62	45	38	29	10	8	5,0	31	17	0,15
	9	0,40	4,00	7 ^a ± 0,07	9 ± 0,06	66	48	39	29	11	9	5,5	33	18	0,09
GX _{com}	1	0,20	1,00	7 ± 0,03	10 ± 0,04	43	29	22	16	7	6	3,8	22	24	0,20
	2	0,20	2,50	8 ± 0,04	11 ± 0,05	44	35	25	18	7	6	4,2	22	9	0,16
	3	0,20	4,00	9 ± 0,03	12 ^a ± 0,05	52	39	29	20	8	7	4,2	26	13	0,11
	4	0,30	1,00	10 ± 0,02	12 ^a ± 0,06	64	49	37	30	12	9	4,4	32	15	0,21
	5	0,30	2,50	12 ^a ± 0,03	13 ^b ± 0,06	61	46	38	32	13	10	4,2	31	15	0,15
	6	0,30	4,00	12 ^a ± 0,05	13 ^b ± 0,05	54	40	39	34	13	10	4,1	27	14	0,12
	7	0,40	1,00	11 ^b ± 0,05	14 ± 0,07	64	47	34	29	14	10	4,2	32	17	0,21
	8	0,40	2,50	11 ^b ± 0,06	15 ± 0,05	65	46	36	30	15	9	4,4	33	19	0,14
	9	0,40	4,00	12 ^a ± 0,04	16 ± 0,03	68	49	37	32	15	10	4,0	34	19	0,12
Limites*				7-12	10-15	45-85	34-65	28-55	20-45	6-15	5-10	≤ 10	≥ 20	≥ 10,0	0,09 – 0,12

F¹ = Formulações dos fluidos de perfuração contendo diferentes teores de gomas xantana e glicerina bruta. Componentes em teores fixos: Água (318 mL); Óxido de Magnésio (0,5 g); Cloreto de Magnésio II (7,0 g); Amido (6,0 g); CMC (2,0 g); Inibidor catiônico (6,0 g); Bactericida (0,25 g); Antiespumante (6,0 gotas); Carbonato de Cálcio (10,0 g) e Baritina (10,0 g), totalizando em todas as formulações 366,15 g.

GX_{gli}: Goma xantana obtida da fermentação produzida com glicerina bruta; GX_{com}: Goma xantana comercial.

G₀: força gel em 10 segundos; G₁₀: força gel em 10 minutos; L600 = leitura reológica direta a 600 rpm; L300 = leitura reológica direta a 300 rpm; L200 = leitura reológica direta a 200 rpm; L100 = leitura reológica direta a 100 rpm; L6 = leitura reológica direta a 6 rpm; L3 = leitura reológica direta a 3 rpm; e Filtrado = volume de perda de líquido do fluido sob pressão 100 psi; VA = Viscosidade aparente; VP = Viscosidade plástica; CL = Coeficiente de Lubricidade.

* Limites estabelecidos pela norma Petrobras (2009) e pelo manual de Fluidos de perfuração base água da Carboflex. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey.

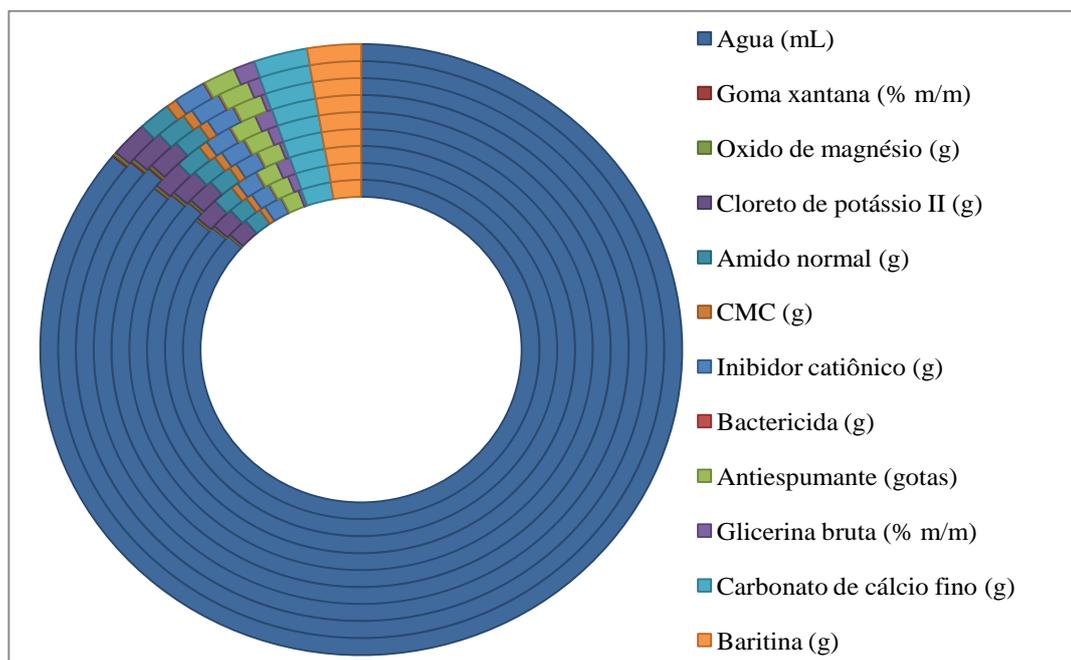


Figura 41. Composição percentual dos componentes sólidos dos fluidos de perfuração formulados com quantidades variáveis de gomas xantana e com glicerina bruta do biodiesel como lubrificante.

Embora os testes laboratoriais não necessariamente reflitam as diferentes condições encontradas durante a perfuração de um poço, eles são a única maneira de avaliar as características e propriedades desses fluidos definindo suas aplicações. Entre as principais vantagens dos fluidos a base de água é que são recomendados para exploração em rochas superficiais, em situações aonde o rigor da legislação ambiental é maior, além do que podem também ser utilizados em uma gama extensa de formações rochosas. Já os fluidos de perfuração à base de óleo e os de base sintética produzem menores e melhores coeficientes de lubricidade (CL) do que os fluidos à base de água, contudo, sua utilização está cada vez mais limitada em virtude dos impactos ambientais devido à toxicidade e alto custo (ARGILLIER *et al.*, 1996).

É observado na Tabela 26 que para a força gel inicial G_0 , entre as respostas dos fluidos que contém a goma xantana obtida por fermentação da glicerina bruta do biodiesel (2, 3 e 9) não existe diferenças significativas ($p > 0,05$), assim como, entre as respostas das formulações dos fluidos 4, 5 e 7. Para a força gel G_{10} também as respostas dos fluidos 3, 5 e 8 não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Para os fluidos que possuem a goma xantana comercial, entre os fluidos 5, 6 e 9 não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) e entre os

fluidos 7 e 8 também não existem diferença para força gel inicial. A força gel é um parâmetro de natureza reológica, que indica o grau de gelificação. A força gel G_0 mede a resistência inicial para colocar o fluido em fluxo. Entre a força gel 10 minutos dos fluidos 3 e 4 não existe diferença significativa ($p > 0,05$) e esse mesmo efeito ocorreu entre os fluidos 5 e 6. A força gel final, G_{10} , mede a resistência do fluido para reiniciar o fluxo quando este permanece certo tempo em repouso devido a manobras e conexões. A diferença entre as forças géis indica o grau de tixotropia do fluido. Esse comportamento é desejado para evitar a sedimentação dos sólidos perfurados. O ideal é ter uma gelificação rápida e não progressiva (THOMAS, 2001; BORGES *et al.*, 2009).

Observa-se que os fluidos 3, 4, 5, 7 e 8 compostos de goma xantana produzida pela cepa 2103 a partir da fermentação da glicerina bruta (Ensaio do ponto otimizado, Tabela 26) e as formulações 3 a 8 contendo goma xantana comercial, ambas contendo diferentes teores de glicerina bruta como lubrificante (1 a 4%) apresentam todos os parâmetros reológicos e de filtrado de acordo com os especificados pela norma Petrobras (2009) e manual de fluido de perfuração base água da Carboflex (2011). Os elevados valores de viscosidade aparente (VA), principalmente em baixas concentrações das gomas xantana (0,2%) são consequências da utilização conjunta do biopolímero microbiano e glicerina bruta que agem como viscosificante e lubrificante. Esse comportamento deve-se ao tamanho da cadeia de goma xantana, uma vez que polímeros de cadeia longa agem como viscosificante. O valor do volume de filtrado (≤ 10 mL), considerado adequado para este tipo de fluido, deve-se a utilização de CMC, que possui cadeias poliméricas curtas, agindo como redutor de filtrado (FARIAS *et al.*, 2009).

Constata-se de maneira geral que com o aumento dos teores de lubrificante, glicerina bruta, dos fluidos que contem quantidades fixas das gomas xantana, há uma variação de todos os parâmetros, especialmente nos valores de VA e VP (viscosidade plástica), sendo esta variação mais acentuada nos fluidos formulados com goma xantana comercial (Tabela 26). Entretanto, todos os fluidos apresentaram resultados de VA e VP de acordo com os padrões especificados pela norma Petrobras (2009) e manual de fluido de perfuração base água da Carboflex (2011). Observa-se também que o aumento da adição do lubrificante aos fluidos contribuiu para um leve aumento das perdas por filtração, contudo o aumento no teor de lubrificante não conduz a maiores reduções do volume de filtrado, ou seja, os valores do volume de filtrado mantiveram-se praticamente inalterados com adições de 1,0; 2,5 e 4,0% do

lubrificante. De maneira pontual, o fluido 1 (preparado com 1,0% de lubrificante) apresentou filtrado de 4,2 mL e o fluido 3 (preparado com 4,0% de lubrificante), de 5,0 mL. Comparando os resultados obtidos com os padrões especificados pela norma Petrobras de manual da Carboflex, observa-se que todos os fluidos apresentam valores de volume de filtrado inferiores ao máximo especificado (10 mL), recomendado pela norma. De acordo com Ferraz (1977), o reboco é formado pela disposição das partículas de argila nas paredes do poço à medida que a fase líquida (água) do fluido penetra nos seus poros. A espessura do reboco aumenta enquanto o fluido ceder água para as formações geológicas com as quais está em contato. Ao alcançar determinada espessura e impermeabilizar o poço, impede a perda de água por filtração, em virtude da pouca variação nos valores de volume de filtrado.

Os valores de coeficiente de lubricidade (CL) (Tabela 26) sofreram redução com a adição do lubrificante aos fluidos, confirmando a eficiência do aditivo estudado, como observado para os fluidos que contém 4,0% de glicerina bruta que apresentaram CL de 0,11 e 0,12, sendo praticamente independente do tipo de goma xantana usada. Essa redução do coeficiente de lubricidade ocorreu com o aumento da concentração do lubrificante, comprovando mais uma vez a eficiência deste aditivo, e que a concentração de 4,0 % é suficiente para promover uma adequada lubricidade ao fluido (Tabela 26). A característica lubrificante é uma importante propriedade para os fluidos de perfuração, visto que uma boa lubrificação promove uma alta eficiência na perfuração e diminui o desgaste da broca de perfuração (FARIAS *et al.*, 2009). Estudos comprovam que fluidos de alto desempenho base óleo, que são considerados como bons lubrificantes, apresentam coeficientes de lubricidade em torno de 0,110 (VIDAL *et al.*, 2007).

Para os fluidos contendo 0,3 % das gomas xantana (Fluido 4, 5 e 6), a redução da VA deve-se, provavelmente, as ligações de hidrogênio entre as moléculas do lubrificante e a dos polímeros, e a simultânea interação com compostos com cargas, uma vez que a glicerina bruta contem principalmente poliálcool solúvel em água além de outros componentes (Tabela 67), que podem possuir caráter tensoativo. Portanto, dependendo da concentração, quando adicionado a um fluido contendo diferentes compostos pode também agir como dispersante, pois neutraliza as cargas presentes nas superfícies destes. Este comportamento também foi evidenciado em estudos desenvolvidos por Amorim *et al.* (2008). Para os fluidos aditivados com os lubrificantes, o aumento ou a redução da VA deve-se à ação solubilizante ou dispersante deste aditivo, como já comprovado em estudos anteriores (AMORIM *et al.*, 2008;

MEDEIROS *et al.*, 2008). Os lubrificantes indicados pela norma Petrobras são ésteres derivados de óleos vegetais (ésteres graxos de polietileno glicóis), insolúveis em água, que formam gotículas estabilizadas quimicamente pelos componentes dos fluidos. Essas gotículas são extremamente pequenas, dando a impressão de que se trata de um produto solúvel, e são responsáveis pela lubricidade dos fluidos e possuem ação dispersante.

Growcock *et al.* (1998), investigaram vários aditivos lubrificantes com o objetivo de conhecer quais eram eficientes na redução do coeficiente de lubricidade de fluidos hidroargilosos e de fluidos poliméricos e concluíram que o desempenho do lubrificante é aparentemente independente do tipo de fluido, embora tenha o seu desempenho diminuído com o aumento da quantidade de sólidos e de componentes da superfície ativa.

Muitos estudos vêm sendo realizados a fim de se obter fluidos base água que aditivados com polímeros e lubrificantes apresentem propriedades adequadas. Segundo Argillier *et al.* (1996), os fluidos à base de água podem substituir os fluidos à base de óleo, porém em perfurações que envolvem grandes profundidades, os fluidos à base de água ainda não atendem todas as exigências técnicas necessárias para uma boa operação da perfuração, principalmente devido à sua baixa capacidade de lubrificação.

Portanto ao avaliar os efeitos de diferentes concentrações gomas xantana e de glicerina bruta do biodiesel como lubrificante para aplicação em fluidos de perfuração, constata-se que:

- a adição de glicerina bruta como lubrificante nos fluidos altera os parâmetros reológicos (VA e VP), porém não compromete o seu desempenho, apresentando valores de acordo com os especificados pela norma Petrobras (2009) e manual de fluidos de perfuração base água da Carboflex (2011);

- com a adição de glicerina bruta houve pequenas variações nas propriedades de filtração ao ser reduzida a quantidade de goma xantana de qualquer origem, contudo não produz nenhum efeito adverso;

- as diferentes concentrações de glicerina bruta utilizadas não apresentam influência significativa nas propriedades dos fluidos;

- o teor mínimo de 4,0% de glicerina bruta como lubrificante com 0,2% de goma xantana é suficiente para adequar a capacidade lubrificante dos fluidos e melhorar o desempenho reológico;

- a maioria das formulações dos fluidos estudados apresentaram valores dos parâmetros compatíveis com os apresentados por fluidos de perfuração base água, de acordo com dados da literatura.

Neste contexto e visando a diminuição do custo da formulação dos fluidos de perfuração base água, por um lado devido a diminuição da quantidade de goma xantana e por outro substituindo o lubrificante derivado de óleos vegetais (ésteres graxos de polietileno glicóis) por glicerina bruta, co-produto do biodiesel, constata-se que a formulação 3 contendo 0,2% do biopolímero e 4% do lubrificante além da água (318 mL); Oxido de Magnésio (0,5 g); Cloreto de Magnésio II (7,0 g); Amido (6,0 g); CMC (2,0 g); Inibidor catiônico (6,0 g); Bactericida (0,25 g), Antiespumante (6,0 gotas); Carbonato de Cálcio (10 g) e Baritina (10 g) totalizando 366,15 g pode ser considerado o melhor fluido. Vale ressaltar que as normas Petrobras (2009) e Petrobras 2605 (2003), e manual de fluidos de perfuração base água da Carboflex (2011) indicam a utilização de 0,2% a 1,0% de goma xantana para fluidos de perfuração base água, entretanto o polímero, que é o componente mais caro da composição, é usado sempre no limite superior da faixa.

Neste contexto e considerando a não anterioridade da formulação do fluido nas bases de patentes e de outros documentos científicos foi depositado pelos inventores a patente intitulada *Formulação de fluido de perfuração à base de água com glicerina e baixo percentual de goma xantana*, em co-titularidade UFBA e Empresa Carboflex, junto ao INPI (Protocolo 011120000069, 2012).

6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

6.1 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos e discutidos, pode-se enunciar as seguintes conclusões:

- Das doze cepas de *Xanthomonas* testadas, apenas sete produziram gomas xantana a partir da fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel nas condições testadas.
- Os maiores rendimentos de goma xantana aliada a maior viscosidade aparente (0,5%, 25°C e 25s⁻¹) foram obtidos pela bioconversão de glicerina bruta com as cepas 2103 (5,5g.L⁻¹e 69,50 mPa.s) e 356 (1,24 g.L⁻¹ e 67,16 mPa.s) em shaker (25°C, 250 rpm, 120h).
- Com intuito de aumentar a produção de xantana com a cepa 356, a utilização do planejamento estatístico a variação de concentração de glicerina bruta e do inóculo, resultou um rendimento máximo de 1,38 g.L⁻¹ em shaker. A fermentação em bioreator 4,5L resultou em aumento significativo de goma xantana e da viscosidade aparente, como também na redução do tempo de fermentação.
- Na otimização das condições fermentativas, a produção máxima de goma atingida pela cepa 2103 em bioreator 4,5L foi de 6,34 g.L⁻¹ com viscosidade aparente de 252,38 mPa.s (0,5%, 25°C e 25s⁻¹) numa agitação de 500 rpm e 1,0 vvm de aeração, correspondendo ao ponto central do planejamento. Ao passar da fermentação em *shaker* a bioreator resultou em um aumento da viscosidade aparente apesar da produção de xantana ser a mesma em shaker, permitindo usar menor quantidade de goma para uma mesma aplicação. Esses resultados influenciaram na viscosidade aparente e no peso molecular, que foram similares ao da goma comercial, apesar das diferentes escalas de produção.

- A caracterização da goma xantana obtida por fermentação da glicerina bruta pela cepa 2103 nas condições do ponto otimizado mostrou viscosidade aparente, peso moleculares, composição e curva termogravimétrica próxima a xantana comercial. A composição monomérica da goma xantana obtida a partir da fermentação da glicerina bruta mostrou conter glicose, manose e ácido glucurônico, além de alto teor de ácido pirúvico resultando em um indicador de qualidade reológica na goma.
- A goma xantana obtida da fermentação da glicerina bruta apresentou comportamento pseudoplástico característico de xantana.
- A goma xantana obtida pela fermentação da glicerina pode ser utilizada para aplicação na área petroquímica por apresentar parâmetros reológicos próximos aos da xantana comercial.
- O emprego de 1,0% a 4,0% de glicerina bruta em substituição ao lubrificante juntamente com a goma xantana no limite inferior da faixa (0,2% a 0,4%) mostram parâmetros dentro dos limites estabelecidos pela norma Petrobras e manual Carboflex, com redução da quantidade de xantana necessária, representando redução de custo do fluido, aliada a utilização do co-produto do biodiesel. Neste contexto, foi depositado a patente *Formulação de fluido de perfuração à base de água com glicerina e baixo percentual de goma xantana*, em co-titularidade UFBA e Empresa Carboflex, junto ao INPI (Protocolo 011120000069, 2012).

6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar as quantidades de goma xantana e de glicerina bruta no fluido de perfuração através de um estudo de variação de um planejamento estatístico 2^2 e após o ponto ótimo aplicar um planejamento 2^2 estrela próximo deste ponto.
- Estudar o uso de reologia dinâmérica para verificação da ocorrência de formação de gel verdadeiro ou pseudogel.
- Estudar o valor do índice de consistência (K) obtida da produção de goma xantana com a influência da taxa de cisalhamento e temperatura.

7 REFERÊNCIAS

ABDEL-FATTAH, Y. R.; SAEED, H. M.; GOHAR, Y. M.; EL-BAZ, M.A. **Improved production of *Pseudomonas aeruginosa* uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs.** Process Biochemistry, v. 40, p.1707-1714, 2005.

ABDEL-FATTAH, Y. R.; OLAMA, Z. A. **L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs.** Process Biochemistry, v. 38 (1), p.115-122, 2002.

AGUIAR, A. A.; SILVA, I. P. G.; MELO, M. A.; COSTA, A. L. H. **Influência da taxa de cisalhamento, concentração e temperatura na viscosidade de dispersões de poliacrilamida.** Anais 65º Congresso Anual da ABM, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2010.

AHMED, J.; RAMASWAMY, H. S. **Effect of high-hydrostatic pressure and concentration on rheological characteristics of xanthan gum.** Food Hydrocolloids, v. 18, p. 367-373, 2003.

AIE. **Relatório gerencial: crescimento de petróleo do Mundo.** Agência Internacional de Energia, 2012.

ALMEIDA, E.; ARAÚJO, L. R. **Análise econômica dos indicadores sobre poços perfurados.** Petróleo & Gás, n. 2, p.4-6, 2002.

AMORIM, L. V.; PEREIRA, M. S.; FERREIRA, H. C. **Fluidos Hidroargilosos: Comportamento Reológico, de Filtração e Lubricidade.** Rio Oil e Gas Expo and Conference, Rio de Janeiro, 2008.

AMORIM, L. V.; FARIAS, V. F.; SILVA, A. R. O.; PEREIRA, M. S.; LIRA, H. L.; FERREIRA, H. C. **Desenvolvimento de formulações de fluidos base água para perfurações de poços de petróleo – estudo preliminar.** 4ºPDPETRO, Campinas, 2007.

AMORIM, L. V.; FARIAS, K. V.; BARBOSA, M. I. R.; PEREIRA, E. K. B.; FRANÇA, L.; FERREIRA, H. C. **Fluidos de perfuração a base de água. Parte I: Efeitos de aditivação poliméricas nas propriedades reológicas.** Revista Cerâmica, São Paulo, 2005.

ANP. **Relatório gerencial: situação de produtores de biodiesel.** Agência Nacional de Petróleo, 2006.

ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. C.; VENDRUSCOLO, C. T. **Viscosidade aparente de biopolímeros produzidos por diversas cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni*.** Ciência e Engenharia, v. 9, n. 1, p. 83-87, 2000.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis of AOAC International.** 16th ed., Horwitz, W., Maryland: Gaithersburg, 1997.

ARAÚJO, T. A.; FARIA, S.; FRANÇA, F. P.; CARDOSO, V. L. **Avaliação do comportamento reológico dos diferentes meios de produção de goma xantana a partir do caldo de cana**. Campinas: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química de Iniciação Científica - COBEQ, 2005.

ARGILLIER, J. F.; AUDIBERT, A. **Development of a new non-polluting ester based lubricant for water based muds: laboratory and field tests results**. Institut Francais Du Petroleo & Janssen, M. & Demoulin, A., Fina Research S.A., 1996.

ASHTAPUTRE, A. A.; SHAH, A. K. **Studies on the exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*-GS1: Nutritional requirements and precursor-forming enzymes**. Current Microbiology, v. 31, p. 234-238, 1995a.

ASHTAPUTRE, A. A.; SHAH, A. K. **Studies on a viscous, gel-forming exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*-GS1**. Applied and Environmental Microbiology. V. 61:3, p. 1159-1162, 1995b.

ASHTAPUTRE, A. A.; SHAH, A. K. **Emulsifying property of a viscous exopolysaccharides from *Sphingomonas paucimobilis***. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 11, p. 219-222, 1995c.

GULREZ, S. K. H.; AL-ASSAF, S.; FANG, Y.; PHILLIPS, G. O.; GUNNING, A. P. **Revisiting the conformation of xanthan and the effect of industrially relevant treatments**. Carbohydrate Polymers, 90, p.1235– 1243, 2012.

BAGLEY, E. B. **Physical properties of foods**. New York: AVI, p. 1-37, 1983.

BAIG, S.; AHMAD, H. S. **Effect of agitator configuration and rotational speed on the production of extracellular polysaccharide by *Xanthomonas curcubitae* PCSIR B-52**. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 79, n. 6, p. 572-578, 1995.

BAIOCCO, L. M. **Estudo de Parâmetros para a Produção de Inóculos Liofilizados de *X. campestris* pv. *Manihotis***. Unicamp, São Paulo, 1997.

BANDINO Jr, A. C.; SCHMIDELL, W. **Variação de escala**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. 1ªed, v. 2, São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, p. 333-354, 2001.

BANIK, R. M.; KANARI, B.; UPADHYAY, S. N. **Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential**. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 16, p.407-414, 2000.

BECKER, A.; KATZEN, F.; PUHLER, A.; IELPI, L. **Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective**. Appl Microbiol Biotechnol, v. 50, p.145-152, 1998.

BERWANGER, A. L. S. **Produção e caracterização de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata***. Rio Grande do Sul: Dissertação de Mestrado, Mestrado em Engenharia de Alimentos, Campus de Erechim, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, p. 96, 2005.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** Can. J. Biochem., v. 37, p. 911-17, 1959.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T.; MARTINS, A. L.; LOMBA, R. F. T. **Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo.** Polímeros: Ciência e Tecnologia, v. 19, n. 2, p. 160-165, 2009.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. **Goma Xantana: características e condições operacionais de produção.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 29, n. 2, p. 171-188, 2008.

BORGES, C. D. **Estudos das condições operacionais na produção de xantana por *X. arboricola* pv *pruni* para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo.** Tese de Doutorado, Programa de pós-graduação em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, 2007.

BORGES, S. M. S.; ALMEIDA, P. M. M. QUINTELLA, C. M. **Recuperação secundária de petróleo parafínico com injeção de glicerina bruta (GB), co-produto do biodiesel, em função da porosidade.** Sociedade Brasileira de Química, 2005.

BORGES, C. D. **Caracterização da goma xantana em função da cepa de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* e das condições operacionais.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, RS, 49p., 2004.

BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthan, In: STEINBÜCHEL, A.; VANDAMME, E.J.; DE BAETS, S. **Biopolymers.** Weinheim: Wiley-VCH, v. 5, p. 259-291, 2002.

BOZA, Y.; NETO, L. P.; COSTA, F. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. **Exopolysaccharide production by encapsulated *Beijerinckia* cultures.** Process Biochemistry, v. 39, p. 1201-1209, 2004.

BRADBURY, J. F. *Xanthomonas* dowson. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Baltimore: Williams & Wilkins, v. 1, 1984.

BRANDÃO, L. V.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. **Utilização do soro de mandioca como substrato fermentativo para a biosíntese de goma xantana: viscosidade aparente e produção.** Polímeros, v. 20, n. 3, p. 1-6, 2010.

BRANDÃO, L. V.; NERY, T. B. R.; DRUZIAN, J. I. **Produção de polissacarídeo tipo goma xantana por *Xanthomonas* em meio fermentativo com glicerol ou glicerina.** INPI: PI0705950-7, 2009.

BRANDÃO, L. V. **Produção e caracterização reológica de goma xantana obtida por fermentação de caldo de cana e soro de mandioca em diferentes escalas.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.

BRANDÃO, L. V.; NERY, T. B. R.; MACHADO, B. A. S.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. **Produção de goma xantana obtida a partir do caldo de cana**. Campinas: Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, p. 217-222, 2008.

BRYANT, R. S. **Potencial uses of microorganisms in petroleum recovery technology**. IIT Research Institute: Nacional Institute for Petroleum and Energy Research, v. 67, p. 97-104, 1987.

BUB, G.; MOSLER, J.; SABBAGH, A.; KUPPINGER, F. F.; STOCHNIOL, G.; SAUER, J.; LEISTNER, J.; LATOSCHINSKI, G.; SCHWATZKE, T. **Production of acrolein acrylic acid and water-absorbent polymer structures made from glycerin**. WO200636336, 2006.

BYONG, H.L. **Fundamentals of food biotechnology**. United States: VCH Publishers Inc.; 1996.

CADMUS, M. C.; KNUTSON, C. A.; LAGODA, A. A.; PITTSLEY, J. E.; BURTON, K. A. **Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors**. Biotechnology and Bioengineering, v. 20, n. 7, p. 1003 -1014, 1978.

CAENN, R.; CHILLINGAR, G. V. **Drilling fluids: State of the art**. Journal of Petroleum Science and Engineering, I4, v. 22, 230, 1996.

CAI, W.; HUANG, R. Eur. Pol. J. , n. 37, p. 1553-1559, 2001.

CALLET, F.; MILAS, M.; RINAUDO, M. **Influence of acetyl and pyruvate contents on rheological properties of xanthan in dilute solution**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 9, n. 5, p. 291-293, 1987.

CANEVAROLO, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 448p, 2004.

CANOTILHO, J.; SOUSA, A. T. B. de; PINTO, J. A. M. da C. **Análise térmica: interesse em tecnologia farmacêutica**. Revisão do conjunto. Revista Portuguesa de Farmácia, v. XLII, n. 4, p. 5-12, 1992.

CANUTO, A. P. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos e subprodutos agroindustriais**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 89p., 2006.

CANDIA J. L. F.; DECKWER, W. D. **Effect of the nitrogen source on pyruvate content and rheological properties of xanthan**. Biotechnology Progress, v. 15, n. 3, p. 446-452, 1999.

CARBOFLEX. **Manual de fluido de perfuração base água – Carboeco**. Empresa Carboflex, 2011.

CARVALHO FILHO, M. A. da S. **Preparação e estudo termoanalítico dos cinamatos de terras raras, exceto (Escândio), no estado sólido**. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 145f., 2000.

CASAS, J. A.; SANTOS, V. E.; GARCÍA-OCHOA, F. **Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 282-291, 2000.

CASTELLANELLI, C. A.; ROOS, C.; CASTELLANELLI, M.; ROSA, L. C. da. **Biodiesel como fonte de energia em praças de pedágio: uma análise econômica e ambiental**. Anais do XXVII Encontro Nacional de Engenharia de Produção. Universidade Federal de Santa Catarina, dezembro, 2007.

CAZETTA, M. L.; MARTINS, P. M. M.; MONTI, R.; CONTIERO, J. **Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***. *Journal Food Eng.*, v. 66, p. 301-305, 2005.

CHALLEN, I. A. Xanthan gum: a multifunctional stabiliser for food products. In: NISHINARI, K.; DOI, E. **Food Hydrocolloids: structures, properties and functions**. New York: Plenum Press, p.135-139, 1994.

CHAPLIN, M. F. Monosaccharides. In: CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. **Carbohydrate analysis – a practical approach**. New York: Oxford University Press, p. 1-42, 1994.

CHHABRA, R. P.; RICHARDSON, J. F. **Non-newtonian flow in the process industries fundamentals and engineering applications**. Great Britain: Butterworth Heinemann, 436 p., 1999.

CHI, Z.; ZHAO, S. **Optimization of médium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain**. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, p. 206-211, 2003.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho - HPLC**. São Paulo: Edgar Blucher, p.179, 1998.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora Unicamp, p.13, 1995.

COSTA, L. **Biossíntese de goma xantana a partir da casca de camarão: parâmetros de fermentação e caracterização do biopolímero**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 148p., 2010.

DARLEY, H. C. H.; GRAY, G. R. **Composition and Properties of Drilling and Completion Fluids**. Fifth Edition, Gulf Publishing Company, 1988.

DEGHANPOUR, H.; KURU, E. **Effect of viscoelasticity on the filtration loss characteristics of aqueous polymer solutions**. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 76, p. 12–20, 2011.

DIAZ, P. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S. **Reologia de Xantana: uma Revisão sobre a Influência de Eletrólitos na Viscosidade de Soluções Aquosas de Gomas Xantana**. *Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina*, v. 25, n. 1, p. 15-28, jan./jun. 2004.

DILTZ, S.; ZELLER, S. G. **Location of O-acetyl groups in S-657 using the reductive cleavage method.** Carbohydrate Research, v. 331, p. 265-270, 2001.

DINIZ, D. M.; DRUZIAN, J. I.; AUDIBERT, S. **Produção de goma xantana por cepas nativas de *Xanthomonas campestris* a partir de casca de cacau ou soro de leite.** Polímeros, v.22, n.3, 2012.

DRUZIAN, J. I.; PAGLIARINI, A. P. **Produção de goma xantana por fermentação do resíduo de suco de maçã.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 27, n.1, p. 787-792, 2007.

DRUZIAN, J. I. **Estudo da estrutura de exopolissacarídeos produzidos por duas espécies de *Rhizobium* e uma de *Bradyrhizobium* isolados de solo de cultivar de feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.).** Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, 2000.

EL-SALAM, M. H. A.; FADEL, M. A.; MURAD, H. A. **Bioconversion of sugarcane molasses into xanthan gum.** Journal of Biotechnology, v. 33, p. 103-106, 1994.

ENGLAND, A. A. **The Characterization of a Drilling Fluid Additive.** Chevron Services Co. SPE/IADC Drilling Conference, Dallas, Texas, 1988.

ESGALHADO, M. E.; ROSEIRO, J. C.; COLLAÇO, M. T. A. **Interactive effects of pH and temperature on cell growth and polymer production by *Xanthomonas campestris*.** Process Biochemistry, v. 30, n. 7, p. 667-671, 1995.

FARIA, S. **Produção de goma xantana empregando caldo de cana por *Xanthomonas campestris pv campestris* NRRL B-1459.** Dissertação - (Mestrado em Engenharia Química), Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

FARIAS, K. V.; AMORIM, L. V.; LIRA, H. L. **Desenvolvimento de fluidos aquosos para aplicação em perfuração de poços de petróleo – Parte I.** Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v. 4.1, p. 14-25, 2009.

FELIZARDO, P. M. G. **Produção de biodiesel a partir de óleos usados de fritura.** Lisboa: Instituto Superior Técnico. Engenharia Química, p. 113, 2003.

FERRAZ, A.I. **Manual de Engenharia dos Fluidos de Perfuração.** Divisão Magcohar Grupo Oilfield Products Dresser Industries, 1977.

FLEW, S.; SELLIN, R. H. J. **Non-newtonian flow in porous media – a laboratory study of polyacrylamide solutions.** Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics, n. 47, p. 169-210, 1993.

FORNARI, R. C. G. **Aproveitamento do soro de queijo para produção de goma xantana.** Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erichim, 79p., 2006.

- GALINDO, E. **Aspects of the process for xanthan production.** Institution of Chemical Engineers, v. 72, p. 227-237, 1994.
- GALLINO, G.; MIGLIORI, M.; CINDIO, B. **A rheological approach to drill-in fluids optimization.** Rheologica Acta, v. 40, n. 2, p. 196- 203, 2001.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. **Xanthan gum: production, recovery, and properties.** Biotechnology Advances, v. 18, p. 549-579, 2000.
- GIAVAGIS, I.; HARVEY, L. M.; McNEIL, B. **Gellan gum.** Critical Reviews Biotechnonology, 20, n. 3, p. 177-211, 2000.
- GOMES, G.V.P. **Otimização da conversão de biomassa de levedura e casca de coco a goma xantana usando metodologia de superfície de resposta.** Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2008.
- GONÇALVES, V. L.C. et al. **Biogasolina: produção de éteres e ésteres da glicerina.** I Congresso da rede brasileira de tecnologia em biodiesel, v. 2, p. 14-19, 2006.
- GREEN, M.; SHELEF, G.; BILANOVIC, D. **The effect of various citrus waste fractions on xanthan fermentation.** The Chemical Engineering Journal, v. 56, n. 1, p. B37-B41, 1994.
- GROWCOCK, F.B.; SINOR, L.A.; REECE, A.R.; POWERS, J.R. **Innovative additives can increase the drilling rates of water based muds.** Paper SPE 28708, 1998.
- GUPTE, M.D.; KAMAT, M.Y. **Isolation of wild Xanthomonas strains from agricultural produce, their characterization and potencial related to polysaccharide production.** Folia Microbiologica, v. 42, n. 6, p. 621-628, 1997.
- HAMED, S. B.; BELHADRI, M. **Rheological properties of biopolymers drilling fluids.** Journal of Petroleum Science and Engineering, v. 67, p. 84–90, 2009.
- HAMED, S. B.; MANSOUR, B. **Rheological properties of biopolymers drilling fluids.** Journal of Petroleum Science and Engineering, v. 67, p. 84–90, 2009.
- HAMIDA, T.; KURU, E.; PICKARD, M. **Rheological characteristics of aqueous waxy hull-less barley (WHB) solutions.** Journal of Petroleum Science and Engineering, v. 69, p. 163–173, 2009.
- HAN, D. K.; YANG, C. Z.; ZHANG, Z. Q.; LOU, Z. H.; CHANG, Y. **Recent development of enhanced oil recovery in China.** Journal of Petroleum Science and Engineering, v. 22, p. 181–188, 1999.
- KANG, K. S.; VEEDER, G. T.; MIRRASOUL, P. J.; KANEKO, T.; COTTRELL, I. W. **Agar-like polysaccharide produced by a Pseudomonas species: production and basic properties.** Applied and Environmental Microbiology, 43:5, p. 1086-1091, 1982.
- HARDING, N. E.; CLEARY, J. M.; IELPI, L. **Genetics and Biochemistry of xanthan gum production by Xanthomonas campestris.** In: HUI, Y. H. KHACHATOURIANS, G. G. Food Biotechnology: Microorganisms, p.495-514, 1994.

HARICHIAN, B.; MCMANUS, R. L.; HURLEY, M. K.; MINER, P. E.; CHANDAR, P.; BARROW, S. R. **Personal care compositions with glycerin and hydroxypropyl quaternary ammonium salts**. WO2006045584, 2006.

HOLZWARTH, G. **Conformation of extracellular polysaccharide of *Xanthomonas campestris***. Biochemistry, Washington, v. 15, n. 19, p. 4333-4339, 1976.

HORN, M. M. **Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico**. Dissertação de Mestrado em Ciências (Química Analítica), Universidade de São Paulo, São Carlos, 73p., 2008.

KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKDES, D. A.; SKARACIS, G. N. **Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses**. Process Biochemistry, v. 39, p. 249-256, 2003.

KATZBAUER, B. **Properties and applications of xanthan gum**. Polymer Degradation and Stability, v. 59, p. 81-84, 1998.

KENNEDY, J. F.; BRADSHAW, I. J. **Production properties and applications of xanthan**. In: Progress in Industrial microbiology. Oxford: Elsevier, 1984.

KIOSSEOGLOU, A.; PAPALAMPROU, E.; MAKRI, E.; DOXASTAKIS, G.; KIOSSEOGLOU, V. **Functionality of médium molecular weight xanthan gum produced by *x. campestris* atcc1395 in batch culture**. Food Research International, v. 36, p.425-430, 2003.

KI-WON, S.; YONG-SEOK, K.; GAP-SHIK, C. **Rheology of concentrated xanthan gum solutions: steady shear flow behavior**. Fibers and Polymers, v. 7, n. 2, p. 129-138, 2006.

KLEINITZ, W.; LITTMANN, W.; HERBST, H. **Screening of xanthan-biopolymer for a high salinity oil reservoir**. In: FIFTH EUROPEAN SYMPOSIUM ON IMPROVED OIL RECOVERY. Budapest, p.1-9, 1989.

KONICEK, J.; KONICKOVÁ-RADOCHOVÁ, M. **Use of whey for production of exocellular polysaccharide by mutant strain of *Xanthomonas campestris***. Folia Microbiologica, v. 37, n. 2, p. 102-104, 1992.

KRANENBURG, R. V.; BOELS, I. C.; KLEEREBEZEM. M.; VOS, W. M de. **Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides**. Current Opinion in Biotechnology , v.10, p.498-504, 1999.

KULICKE, W. M.; OERTEL, R.; OTTO, M.; KLEINITZ, W.; LITTMANN, W. **Characterization of xanthan solutions for application in EOR**. Erdöl & Kohle Erdgas Petrochemie, v. 43, n. 12, p. 471-476, 1990.

JANA, A. K.; GHOSH, P. **Xanthan biosynthesis in continuous culture: citric acid as an energy source**. Journal of Fermentation and Bioengineering, Osaka, v. 80, n. 5, p. 485-491, 1995

- LAFORGIA, D.; ARDITO, V. **Biodiesel fueled IDI engines: performances, emissions and heat release investigation**. Instituto di Macchine Ed Energetica, Polytechnic of Bari, Italy, 1994.
- LECHNER, M. D.; GEHRKE, K.; NORDMEIER, E. **Makromolekulare chemie**. Berlin: Birkhäuser, 1996. 532 p.
- LEE, K.M.; GILMORE, F. D. **Formulation and process modeling of biopolymer (polyhydroxyalkanoate: PHAs) production from industrial wastes by a novel crossed experimental design**. Process Biochemistry, v. 40, p. 229-246, 2005.
- LESLEY, S. M.; HOCHSTER, R. M. **The extracellular polysaccharide of *Xanthomonas phaseoli***. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, Ottawa, v. 37, n. 4, p. 513-529, 1959.
- LETISSE, F.; CHEVALLEREAU, P.; SIMON, J. L.; LINDLEY, N. D. **Kinetic analysis of growth and xanthan gum production with *Xanthomonas campestris* on sucrose, using sequentially consumed nitrogen sources**. Applied Microbiology Biotechnology, v. 55, p. 417-422, 2001.
- LEWIS, M. J. **Propiedades físicas de los alimentos y los sistemas de procesamiento**. Zaragoza: Editorial Acirbia S. A., 1993.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: procesos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., v.3, 125-154, 2001.
- LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica agroindustrial – Revalorización alimentaria de la producción agrícola**. Zaragoza: Acríbia, 428p., 1996.
- LIU, Y.; KUERSTEN, S.; HUANG, T.; LARSEN, A.; MACMORRIS, M.; BLUMENTHAL, T. **An uncapped RNA suggests a model for *Caenorhabditis elegans* polycistronic pre-mRNA processing**. Rna 9, p. 677–687, 2003.
- LO, Y.M.; YANG, S.T.; MIN, D.B. **Ultrafiltration of xanthan gum fermentation broth: process and economic analyses**. Journal of Food Engineering, v.31, p.219-236, 1997.
- LÓPEZ, M. J.; VARGAS-GARCÍA, M. C.; SUAREZ-ESTRELLA, F.; MORENO, J. **Properties of xanthan obtained from agricultural wastes acid hydrolysates**. Journal of Food Engineering, 63, p. 111-115, 2004.
- LÓPEZ, M. J.; MORENO, J.; RAMOS-CORMENZANA, A. ***Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters**. Elsevier Science Ltd Wat, Great Britain, v. 35, n. 7, p. 1828-1830, 2001.
- LOWSON, C. J.; SYMES, K. C. **Oligosaccharides produced by partial acetolysis of xanthan gum**. Carbohydrates Research, v.58, n. 2, p. 433-438, 1977.
- LUMMUS, J. L; AZAR, J. J. **Drillings Fluids Optimization**. A Pratical Field Approach, PennWell Publishing Company, Tulsa, Oklahoma, 1986.

- LUPORINI, S.; BRETAS, R. E. S. **Caracterização reologica da goma xantana: efeitos do cloreto de sódio e sulfato de alumínio, concentração e temperatura em Experimentos permanentes e dinâmicos**. Relatório de Pós-Doctor, Universidade Federal de São Carlos, SP, 2008.
- MACHADO, B. A. S.; REIS, J. H. O.; FIGUEIREDO, T. V. B.; DRUZIAN, J. I. **Mapeamento tecnológico da goma xantana sob o enfoque em pedidos de patentes depositados no mundo entre 1970 a 2009**. Revista Geintec, v. 2, n. 2, p. 154-165, 2012.
- MALETTO PETE. **Low carbohydrate ice cream**. US2005095336, 2005.
- MANO, E. B. **Introdução a Polímeros**. 2ª ed., Edgard Blücher: São Paulo, 1985.
- MARGARITIS, A.; PACE, G. W. **Microbial polysaccharides**. In: Moo-Young, M. **Comprehensive Biotechnonology**. Oxford: Pergamon Press, v. 3, p. 1005-1041, 1985.
- MATSUDA, K.; NIHEI, T.; KASHIWAI, T.; YAMAGATA, Y. **Gel composition for patch**. JP2005179255, 2005.
- MAYER L.; VENDRUSCOLO, C. T.; SILVA, W. P. da; MOURA, A. B. **Produção, propriedades reológicas e composição química da xantana produzida por *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli***. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, v. 2, n. 2, p. 87-95, 2008.
- MEDEIROS, R. C. A.; AMORIM, L. V.; SANTANA, L. N. L. **Avaliação de aditivos lubrificantes em fluidos aquosos para perfuração de poços de petróleo**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v.3.3, p. 56-64, 2008.
- MEDEIROS, A. S.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; CONCEIÇÃO, J. J.; VENDRUSCOLO, J. L. **Influência do método de recuperação e purificação de xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 06**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 3, p. 9-29, 2000.
- MESOMO, M. C. **Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio à base de soro de queijo**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, 2007.
- MILLI, B. B.; GRIPA, D. C.; SIMONELLI, G. **Aplicações alternativas da glicerina oriunda do biodiesel**. Enciclopédia Bioesfera, Centro Científico Conhecer, v. 7, n. 12, 2011.
- MOREIRA, A. N.; DEL PINO, F. A.; VENDRUSCOLO, C. T. **Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através da inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp 7070**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 23:2, p. 300-305, 2003.
- MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni***. Tese de Doutorado, Programa de Doutorado em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Pelotas, 2002.

MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; GIL-TUNES, C.; VENDRUSCOLO, C. T. **Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni***. Food Hydrocolloids, v. 15, n. 4-6, p. 469-474, 2001.

MORENO, J.; LÓPEZ, M.J.; VARGAS-GARCIA, C.; VÁZQUEZ, R. Use of agricultural wastes for xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 4-5, p. 242-246, 1998.

MORRIS, E. R. **Rheology of hydrocolloids**. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. Ed. Gums and stabilisers for the food industry. Oxford: Pergamon Press, p.57-78, 1984.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A. da; GONÇALVES, V. L. C. **Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel**. Revista Química Nova, v. 32, p. 639-648, 2009.

MOTT, R. L. **Mecânica de fluidos aplicada**. México: Prentice-Hall Hispanoamericana S.A., 1996.

MULCHANDANI, A.; LUONG, J. H. T.; LEDUY, A. **Batch kinetics of microbial polysaccharide biosynthesis**. Biotechnology and Bioengineering, v. 32, p. 639-646, 1988.

NAVARRETE, R. C.; SEHEULT, J. M.; COFFEY, M. D. **New Biopolymer for drilling, drill-in, completions, spacer, and coil-tubing fluid, Part II**. International Symposium on Oilfield Chemistry SPE 64982, Houston, TX, p.1-15, 2001.

NAVARRO, F. N. **Fundamentos de reologia de polímeros**. EDUCS: Caxias do Sul, 1997.

NAWANI, N. N.; KAPADNIS B.P. **Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs**. Process Biochemistry, v. 40, p. 651-660, 2005.

NERY, T. B. R.; BRANDÃO, L. V.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. **Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade**. Química Nova, v. 31, n. 8, p. 1937-1941, 2008.

NERY, T. B. R. **Produção e caracterização de goma xantana obtida com novas culturas liofilizadas de *Xanthomonas campestris* pv. utilizando resíduos industriais**. Dissertação de Mestrado. Escola Politécnica, Departamento de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA), 117p., 2007.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. **Formulação d meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. campestris* C7L**. Ciência e Tecnologia de alimentos, v. 21:1, p. 82-85, 2001.

NITSCHKE, M.; THOMAS, R.W.S.P. **Xanthan gum production by wild-type isolates of *Xanthomonas campestris***. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 11, n. 5, p. 502-504, 1995.

OLIVEIRA, K. S. M. **Diferentes parâmetros de produção e extração de goma xantana pela fermentação de *Xanthomonas campestris* pv *campestris***. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, São Paulo, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2009.

ORENTAS, D. G.; SLONEKER, J. H.; JEANES, A. **Pyruvic acid content and constituent sugars of exocellular polysaccharides from different species of the genus *Xanthomonas***. Canadian Journal of Microbiology, v. 9, n. 3, p. 427-430, 1963.

PACE, G. W. **Polímeros Microbianos**. In: Bullock, J. & KRISTIANSEN, B. **Biotecnología Básica**. Zaragoza: Editorial S. A., 1991.

PADILHA, F.F.; REIS, E.C.; ALMEIDA, M.; PEREIRA, M. A.; OLIVEIRA, C. B. Z.; VENCESLAU, E. M.; DRUZIAN, J. I.; MARIANO, R. **Biopolymer synthesized by strains *Xanthomonas* sp isolate from Brazil usind biodiesel-waste**. Macromol. Symp., v. 296, p.347–353, 2010.

PADILHA, F. F. **Produção de biopolímeros sintetizados por microrganismos geneticamente modificados**. Tese de Doutorado – Departamento de Ciências de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2003.

PALANIRAJ, A.; JAYARAMAN, V. **Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris***. Journal of Food Engineering, v. 106, p. 1-12, 2011.

PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S.K.; BATSILAS, L.; PARAS, S.V; KYRIAKIDIS, D.A.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. **Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures**. Process Biochemistry, v.37, p.73-80. 2001.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. ***Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol**. Journal Appl. Microbiol., v. 92, p.737–44, 2002.

PASQUEL, A. **Gomas: utilização e aspectos reológicos**. Bol. SBCTA, v. 33(1), p. 86-97, 1999.

PETERS, H. U.; HERBST, H.; HESSELINK, P. G. M.; LU, ÈNDSORF. H.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W. D. **The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris***. Biotechnol Bioeng. n. 34, p. 1393-1397, 1989.

PETROBRAS. **Viscosificante para Fluidos de Perfuração Base Água na Exploração e Produção de Petróleo**. Especificação, N-2604, 2009.

PETROBRAS. **Ensaio de Viscosificante para Fluidos de Perfuração Base Água na Exploração e Produção de Petróleo**. Especificação, N-2605, 2003.

PETTITT, D. J. **Xanthan Gum**. In GLICKSMAN M. Food Hydrocolloids, v.1, CRC Press, cap. 5, p.128-149, 1982.

PINCHES, A.; PALLENT, L. J. **Rate and yield relationship in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined media.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 28, p. 1484 – 1496, 1986.

PINHO, J. de J. R. G. **Desenvolvimento de comprimidos de cloridrato de metformina de liberação convencional e modificada: influência dos excipientes sobre o perfil de dissolução e avaliação termoanalítica.** São Paulo, Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1999.

PINTO, E. P. **Desacetilação de xantana: influência no comportamento reológico.** 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

PONS, A.; DUSSAP, C.G.; GROS, J.B. **Modelling Xanthomonas campestris batch fermentations in a bubble column.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.33, p. 394-405, 1989.

PORTILHO, M. **Avaliação da produção de exopolissacarídeo insolúvel por duas linhagens de Agrobacterium sp.** Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, UNICAMP, 86p., 2002.

PRADELLA, J.G.C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos.** Relatório técnico n. 84396-205. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP. São Paulo. 2006.

RAMOS, B. F. M. **Produção de goma xantana em água produzida da indústria de petróleo.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Industrial, Pós-graduação em Engenharia Industrial, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 71p., 2011.

RAO, Y. M.; SURESH, A. K.; SURAIHKUMAR, G. K. **Free radical aspects of Xanthomonas campestris cultivation with liquid phase oxygen supply strategy.** *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1301-1310, 2003.

RAO, M.A. **Rheology of fluid and semisolid foods: principles and applications.** New York: Aspen Publishers, p. 433, 1999.

RICHARD, A.; MARGARITIS, A. **Production and mass transfer characteristics of nonnewtonian biopolymers for biomedical applications.** *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 44, n. 4, p. 355-374, 2002.

RINAUDO, M. **Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states.** *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 433–440, 2001.

ROBRA, S. **Uso da glicerina bruta em biodigestão anaeróbica: aspectos tecnológicos, ambientais e ecológicos.** Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2006.

ROCKS, J. K. **Xanthan gum.** *Food Technology*, v. 25, p.476-483, 1971.

ROSALAM, S.; ENGLAND, R. **Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp.** Enzyme and Microbial Technology, v. 39, p. 197-207, 2006.

ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp para produção de goma xantana.** Dissertação de Mestrado. Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos. URI – Campus Erechim, Rio Grande do Sul, 95p., 2005.

SÁNCHEZ, A.; RAMÍREZ, M. E.; TORRES, L. G.; GALINDO, E. **Characterization of xanthans from selected *Xanthomonas* strains cultivated under constant dissolved oxygen.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 13, n. 4, p. 443-451, 1997.

SANDFORD, P.A. **Exocellular, Microbial Polysaccharides.** Advances in Carbohydrate Chemical and Biochemistry, v. 36, p. 265-313, 1979.

SANDFORD, P. A.; PITTSLEY, J. E.; KNUTSON, C. A.; WATSON, P. R.; CADMUS, M. C.; JEANES, A. **Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B – 1459: characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content.** In: SANDFORD, P.A.; LASKIN, A. Extracellular microbial polysaccharides. Washington: American Chemical Society, p. 192-210, 1977.

SCAMPARINI, A. R. P.; LUVIELMO, M. M. **Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação.** Estudos Tecnológicos, v. 5, n. 1, p. 50-67, 2009.

SCHMIDELL, W. **Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial.** In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. 1ªed, v. 2 São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, p. 5 -18, 2001.

SERRANO-CARREON, L.; CORONA, R. M.; SANCHEZ, A.; GALINDO, E. **Prediction of xanthan fermentation development by a model linking kinetics, power drawn and mixing.** Process Biochem., v. 33, p. 133-146, 1998.

SHAH, A.; ASHTAPUTRE, A. **Evaluation of rheological properties of the exopolysaccharide of *Sphingomonas paucimobilis* GS-1 for application in oil exploration.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 23, 442-445, 1999.

SHATWELL, K. P.; SUTHERLAND, I. W.; ROSS-MURPHY, S. B. **Influence of acetyl and pyruvate substituents on the solution properties of xanthan polysaccharide.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 12, n. 2, p. 71-78, 1990.

SHU, C. H.; YANG, S. T. **Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*.** Biotechnology and Bioengineering, v. 35, p. 454-468. 1990.

SIANO, D.; SANTACESARIA, E.; FIANDRA, V.; TESSER, R.; DI NUZZI, G.; DI SERIO, M.; NASTASI, M. **Process for the production of alpha, gamma-dichlorohydrin from glycerin and hydrochloric acid.** WO2006111810, 2006.

- SILVA, M. F.; FORNARI, R. C. G.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F. F.; SICHOSKI, A. J.; CANSIAN, R. L.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. **Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source.** Journal of Food Engineering, v. 90, p. 119-123, 2009.
- SLONEKER, J. H.; JEANES, A. **Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B - 1459.** Canadian Journal of Chemistry, v. 40, n. 11, p. 2066-2071, 1962.
- SMITH, I. H.; PACE, G. W. **Recovery of microbial polysaccharides.** Journal of Chemical Technology And Biotechnology, v. 32, n. 1, p. 119-129, 1982.
- SMITH, I. H.; SYMES, K. C.; LAWSON, C. J.; MORRIS, E. R. **Influence of the pyruvate of xanthan on macromolecular association in solution.** International Journal of Biological Macromolecules, Guildford, v. 3, n. 2, p. 129-134, 1981.
- SOCOL, C. R.; WOICIENCHOWSKY, A. L.; PANDEY, A. **Produção de goma xantana por fermentação a partir de mandioca, batata e resíduos das agroindústrias cafeeira, de batata e de mandioca.** INPI: Patente Nacional de Propriedade Industrial, PI 0007342-3 A, 2002.
- SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. **Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepas 24 e 58.** Ciência e Engenharia, v. 8, n. 2, p. 115-123, 1999.
- SOUW, P.; DEMAIN, A.L. **Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459.** Appl. Environ. Microbiol., v. 37 (6), p. 1186-1192, 1979.
- STREDANSKY, M; CONTI, E. **Xanthan Production by Solid State Fermentation.** Process Biochemistry, nº 34, p. 581-587, 1999.
- SUTHERLAND, I. W. **Extracellular polysaccharides.** Biotechnology, v. 6, p. 613-657, 1996.
- SUTHERLAND, I. W. **Xanthan.** In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall. p. 363-388, 1993.
- SZCESNIAK, A.S. **Physical properties of foods: What they are.** In: PELEG, M.; BAGLEY, E.B. Physical properties of foods. New York: AVI, p. 1-37, 1983.
- TAIT, M.I.; SUTHERLAND, I.W.; CLARKE-STURMAN, A.J. **Effect of growth conditions on the production composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide.** Journal of General Microbiology, v. 132, p. 1483-1492, 1986.
- TAKO, M.; NAKAMURA, S. **Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous-media.** Agricultural And Biological Chemistry, Tokyo, v. 48, n.12, p. 2987-2993, 1984.
- TANYILDIZI, M. S.; OZER, D.; ELIBOL, M. **Optimization of α -amylase production by *Bacillus sp.* using response surface methodology.** Process Biochemistry, v. 40, n. 7, p. 2291-2296, 2005.

TAYLOR, K. C.; NASR-EL-DIN, H. A. **Water-soluble hydrophobically associating polymers for improved oil recovery: A literature review**. Journal of Petroleum Science and Engineering, v. 19, p. 265–280, 1998.

TEIXEIRA, R. A.; ROCHA, P. S. M. V. **Reologia de soluções poliméricas com potencial de uso em campos maduros da Bacia do Recôncavo Baiano**. 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2005.

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. **Sobrevivencia de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* em manipueira sob condicoes ambientais**. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, Brasilia, v. 37, n. 7, 2002.

THOMAS, J. E. **Fundamentos de Engenharia de Petróleo**. 2ªed. Rio de Janeiro: Interciência, 271p., 2001.

TROY, W. M.; LUXEM, F. J.; GALANTE, J. H.; BERNHARD, R. R. **Método de produção de ésteres de alquila usando glicerina**. PI0413519-9, 2005.

VENDRUSCOLO, C. W. **Goma xantana e galactomanana (*M. scabrella*): desenvolvimento de matrizes hidrofílicas para liberação modificada de teofilina**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

VENDRUSCOLO, C. T. **Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia sp* isolada do solo cultivado com cana de açúcar da região de Ribeirão Preto-São Paulo-Brasil**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP, Campinas, 1995.

VIDAL, E. L. F.; FÉLIX, T. F.; GARCIA, R. B. ; COSTA, M. Girão, J. H. S. **Aplicação de novos polímeros catiônicos como inibidores de argila em fluidos de perfuração à base de água**. In: 4º PDPETRO, Campinas, 2007.

VILLETTI, M. A.; CRESPO, J. S.; SOLDI, M. S.; PIRES, A. T. N.; BORSALI, R.; SOLDI, V. **Thermal degradation of natural polymers**. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v. 67, p. 295-303, 2002.

XIE, W.; LECOUNTIER, J. **Xanthan behaviour in water-based drilling fluids**. Polymer Degradation and Stability, v. 38, n. 2, p. 155-164, 1992.

XUEWU, Z.; XIN, L.; DEXIANG, G.; WEI, Z.; TONG, X.; YONGHONG, M. **Rheological models for xanthan gum**. Journal of Food Engineering, v. 27, p. 203–209, 1996.

YOO, S. D.; HARCUM, S.W. **Xanthan gum production from waste sugar beet pulp**. Bioresource Technology, v. 70.1, p. 13-15, 1999.

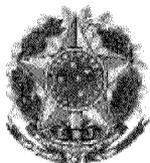
ZARONI, M. **Polissacarídeo no desenvolvimento de péletes de teofilina de liberação de colônia**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2006.

ZOHURIAAN, M.J.; SHOKROLAHI, F. **Thermal studies on natural and modified gums**. Polymer Testing, v. 23, p. 575–579, 2004.

WEISS, R. M.; OLLIS, D. F. **Extracellular microbial polysaccharides (1). Substrate, biomass and product kinetics equation from xanthan gum fermentations.** Biotechnol. Bioeng., v. 22, p. 859-873, 1980.

WHITCOMB, P. J; MACOSKO, C. W. **Rheology of xanthan gum.** Journal of Rheology, 22(5), p.493-505, 1978.

ANEXO



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0705950-7 A2**



* B R P I 0 7 0 5 9 5 0 A 2 *

(22) Data de Depósito: 19/07/2007

(43) Data da Publicação: 10/03/2009
(RPI 1992)

(51) *Int.Cl.:*

C12P 19/06 (2009.01)

(54) **Título: PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO TIPO GOMA XANTANA POR XANTHOMONAS EM MEIO FERMENTATIVO COM GLICEROL OU GLICERINA**

(73) **Titular(es):** Janice Izabel Druzian, Lillian Vasconcellos Brandão, Tatiana Barreto Rocha Nery, Universidade Federal da Bahia

(72) **Inventor(es):** Janice Izabel Druzian, Lillian Vasconcellos Brandão, Tatiana Barreto Rocha Nery

(57) **Resumo:** PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO TIPO GOMA XANTANA POR XANTHOMONAS EM MEIO FERMENTATIVO COM GLICEROL OU GLICERINA. Utilizando glicerina ou glicerol, puro ou impuro, com diferentes formas físicas (sólida ou líquida) ou de outras fontes, subproduto do biodiesel ou de outras fontes, como fonte de substrato, suplementado ou não com nitrogênio ou potássio e outros nutrientes, em meio de cultura utilizado na fermentação por Xanthomonas para a obtenção do polissacarídeo tipo goma xantana, utilizando reatores aerados e agitados. A invenção visa obter substratos alternativos de baixo custo para o processo fermentativo na produção de polissacarídeo tipo goma xantana quando comparado ao processo industrial de bioconversão de sacarose ou glicose. Esta invenção envolve a otimização dos parâmetros físico de fermentação tais como pH, temperatura, tempo e velocidade de agitação, e a avaliação da necessidade de fonte adicional de nitrogênio, fósforo e potássio, ou outros nutrientes, no substrato.



“PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO TIPO GOMA XANTANA POR XANTHOMONAS EM MEIO FERMENTATIVO COM GLICEROL OU GLICERINA”

5 A presente Patente de Invenção refere-se à utilização de glicerol ou glicerina como fonte de carbono/ substrato no processo fermentativo por *Xanthomonas* para obtenção de polímero tipo goma xantana.

O termo glicerol aplica-se geralmente ao composto puro, ou seja, ao 1,2,3-propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais que contenham 10 95%, ou mais, de glicerol na sua composição. Glicerina é um subproduto resultante da hidrólise de triglicérides de óleos ou gorduras, é um resíduo gerado em grandes volumes na produção de biocombustíveis, sabão, ácidos gordos, álcoois de ácidos gordos, etc (FELIZARDO, P. M. G. Produção de biodiesel a partir de óleos usados de fritura. Lisboa: Instituto Superior Técnico. Engenharia Química, p. 113, 2003). Por ser uma fonte 15 alternativa de carbono, o glicerol ou glicerina, suplementados ou não, podem ser usados como nutrientes na fermentação por *Xanthomonas campestris* para produzir um polímero tipo goma xantana com bons rendimentos. Além disso, esses subprodutos (glicerol/ glicerina) apresentam um baixo valor comercial agregado, são obtidos de fontes renováveis e gerados em grande quantidade no país, apresentando grandes problemas para o descarte.

20 A glicerina é normalmente usada na preparação de diversos produtos da indústria farmacêutica, de alimentos e outros produtos como resinas alquídicas, poliálcool – poliéster, celofane e explosivos, todavia o seu uso é condicionado ao seu grau de pureza, que deve estar usualmente acima de 95% (SALVADOR, A. F.; MACHADO, A. S.; SANTOS, E. P.

Purificação da Glicerina Bruta Vegetal. Senai. **BIODIESEL: o novo combustível do Brasil**. Lauro de Freitas: p. 20-23, 2007). A demanda cresce mais nos mercados de uso pessoal e higiene dental, e alimentos, onde o produto tem maior pureza e valor, que corresponde a 64% do total. Em alimentos, a demanda de glicerina e derivados cresce em 5 4% ao ano (<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/glicerina/biodiesel-glicerina.htm>, acessada em fevereiro 2007).

Os grandes volumes de glicerina, derivada da produção do biodiesel, geram a perspectiva de problemas sérios de descarte, portanto, destinos viáveis de utilização estão sendo buscados pela comunidade acadêmica e empresarial.

10 Na Europa, o aumento de biodiesel, para atingir apenas alguns pontos percentuais do diesel, cobriria grande parte da demanda atual por glicerol (<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/glicerina/biodiesel-glicerina.htm>, acessada em fevereiro 2007). A produção brasileira de biodiesel é ainda incipiente, com 1.075 mil litros no primeiro semestre de 2006 (Agência Nacional de Petróleo - ANP. **Relatório gerencial: situação de produtores de biodiesel**. Brasília, mar. 2006). Ao se considerar um consumo 15 de óleo diesel de 38 milhões de L/ ano, a adição de 2% de biodiesel a partir de 2008 regulamentada por lei deve gerar uma demanda de 760 milhões de L/ ano (LICHT, F. O. Word ethanol & biofuels report. F. O. LICHT, [S. l.], v. 3, n. 13, 2005).

20 Estudos indicam que cada 90m³ de biodiesel produzido pela reação de transesterificação são gerados 10m³ de glicerina. Estima-se que a partir de 2008 e 2013, haverá um excedente de glicerina de ordem de 80 mil e 150 mil ton/ ano, respectivamente,

no mercado brasileiro, muito maior que a atual na faixa de 30 mil ton/ ano (ABIQUIM. **Anuário da Indústria Química Brasileira**. São Paulo, 2005).

5 A xantana é um heteroexopolissacarídeo natural produzido por fermentação aeróbica por *Xanthomonas campestris*, importante do ponto de vista comercial devido sua ampla utilização na indústria de alimentos, farmacêutica, e principalmente petroquímica para recuperação de óleo (CASAS J. A.; SANTOS V. E.; GARCIA-OCHOA F. Xanthan Gum Production Under Several Operations Conditions: Molecular Structure and Rheological Properties. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, 282-291, 2000).

10 A goma xantana é um importante biopolímero industrial introduzido em 1964. Por ser completamente atóxica, a adição de xantana em alimentos é permitida desde 1965, pelo Decreto Lei nº 55.871, da legislação Brasileira de Alimentos (LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: **Edgard Blücher Ltda**, v. 3, 125-154, 2001).

15 Esse biopolímero é o mais utilizado na recuperação terciária de petróleo (EOR), não tendo até o momento nenhum outro em escala comercial que supere suas qualidades, devido suas propriedades físico-químicas. Dentre estas propriedades destaca-se a sua elevada viscosidade em baixas concentrações e estabilidade em ampla faixa de temperatura e pH. No Brasil, o substrato que contém sacarose como fonte de carbono é utilizado em estudos científicos para produção de goma xantana e representa um baixo custo de
20 produção quando comparado a outros países onde o custo do meio fermentativo da glicose representa um fator crítico sob o aspecto comercial na produção do polissacarídeo. Portanto, o Brasil mostra-se com grande potencial para fabricação deste biopolímero em

escala industrial, já que dispõe de matéria-prima básica para a produção: sacarose, extrato de levedura e álcool do setor sucroalcooleiro (PADILHA, F. F. **Produção de biopolímeros sintetizados por microrganismos**. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, 2003). Entretanto, a diversidade de outras fontes de carbono é grande, podendo viabilizar o baixo custo de produção, entre elas a glicerina ou glicerol.

Da produção anual de 30.000 toneladas de goma xantana, aproximadamente 5.000 são usadas como fluido na indústria de petróleo. O consumo de goma xantana nos Estados Unidos tem crescido anualmente entre 5-10%, entretanto somente é viável comercialmente como grau alimentício, devido principalmente ao alto custo de sacarose usado como fonte de carbono na fermentação (STREDANSKY, M; CONTI, E. Xanthan Production by Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 581-587, 1999; YOO S. D.; HARCUM S. W. Xanthan Gum Production from Waste Sugar Beet Pulp. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 105-109, 1999). Na indústria petroquímica, o produto é considerado estratégico por ser utilizado na lubrificação das brocas de perfuração e também na recuperação secundária de poços de petróleo, processos já utilizados na Arábia Saudita e na China e adotados pela Petrobrás. No Brasil, a demanda pelo produto é de 3,5 mil toneladas anuais (<http://www.assintecal.org.br>, acessada em março 2007).

Ainda não se conhece uma produção economicamente viável de goma de xantana por fermentação de fontes de carbono alternativas. Entende-se que para viabilizar qualquer processo produtivo industrial é necessário baixar os custos da matéria-prima e de produção sem qualquer prejuízo da qualidade do produto final. Uma alternativa é a utilização de substratos baratos, desde que atendam as características necessárias. Substratos alternativos

têm sido estudados em todo mundo na tentativa de diminuir os custos de produção da goma xantana (YOO, S. D.: HARCUM, S. W. Xanthan gum production from waste sugar beet pulp. **Bioresource Technology**, v. 70.1, p. 13-15, 1999).

5 A presente invenção relata que a utilização do glicerol ou glicerina, provenientes do processo de fabricação de biodiesel ou de outras fontes em bioprocessos, permite obter substratos fermentativos alternativos de baixo custo para produção de polissacarídeo tipo goma xantana, auxiliando na resolução de problemas ambientais graves. Além de serem resíduos obtidos de fontes renováveis, possui baixo custo por ser de difícil descarte e
10 gerados em grande quantidade no país, e constituem, quando complementados convenientemente com sais e nutrientes (geralmente uma fonte de nitrogênio e fósforo), um substrato alternativo viável para a produção de polissacarídeo tipo goma xantana por fermentação, o que abre uma nova fonte de uso desse material e uma nova fonte de renda para o setor.

15 Existem várias utilizações de glicerina ou glicerol para produção de compostos orgânicos ou outros derivados da indústria química ou petroquímica como a patente depositada no Brasil **PI0413519-9**, e de patentes de outros países **WO2006111810**, **WO2005019153**, **WO2006045584** e **WO2006136336**, no entanto, nenhuma delas propõe o uso da glicerina ou glicerol como fonte de carbono no meio fermentescível para a produção
20 de biopolímero tipo goma xantana.

As patentes oriundas do Brasil, **PI0406309-0**, **PI0302205-6**, **PI8200767-5**, e de outros países como a **PT74943** e **JP11116603**, são algumas das que citam a produção de

goma xantana, a otimização do processo produtivo, medidas de viscosidade da goma e teor de piruvato contido, entretanto todas as citações utilizaram sacarose e glicose como fonte de carbono na obtenção da goma xantana. Todas elas apresentam a desvantagem competitiva de produzir goma xantana com um alto custo, tornando inviável principalmente sua utilização no setor petroquímico que necessita de grandes quantidades. Isto porque, as fontes de carbono utilizadas possuem alto valor agregado, por já serem comercialmente aproveitadas e destinadas à fabricação de alimentos e álcool.

As patentes **US2005095336**, **JP2006298819** e **JP2005179255** são algumas das que citam a utilização de formulações de glicerina e/ou glicerol com goma xantana para aplicação em processos alimentícios, farmacêutico e afins, no entanto, apresentam desvantagens quanto ao encarecimento no mercado de alimentos, farmacêutico e outros ramos, por utilizarem um complexo de gomas e reagentes orgânicos ou inorgânicos.

A patente **US4071406** trata a produção de polissacarídeo por *Xanthomonas* utilizando soro de soja como substrato, esse resíduo da agroindústria de grãos é gerado em grandes quantidades e ainda não possui valor comercial agregado, no entanto, o autor complementa o soro de soja com glicose e sacarose como meio nutritivo para a produção de goma xantana, o que apresenta a desvantagem de utilizar um produto de alto custo para suplementação, que encarece o produto final.

A patente **US5434078** aborda a produção de goma xantana por diferentes linhagens de *Xanthomonas* utilizando produtos residuais derivados do leite, no entanto fez enriquecimento do meio nutritivo com um produto Sigma contendo lactose, vitaminas, proteínas, lipídios e minerais. Este meio nutritivo, composto de soro de leite, possui a

desvantagem de utilizar um composto industrializado para a obtenção de biopolímeros, o que poderá encarecer o produto final além de não agregar valores ambientais.

A patente, depositada no Brasil, **PI0007342-3** ressalta a produção de goma xantana por fermentação a partir de mandioca, batata e resíduos da agroindústria cafeeira, no entanto o hidrolisado da casca de café contém quantidades variáveis de cafeína, ácido caféico, ácidos clorogênicos e taninos, que por serem substâncias tóxicas e recalcitrantes, inibem o crescimento microbiano sendo necessário à remoção destes através de processos de separação, apresentando a desvantagem de agregar custos ao produto final.

10

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta patente tem a vantagem de inventar ~~uma nova utilização para os resíduos, glicerol ou glicerina, provenientes do processamento de biodiesel ou de outras fontes, que são fontes renováveis e possuem baixo valor econômico agregado, além de minimizar os impactos ambientais visto que os resíduos são gerados em grande quantidade no país e são~~ de difícil descarte.

15

As requerentes descobriram que esses resíduos industriais podem ser utilizados como substrato para a produção de polímeros tipo goma xantana, minimizando assim os custos de produção e tornando viável a sua utilização em áreas de atuação que exigem grandes quantidades de produto, como a indústria do petróleo, além da indústria de alimentos e farmacêuticas, onde já são comercialmente utilizadas.

20

Uma dificuldade apresentada por esta invenção é que estes subprodutos, por serem provenientes de resíduos industriais (mamona, soja, algodão, etc.) com processos

diferenciados entre as indústrias e devido à biodiversidade entre as diferentes espécies de matérias primas do setor, podem possuir diferenças no teor de compostos a serem bioconvertidos por *Xanthomonas* precisando ser mensurado caso a caso o respectivo rendimento e/ ou propriedades reológicas do polissacarídeo tipo goma xantana obtido em

5 cada caso.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO PROCESSO

A invenção consiste na utilização de resíduo industrial proveniente da produção de biodiesel ou de outras fontes, glicerina ou glicerol, para produção de goma xantana por

10 fermentação. A invenção envolve a otimização dos parâmetros físico-químicos do processo fermentativo de produção da goma xantana a partir da variação da concentração de resíduo industrial, glicerol ou glicerina, bem como a variação de outras fontes de nutrientes (fonte de nitrogênio e fonte de fósforo) do meio fermentativo.

Conforme a invenção, as cepas de *Xanthomonas* utilizadas no processo fermentativo

15 são capazes de produzir polímeros tipo goma xantana com características reológicas comerciais a partir dos resíduos industriais.

A bioconversão de glicerol ou glicerina em polissacarídeo tipo goma xantana inicia pela manutenção e conservação da cepa de *Xanthomonas*, que é realizada por repicagem por período que pode ser de 3 a 15 dias, em tubo inclinado, em meio contendo YM agar,

20 incubada em temperatura entre 25 a 32°C por tempo de 12 a 32 horas. Posteriormente, para aumentar o número de células de *Xanthomonas*, o inóculo é preparado com célula de *Xanthomonas* por 48 horas, em agitador orbital em temperatura entre 25 e 32°C e agitação

entre 60 e 300 rpm, em meio líquido contendo glicose (0,5 a 2,5%), extrato de malte (0,1 a 1,0%), extrato de levedura (0,1 a 1,0%) e peptona bacteriológica (0,1 a 1,5%).

O crescimento microbiano é diretamente influenciado pela fonte de nitrogênio empregada no processo fermentativo. Algumas fontes de nitrogênio podem ser empregadas como, por exemplo, sais de amônio orgânico e inorgânico, cloreto ou sulfato de amônio, peptona, extrato de malte, uréia, extrato de levedura, levedura de cerveja ou álcool (*Saccharomyces cerevisiae*) que podem ser usadas separadamente ou associadas. Esta invenção prefere que seja usada como fonte de nitrogênio no processo de produção de polímeros tipo goma xantana, nitrato de potássio, extrato de levedura ou uréia.

10 A produção de polímeros tipo goma xantana, em fermentação líquida, se dá pela transferência da solução de inóculo para o meio de produção, na proporção de 5 a 25% em volume. O meio fermentativo de produção do biopolímero utilizado é composto basicamente de 0,5 a 10% de glicerina ou glicerol; puro e/ ou impura; sólida, líquida ou outras formas, com pH ajustado entre 6,0 e 8,0 e complementados com fonte de nitrogênio 15 (0,005 a 0,5%) e fonte de potássio (0,01 a 1,0%), inoculados e incubados entre 25 e 32°C em agitador orbital com rotação entre 60 e 1000 rpm, durante 2 a 6 dias.

O polissacarídeo tipo goma xantana produzido é solúvel em água e aumenta substancialmente a viscosidade do meio. A separação das células de *Xanthomonas* do polímero pode ser realizada por centrifugação (3000 a 18000 rpm, -5 a 30°C, por 5 a 80 20 minutos). A extração do caldo de fermentação pode ser feita por precipitação da goma xantana com volume apropriado de álcool etílico (1:2 a 1:5 v/v). A goma precipitada pode ser removida por filtração, secada por diferentes técnicas e triturada para obtenção de um

pó granulado. O álcool utilizado no processo para precipitar a goma xantana produzida, pode ser recuperado por destilação.

EXEMPLO 1

- 5 Como referência demonstrativa e não restritiva, foi utilizado glicerol P.A., glicerina P.A. e glicerina bruta oriunda da transesterificação da indústria do biodiesel doada pelo Departamento de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), em Ilhéus-BA. As cepas de *Xanthomonas* utilizadas foram doadas da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico – IBSBF, Campinas-SP.

10

EXEMPLO 2

- Como referência demonstrativa e não restritiva, ~~as cepas dos microrganismos usados na~~ produção de polímeros tipo goma xantana, para não perderem sua viabilidade, foram conservadas, por repicagem, a cada período de 15 dias, em tubo contendo meio de cultura
- 15 sólida YM agar, incubadas em temperatura entre 25 a 32°C por 2 dias. Para a propagação celular foi produzida inicialmente uma solução inóculo de células das cepas com idade de 48 horas em meio YM líquido (sem agar) e colocado em agitador orbital na temperatura de 28 ± 2°C e agitação de 150 a 250 rpm.

20 EXEMPLO 3

Como referência demonstrativa e não restritiva, uma solução aquosa contendo 0,5 a 10% de glicerina ou glicerol na forma líquida, pura e oriunda do biodiesel, cada um testado

independentemente, obtidos de acordo com EXEMPLO 1, em um frasco erlenmeyer de 250 mL, foi submetida a agitação para obtenção da máxima homogeneização.

EXEMPLO 4

5 Como referência demonstrativa e não restritiva, 50 a 120 mL do homogeneizado produzido de acordo com o EXEMPLO 3, são distribuídos em frascos erlenmeyer de 250 mL, adicionado 0,005 a 0,5% de uréia (fonte de nitrogênio) e 0,01 a 1,0% de K_2HPO_4 (fonte de potássio e fósforo) são distribuídos em frascos erlenmeyers, resistente a autoclavagem, de 250 mL. Caso necessário, o pH do meio deve ser ajustado próximo à neutralidade. Os 10 frascos foram esterilizados em autoclave a 100 a 140°C por 15 a 50 minutos. Após resfriar a solução, os frascos são inoculados com 10 a 20% de solução de células de *Xanthomonas* preparada conforme o EXEMPLO 2, incubados a 25 a 32°C durante 48 a 144 horas, em condições de agitação (200 a 300 rpm).

15 EXEMPLO 5

Como referência demonstrativa e não restritiva, a goma xantana produzida é precipitada com álcool etílico numa proporção de 1:3 a 1:4 (v/v), e seca em estufa ($30 \pm 2^\circ C$) por 24 a 72 horas. Após a fermentação, foi analisado no caldo fermentativo de cada frasco, a concentração de goma xantana produzida. Utilizando o glicerol PA. líquida obteve-se 1,3 a 20 8,2 $g L^{-1}$ de polissacarídeo tipo goma xantana, utilizando a glicerina pura líquida obteve-se 2,3 a 5,0 $g L^{-1}$ de polissacarídeo tipo goma xantana e, utilizando a glicerina bruta líquida obteve-se 1,8 a 5,5 $g L^{-1}$ de polissacarídeo tipo goma xantana, dependendo da cepa de

Xanthomonas utilizada. Estes valores foram de 1 a 10 vezes maiores que os obtidos para produção de goma xantana a partir de sacarose como fonte de carbono no meio fermentativo, nas mesmas condições de produção dependendo da cepa utilizada. Os biopolímeros produzidos apresentaram coloração clara, produzindo um polímero de características especiais, de baixo custo visto que o substrato utilizado é de baixo valor comercial.

EXEMPLO 6

- 10 Como referência demonstrativa e não restritiva, a viscosidade aparente máxima das gomas obtidas, dependendo das cepas *Xanthomonas* utilizadas, variou de 180,67 a 208,82 mPa.s, utilizando glicerol ou glicerina pura e oriunda do biodiesel; e de 78,31 a 146,92 mPa.s, utilizando sacarose pura, ambas numa concentração de 1%, e taxa de cisalhamento de $25s^{-1}$ a 25°C.

REIVINDICAÇÕES

1. “PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO TIPO GOMA XANTANA POR *Xanthomonas* EM MEIO FERMENTATIVO COM GLICEROL OU GLICERINA”,
5 utilizando a bactéria *Xanthomonas*, CARACTERIZADO pelo aproveitamento do resíduo industrial, glicerol ou glicerina oriunda da produção de biodiesel ou de outras fontes, como fonte de carbono em processos fermentativos, sendo extremamente favorável.
2. “PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO TIPO GOMA XANTANA POR *Xanthomonas* EM MEIO FERMENTATIVO COM GLICEROL OU GLICERINA”,
10 utilizando a bactéria *Xanthomonas*, CARACTERIZADO pelo aproveitamento do resíduo industrial, glicerol ou glicerina, puro ou impuro, na suas diversas formas físicas (sólida, líquida ou outras formas), da produção de biodiesel ou de outra fonte, como fonte de carbono no substrato em processos fermentativos, sendo extremamente favorável.
3. “PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO TIPO GOMA XANTANA POR
15 *Xanthomonas* EM MEIO FERMENTATIVO COM GLICEROL OU GLICERINA”, de acordo com a reivindicação 1 e 2, CARACTERIZADO pela aplicação de diferentes valores para as variáveis físicas do processo fermentativo, tais como: concentração da fonte de carbono (0,5 a 70%), temperatura de 25 a 32°C, pH de 6 a 7, rotação com injeção controlada de oxigênio ou não e tempo de fermentação de 2 a 6 dias.
- 20 4. “PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO TIPO GOMA XANTANA POR *Xanthomonas* EM MEIO FERMENTATIVO COM GLICEROL OU GLICERINA”, de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, CARACTERIZADO pela suplementação dos resíduos

com fonte de nitrogênio, fósforo e potássio no meio fermentativo, de natureza diversa e em concentrações variadas determinadas para cada cepa utilizada de *Xanthomonas*.

5 5. “PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO TIPO GOMA XANTANA POR *Xanthomonas* EM MEIO FERMENTATIVO COM GLICEROL OU GLICERINA”, de acordo com a reivindicação 1, 2, 3 e 4, CARACTERIZADO pelo uso de bioreatores e ou fermentadores contínuos ou em batelada, aerados e agitados mecanicamente.

10 6. “PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO TIPO GOMA XANTANA POR *Xanthomonas* EM MEIO FERMENTATIVO COM GLICEROL OU GLICERINA”, de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4 e 5, CARACTERIZADO pelas etapas de pasteurização e/ ou esterilização; pela purificação da goma produzida com ou sem centrifugação; da precipitação com solventes orgânicos; separação por filtração; secagem por estufa, liofilização ou atomizador tipo spray drier; e moagem para obtenção da goma xantana em pó.

RESUMO

A presente patente de invenção refere-se a "PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO TIPO GOMA XANTANA POR *XANTHOMONAS* EM MEIO FERMENTATIVO COM GLICEROL OU GLICERINA" utilizando glicerina ou glicerol, puro ou impuro, com diferentes formas físicas (sólida ou líquida) ou de outras formas, subproduto do biodiesel ou de outras fontes, como fonte de substrato, suplementado ou não com nitrogênio ou potássio e outros nutrientes, em meio de cultura utilizado na fermentação por *Xanthomonas* para a obtenção do polissacarídeo tipo goma xantana, utilizando reatores aerados e agitados. A invenção visa obter substratos alternativos de baixo custo para o processo fermentativo na produção de polissacarídeo tipo goma xantana quando comparado ao processo industrial de bioconversão de sacarose ou glicose. Esta invenção envolve a otimização dos parâmetros físico de fermentação tais como pH, temperatura, tempo e velocidade de agitação, e a avaliação da necessidade de fonte adicional de nitrogênio, fósforo e potássio, ou outros nutrientes, no substrato.