



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

**INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO E AGITAÇÃO NAS
PROPRIEDADES DE GOMAS XANTANA PRODUZIDAS
POR *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 COM
GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL: OTIMIZAÇÃO
E CINÉTICA DO BIOPROCESSO**

DENILSON DE JESUS ASSIS

Salvador

2013

INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO E AGITAÇÃO NAS
PROPRIEDADES DE GOMAS XANTANA PRODUZIDAS
POR *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 COM
GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL: OTIMIZAÇÃO E
CINÉTICA DO BIOPROCESSO

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Janice Izabel Druzian

Co-orientador: Prof. Dr. Giovani Brandão Mafra de Carvalho

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Mestrado em Engenharia Química da UFBA – Escola Politécnica, com requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, Área de Concentração: Biotecnologia.

Salvador

2013

S848 Assis, Denilson de Jesus.

Influência da aeração e agitação nas propriedades das gomas xantana produzidas por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 com glicerina residual do biodiesel: Otimização e cinética do bioprocesso. – Salvador, 2014.

122f. : il. Color.

Orientador: Prof^a. Dr^a Janice Izabel Druzian.

Co-Orientador: Prof. Dr. Giovani Brandão Mafra de Carvalho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Escola Politécnica, 2014.

1. Goma xantana. 2. Glicerina. 3. Biodiesel. 4. Otimização. I. Druzian, Janice Izabel. II. Carvalho, Giovani Brandão Mafra de. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDD: 660.6

TERMO DE APROVAÇÃO

**INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO E AGITAÇÃO NAS PROPRIEDADES DE
GOMAS XANTANA PRODUZIDAS POR *Xanthomonas campestris*
mangiferaeindicae 2103 COM GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL:
OTIMIZAÇÃO E CINÉTICA DO BIOPROCESSO**

Denilson de Jesus Assis

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

Prof^a. Dr^a. Janice Izabel Druzian

Doutora em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Dr^a. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma

Doutora em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Samuel Luporini

Doutor em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Agosto de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus amados pais, Ana Lucia Assis e Sebastião Assis por todo o amor, incentivo,
dedicação e esforços em prol da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos amores da minha vida, que verdadeiramente acreditaram e torceram por mim. “Mainha e painho” eu amo vocês e muito obrigado por serem meus.

Aos meus irmãos, Deivison e Daniel, pela dedicação, respeito e acima de tudo, pela amizade.

Aos meus queridos amigos, Luciel, Wagner, Jô, Paula, Tony e Anna, pela confiança, aprendizado e por todos os momentos que passamos juntos.

Aos que residiram e dividiram a vida comigo. Cláudio, Anderson, Patricia, Méquio, Yure, Carlos e Tulio, muito obrigado pelo apoio, incentivo, companhia e principalmente por torcerem e acreditarem no meu sucesso.

Aos companheiros de Laboratório Larissa, Márcio, Tamiris, Luciane, Carol, Lillian, Jânia, Gleice, Jaff e Léo, que diretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho, muito obrigado pelo companheirismo, pelos ensinamentos e pela boa vontade de todos.

Á Professora Janice Druzian pela orientação, comprometimento e pela confiança depositada em meu trabalho.

Ás professoras Ana Katerine Carvalho e Silvana Mattedi pelas sugestões, que muito contribuíram para este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFBA, pelo aprimoramento profissional.

Á CAPES pela bolsa concedida durante a realização do curso.

Ao projeto FAPESB (APP0065/2009) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ivv
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Polissacarídeos microbianos	5
3.2 Xanthomonas sp.	7
3.3 Goma xantana	8
3.3.1 Composição da goma xantana e estrutura	9
3.3.2 Biossíntese	11
3.3.3 Processo fermentativo	13
3.3.3.1 Inóculo	17
3.3.3.2 Utilização de substratos alternativos como meio fermentativo	17
3.3.3.3 Cinética da produção de xantana	20
3.3.3.4 Recuperação e Purificação da goma xantana.	21
3.3.4 Propriedades das gomas xantanas	22
3.3.4.1 Reologia	22
3.3.4.2 Composição química de goma xantana	27
3.3.4.3 Massa Molecular	29
3.3.4.4 Análise Termogravimétrica	31

4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Microrganismos	33
4.2 Metodologias	33
4.2.1 Composição centesimal do substrato alternativo	33
4.2.2 Esterilização dos meios e materiais	33
4.2.3 Manutenção dos microrganismos	34
4.2.4 Preparo do Inóculo	34
4.2.5 Curva de crescimento	34
4.2.6 Produção de goma xantana	35
4.2.6.1 Avaliação do tempo de fermentação	35
4.2.6.2 Efeito de variáveis de processo	36
4.2.7 Recuperação da goma xantana	38
4.2.8 Cinética do processo fermentativo	39
4.2.9 Caracterização das gomas xantana	40
4.2.9.1 Análise reológica das gomas xantana	40
4.2.9.2 Composição química	41
4.2.9.3 Massa molecular ponderada	42
4.2.9.4 Análise termogravimétrica (TGA)	42
4.2.10 Influência de diferentes sais na viscosidade aparente das gomas xantana	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Composição da glicerina residual do biodiesel (GRB)	44
5.2 Curva de crescimento microbiano	46
5.3 Influência do tempo de fermentação na produção e viscosidade da goma xantana	47
5.4 Estudo dos efeitos da aeração e agitação na produção e propriedades da goma xantana em biorreator de 4,5 L (3,0 L de volume útil)	48
5.4.1 Produção de goma xantana (Y1)	50

5.4.2 Produção de Biomassa (Y2)	54
5.4.3 Viscosidade aparente (Y3)	57
5.4.4 Composição química dos biopolímero (Y4, Y5, Y6, Y7)	61
5.4.5 Massa molecular (Y8)	69
5.4.6 Degradação térmica (Y9)	73
5.5 Cinética da produção de goma xantana a partir da fermentação de GRB por <i>Xanthomonas campestris mangiferaeindicae</i> 2103	77
5.6 Influência da natureza e concentração de sais na viscosidade aparente da goma xantana produzida nas condições otimizada	81
6 CONCLUSÕES	86
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica de <i>Xanthomonas campestris</i> (GUEVARA; DEBROT, 1984) (A); e laranja com cancrios causados por <i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> (FILHO, 2005) (B).	7
Figura 2. Estrutura do exopolissacarídeo goma xantana (MOOSAVI-NASAB; SHEKARIPOUR; ALIPOOR, 2009).	10
Figura 3. Rotas bioquímicas para síntese de goma xantana. Adaptado de Rosalam; England (2006).	12
Figura 4. Formação de glicerina bruta durante o processo de transesterificação. Adaptado de Ayoub e Abdullah (2012).	18
Figura 5. Classificação do comportamento reológico de fluidos. Adaptado de Rao; Steffe (1992).	23
Figura 6. Aspectos das colônias de <i>Xanthomonas campestris mangiferaeindicae</i> 2103.	34
Figura 7. Biorreator Tecnal-TecBio de 4,5L utilizado para produção das gomas xantana a partir da GRB.	35
Figura 8. Efeito da purificação no aspecto visual da goma xantana oriunda da GRB. .	38
Figura 9. Curva de crescimento em função da concentração de <i>Xanthomonas campestris mangiferaeindicae</i> 2103 (A) e correlação entre a concentração celular e a medida de densidade óptica do meio (B) ao longo de 48 h de incubação a 180 rpm e 28°C.	46
Figura 10. Produção de goma xantana obtida da fermentação de GRB por <i>Xanthomonas campestris mangiferaeindicae</i> 2103 (2,0% GRB, 300 rpm e 1,0 vvm) e viscosidade aparente das soluções aquosas das gomas xantana produzida ao longo de 168 de fermentação.	47
Figura 11. Superfície de resposta para produção de goma xantana (Y1) obtidas da fermentação da GRB por <i>Xanthomonas campestris mangiferaeindicae</i> 2103 em função da aeração (X1) e da agitação (X2).	52

Figura 12. Superfície de resposta para produção de biomassa (Y2) em função da aeração (X1) e da agitação (X2).	56
Figura 13. Superfície de resposta para viscosidade aparente (Y3) em função da aeração (X1) e da velocidade de agitação (X2).	59
Figura 14. Viscosidade aparente (Y3) das soluções aquosas de goma xantana a 0,5% (m/v) e 25 °C frente à variação na taxa de cisalhamento (25 – 1000 s ⁻¹).	60
Figura 15. Cromatogramas dos padrões de açúcares (glicose e manose) separados por CLAE-IR e padrões ácidos (glucurônico e pirúvico) separados por CLAE-UV (195 nm)	62
Figura 16. Cromatograma (CLAE-IR) da composição de açúcares das gomas xantana obtidas no ponto central (A); nos níveis máximos de aeração e agitação (1,5 vvm e 700 rpm) (B); nos níveis mínimos (0,5 vvm e 300 rpm) (C) e da xantana Sigma(D).	63
Figura 17. Cromatograma da composição de ácidos das gomas xantana obtidas no ponto central (A); nos níveis máximos de aeração e agitação (1,5 vvm e 700 rpm) (B); nos níveis mínimos (0,5 vvm e 300 rpm) (C); e da xantana Sigma (D).	63
Figura 18. Curva de calibração (log MM <i>versus</i> Tr) dos padrões de dextranas usados para quantificação de massa molecular das gomas xantana.	70
Figura 19. Cromatogramas da separação em CLAE-IR das gomas xantana obtidas no ponto central (1,0 vvm e 500 rpm) (A); nos mínimos níveis de aeração e agitação (0,5 vvm e 300 rpm) (B); nos níveis máximos (1,5 vvm e 700 rpm) (C); e da goma xantana padrão (Sigma) (D).	70
Figura 21. Cromatograma as solução aquosa de GRB a 2,0% antes da fermentação (A); após 72 h (B); e após 120 h de fermentação (C).	78
Figura 22. Acompanhamento do consumo de substrato e formação de biomassa e produto ao longo de 120 horas de fermentação.	79
Figura 23. Estimativa do tipo de processo fermentativo baseado no comportamento das velocidades específica (μ) ao longo de 120 de fermentação.	81
Figura 24. Influência da temperatura no índice de fluxo das soluções aquosa e salinas da goma xantana obtida da fermentação de GRB por <i>Xanthomonas campestris mangiferaeindicae</i> 2103 no ponto ótimo (1,0 vvm e 500 rpm).	84

Figura 25. Influência da temperatura no índice de consistência (K) das soluções aquosas e salinas da goma xantana oriunda da GRB no ponto otimizado. 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das gomas industriais quanto ao tipo e origem.....	8
Tabela 2. Matriz do planejamento experimental composta com a variável aeração (X1) e agitação (X2) e seus respectivos níveis em valores reais e codificados.	37
Tabela 3. Matriz do planejamento experimental composto por variáveis independentes (valores reais e codificados) e resposta de produção e caracterização das gomas xantanas purificadas obtidas a partir da GRB por <i>Xanthomonas campestris mangiferaeindicae</i> 2103.	49
Tabela 4. Estimativa de efeitos de X1 e X2 na produção de goma xantana (Y1).	50
Tabela 5. Análise de variância para avaliação estatística do modelo de produção de goma xantana (Y1) obtidas da fermentação da GRB por <i>Xanthomonas campestris mangiferaeindicae</i> 2103.	51
Tabela 6. Estimativa de efeitos da aeração(X1)e da velocidade de agitação (X2) na concentração de biomassa (Y2).....	54
Tabela 7. Análise de variância para avaliação estatística do modelo para concentração de biomassa (Y2).	55
Tabela 8. Estimativa de efeitos de X1 e X2 na viscosidade aparente das soluções a 0,5% xantana (Y3) medidas a 25°C e taxa de cisalhamento de 25s ⁻¹	57
Tabela 9. Análise de variância para avaliação estatística do modelo para viscosidade aparente das soluções das gomas xantana (Y3).....	59
Tabela 10. Equações da regressão linear obtidas da relação entre concentração e área dos picos dos padrões de açúcares e ácidos urônicos.....	62
Tabela 11. Estimativa de efeitos para composição em termos de Y4, Y5, Y6 e Y7.	64
Tabela 12. Sumário da análise de variância para avaliação estatística do modelo para os dados de composição das gomas xantana em termos do teor de glicose (Y4), manose (Y5), ácido glucurônico (Y6) e ácido pirúvico (Y7).	67
Tabela 13. Fração molar das gomas xantanas obtidas no planejamento experimental.	68
Tabela 14. Estimativa de efeitos da aeração (X1) e agitação (X2) na massa molecular ponderada das xantanas obtidas (Y8).	71
Tabela 15. Análise de variância para avaliação estatística do modelo referente massa molecular ponderada das gomas xantana obtidas da fermentação de GRB por <i>Xanthomonas campestris mangiferaeindicae</i> (Y8).	72

Tabela 16. Estimativa de efeitos da aeração (X1) e agitação (X2) na temperatura inicial de degradação térmica (Y9) das xantanas obtidas da fermentação de GRB.	76
Tabela 17. Análise de variância para avaliação estatística do modelo referente à temperatura inicial de degradação térmica (Y9).....	76
Tabela 18. Parâmetros cinéticos obtidos ao longo de 120 de fermentação nas condições ótimas de aeração e agitação.	79
Tabela 19. Influências de sais mono, bi e trivalente, em diferentes concentrações, na viscosidade aparente da goma xantana oriunda da GRB nas condições ótimas.....	82

RESUMO

Bactérias do gênero *Xanthomonas*, quando em condições propícias, são capazes de produzir um exopolissacarídeo denominado goma xantana, normalmente obtido por cultivo submerso em meio contendo substratos convencionais como glicose e sacarose. Este biopolímero, por apresentar excelentes propriedades reológicas e estabilidade frente a uma ampla faixa de pH e temperatura, é amplamente utilizado como aditivo em indústrias de alimentos, farmacêutica e petroquímica. O uso de substratos alternativos, em detrimento dos convencionais, pode reduzir o custo do biopolímero. No presente trabalho, foram investigados os efeitos da aeração (vvm) e agitação (rpm) na formação de biomassa, na produção e nas propriedades das gomas xantana obtidas a partir da fermentação de glicerina residual do biodiesel (GRB) por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 . Além disso, foram avaliados os parâmetros cinéticos de produção e a influência da adição de diferentes sais na viscosidade das gomas xantana obtidas nas condições ótimas de aeração e agitação. Os níveis das variáveis aeração e agitação variaram de acordo com um delineamento composto central rotacional (DCCR) fracionada 2², com dois pontos axiais ($\alpha = \pm 1,41$) e triplicata no ponto central. As xantanas foram obtidas a partir de meio contendo 2,0% (v/v) de glicerina residual do biodiesel, minimamente suplementada com 0,01% (m/v) de ureia, 0,1% (m/v) de K₂HPO₄ e 20% de inóculo. Os cultivos foram conduzidos em biorreator de 4,5L, a 28°C, pH de inicial de 7,0 por 120 horas. As xantanas obtidas foram analisadas quanto à produção, viscosidade aparente, composição de açúcares e ácidos, massa molecular e termogravimetria. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para avaliar os efeitos das variáveis sobre as respostas e otimizar o processo. A produção de xantana foi influenciada, individualmente, pela aeração e agitação, sendo favorecida em baixas aerações ou baixas agitações. A otimização apontou 0,97 vvm e 498 rpm para obter 5,59 g.L⁻¹ de xantana. A concentração de biomassa foi favorecida com baixas agitações ou aumento na taxa de aeração, sendo indicado pela otimização o emprego de 1,05 vvm e 484,75 rpm para obtenção de até 3,26 g.L⁻¹ de biomassa. A redução da velocidade de agitação acarretou no aumento da viscosidade das soluções de xantana (0,5%), sendo apontado pela otimização o emprego de 1,05 vvm e 497,60 rpm para atingir o máximo de até 255,40 mPa.s. Baixas aerações contribuíram para aumento do teor de glicose e manose na cadeia das xantanas. Além desta condição, o aumento individual na agitação

leva ao aumento no teor de manose e diminuição no teor de glicose. O teor de ácido glucurônico tende ao aumento com emprego de baixas agitações, enquanto o teor de ácido pirúvico aumenta significativamente. A massa molecular ponderada das xantanas obtidas foi influenciada pela agitação e aeração, apresentando maiores massas com baixas velocidades de agitações e altas taxas de aeração. O aumento na aeração e na velocidade de agitação induziu a produção de goma xantana com maior estabilidade térmica. Fatores de conversão velocidade instantânea e velocidade específica, estudados nas condições ótimas de produção, indicaram que a produção do polímero está parcialmente associada ao crescimento celular. A xantana obtida nas condições ótimas ao serem solubilizadas em soluções contendo sais mono (NaCl) e bivalentes (CaCl₂) apresentaram redução na viscosidade aparente de até 19,65% e 12,26%, respectivamente, enquanto a adição de sal trivalente (FeCl₃) conferiu aumento de até 10,76% na viscosidade aparente, indicando aumento na estabilidade do polímero em presença deste sal. Assim, a variação da aeração e velocidade de agitação na fermentação da glicerina residual do biodiesel por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, exerce grande influência na formação de biomassa, na produção de goma xantana e propriedades como: Viscosidade aparente, composição química, massa molecular e estabilidade térmica.

Palavras-chave: *Goma xantana, glicerina residual do biodiesel, otimização*

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Xanthomonas*, under favorable conditions, are capable of producing an exopolysaccharide known as xanthan gum, usually obtained by submerged cultivation of conventional substrates such as glucose and sucrose. This biopolymer, by presenting excellent rheological properties and stability in a wide range of pH and temperature, is widely used as an additive in food industry, pharmaceutical and petrochemical. The use of alternative substrates at the expense of conventional can reduce the cost of the biopolymer. In this study, we investigated the effects of aeration (vvm) and agitation (rpm) in the biomass formation, xanthan gum production and properties of xanthan gum obtained from the fermentation of residual glycerine biodiesel (RGB) by *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103. Furthermore, we evaluated the kinetic parameters of production and the influence of the addition of different salts on the viscosity of xanthan gum obtained under optimal conditions aeration and agitation. Levels of aeration and agitation varied according to a central composite rotational design (DCCR) fractionated 2^2 , with two axial points ($\alpha = \pm 1.41$) and in triplicate central point. Xanthans were obtained from medium containing 2.0% (v / v) glycerol residue of the biodiesel minimally supplemented with 0.01% (w / v) of urea, 0.1% (w / v) K_2HPO_4 and a 20% inoculum. The cultivations were performed in a 4.5 L bioreactor at 28 ° C, initial pH of 7.0 for 120 hours. Xanthans were analyzed for the production, viscosity, composition of sugars and acids, molecular mass and thermogravimetry. The response surface methodology was used to assess the effects of variables on the responses and optimization. The production of xanthan was influenced individually by agitation, being favored at low agitations. The optimization showed 0.97 vvm and 498 rpm for up to 5.59 gL⁻¹ of xanthan. The biomass concentration was favored at low agitation, or aeration rate increase was indicated by optimizing the use of 1.05 vvm and 484,75 rpm to obtain up to 3.26 gL⁻¹ biomass. The reduction of the agitation speed or aeration rate increase caused an increase in viscosity of xanthan solutions (0.5%), being indicated by optimizing the use of 1.05 vvm and 497.60 rpm to achieve maximum up 255.40 mPa.s Low aeration contributed to increased content of glucose and mannose in the chain of xanthans beyond this condition, the individual increase in agitation led to increase in mannose and reduction on glucose content. The glucuronic acid content tended to increase with use of low agitation, whereas pyruvic

acid increased significantly at low agitation speeds. The molecular mass of the weighted xanthans obtained was influenced by agitation and aeration, with higher masses capable of low agitation and high aeration. The increase aeration and agitation speed induced the production of xanthan gum with a higher thermal stability. Conversion factors and instant speeds and specific speed studied in optimum conditions of production, indicated that the production of the polymer is partly associated with cell growth. The xanthan gum obtained under optimal conditions to be solubilized in solutions containing mono salt (NaCl) and divalent (CaCl₂) showed reduction in apparent viscosity of up to 19.65% and 12.26% respectively, while addition of trivalent salt (FeCl₃) conferred increased to 10.76% in viscosity, indicating increased stability of the polymer in presence of salt. Thus, the variation of aeration and agitation speed the fermentation of residual glycerine from biodiesel by *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 exerts great influence on the biomass formation, on xanthan production and properties as: Apparent viscosity, chemical composition, molecular mass and thermal stability.

Keywords: *Xanthan Gum, residual glycerin from biodiesel, optimization*

Capítulo 1 - Introdução

1. INTRODUÇÃO

Biopolímeros microbianos são macromoléculas formadas normalmente por monossacarídeos e derivados ácidos urônicos, que devido a sua capacidade de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso são também conhecidos como gomas (MOREIRA *et al.*, 2003). Essa classe de polímero pode exibir propriedade estabilizante, espessante, colóide protetor, agente de suspensão e gelificante. Além disso, apresentam algumas vantagens sobre os polímeros sintéticos, obtidos de vegetais e algas marinhas, tais como: produção independente das condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas alternativas, maior rapidez na obtenção, assim como a possibilidade de modificação das propriedades reológicas através do controle de parâmetros do processo (MAUGERI FILHO, 2001; FARIA, 2002).

A goma xantana é um polímero natural de ampla aplicação, produzido por bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*, sendo *Xanthomonas campestris* a espécie mais utilizada. Soluções aquosas desses biopolímeros apresentam excelentes propriedades reológicas, atribuídas ao seu caráter pseudoplástico, além da estabilidade da viscosidade numa ampla faixa de pH e temperatura (KENNED; BRADSHAW, 1984; ROSALAM; ENGLAND, 2006; MELO *et al.*, 2011). Este polissacarídeo é aplicado como estabilizante de emulsões, agente de suspensão e espessante no setor alimentício, farmacêutico e de produtos agrícolas (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). Na indústria de petróleo é utilizado como agente de controle de mobilidade na recuperação do óleo e lama de perfuração de poços (SUTHERLAND, 2002).

Os maiores produtores de xantana são Merck e Pfizer nos Estados Unidos; Sanofi-Elf, Rhône Poulenc e Mero-Rousselot-Santia na França (PRADELLA, 2006; GARCÍA-OCHOA, 2000). De acordo com Ramos (2011), a produção mundial é de cerca de 40.000 toneladas por ano, movimentando um mercado atual de aproximadamente US\$ 270 milhões, sendo estimado para 2015 US\$ 400 milhões e 80.000 t/ano.

A obtenção de goma xantana ocorre por cultivo submerso aeróbico, a aproximadamente 28°C e depende da composição do meio, da linhagem utilizada, como também das condições de cultivo e técnicas de alimentação. Obtendo-se deste modo uma variação nos rendimentos e na qualidade do polímero, pois essas variáveis influenciam na estrutura molecular e nas propriedades do biopolímero resultante (CASAS *et al.*, 2000; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; ROSALAM; ENGLNG, 2006).

Capítulo 1 - Introdução

A massa molecular da goma xantana é 2.000.000 Da (Daltons), mas pode alcançar de 15 a 30.000.000 Da. Em geral, a estrutura primária do biopolímero consiste de uma unidade pentassacarídica composta de D-glicose, resíduos de ácido D-glucurônico e de manose em uma proporção molar de 2:2:1 e proporções variáveis de grupos substituintes de piruvato e acetil. A cadeia principal de goma de xantana é composta por unidades de D-glicose (β -1, 4) ligada a cadeias laterais trissacarídicas compostas por unidades de manose (β -1, 4) e de ácido glucurônico (β -1, 2) (JANSSON; KENNE; LINDBERG, 1975; MORENO *et al.*, 1998;. ROSALAM; ENGLAND, 2006).

A estrutura, composição e a viscosidade dos polissacarídeos microbianos depender de vários fatores, tais como a composição do meio de cultura, da fonte de carbono, da fonte de nitrogênio, sais minerais, do tipo de estirpes de *Xanthomonas*, e das condições de fermentação, tais como tempo, temperatura, pH, taxa de concentração de oxigênio e velocidade de agitação.

A maioria dos métodos para obtenção de goma xantana comercial utiliza glicose ou açúcar invertido como fonte de carbono (LETISSE, CHEVALLEREAU; SMON, 2001; PAPAGIANNI *et al.*, 2001). Entretanto, a utilização de substratos convencionais é um fator crítico para o custo de produção do polímero. Assim, outros substratos foram testados, como sacarose (GARCÍA-OCHOA, SANTOS; ALCON, 2004), arroz hidrolisado, melão de cana de açúcar (EL-SALAM; FADEL; MURAD, 1994), suco de coco, amido não modificado (ROSALAM; ENGLAND, 2006), ácido cítrico (JANA; GHOSH, 1995), resíduo de maçã (DRUZIAN; PLAGRIARINI, 2007), soro de leite (BRANDÃO *et al.*, 2010), resíduo de crustáceos e bivalves PI011100001119 (COSTA *et al.*, 2010) casca de cacau e cana de açúcar (DINIZ; DRUZIAN; AUDIBERT, 2012).

No Brasil e em outros países, pesquisas vêm sendo realizadas enfocando a triagem de fontes de carbono para a biossíntese de produtos por microrganismos, visando assim, a utilização de resíduos em substituição às fontes de carbono convencionais. A utilização de glicerol já foi testada por alguns autores para conversão microbiana a produtos como polihidróxibutirato (ZHU *et al.*, 2010); ácido clavulânico (TEODORO *et al.*, 2010); eritropoietina recombinante (ÇELIK *et al.*, 2008), ácido cítrico (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; RYWIŃSKA *et al.*, 2011) e goma xantana (PI0705950-7 BRANDÃO; NERY; DRUZIAN, 2009; REIS *et al.*, 2010).

A glicerina é um importante subproduto do processo de obtenção de biodiesel. De acordo com Cardona, Posada e Montoya (2007) a cada litro de biodiesel produzido são gerados em torno de 4,53 Kg de glicerina residual. Assim, Da Silva, Mack e

Capítulo 1 - Introdução

Contieiro (2009), Albarelli, Santos e Holanda (2011) estimam que entre 2008 e 2013, a indústria de biodiesel brasileiro terá um excedente de 70.000 toneladas de glicerina por ano, gerando, portanto, aumento nas possibilidades de impactos ao meio ambiente.

Neste contexto, a utilização da glicerina residual do biodiesel torna-se uma alternativa promissora para síntese de goma xantana.

Baseado nas considerações expostas, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos das variáveis aeração e agitação na produção de goma xantana obtidas por fermentação da glicerina residual do biodiesel, assim como na formação de biomassa, viscosidade aparente da solução aquosa, composição química, massa molecular e na temperatura inicial de degradação térmica dos biopolímeros produzidos. Além disso, determinar os parâmetros cinéticos de produção e avaliar a influências de diferentes sais na viscosidade das soluções de goma xantana.

Capítulo 2 – Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos das variáveis aeração e velocidade de agitação na produção e propriedades das gomas xantanas obtidas da fermentação da glicerina residual do biodiesel (GRB) por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a composição centesimal da GRB utilizada como substrato alternativo para obtenção de goma xantana;
- Selecionar o tempo de fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 baseado no seu efeito sobre a produção e viscosidade do polímero obtido;
- Estudar os efeitos da aeração (X1) e velocidade de agitação (X2) na produção, de goma xantana, formação de biomassa, viscosidade aparente das soluções aquosa, composição química em termos de glicose, manose, ácido glucurônico e ácido pirúvico, assim como na massa molecular e estabilidade térmica dos biopolímeros obtidos da fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103;
- Determinar, quando possível, a combinação ótima da variável aeração (X1) e velocidade de agitação (X2) para maximizar a produção e propriedades das gomas xantana obtidas da fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103;
- Avaliar os parâmetros cinéticos de produção de goma xantana no ponto ótimo;
- Avaliar a influência da adição de diferentes tipos e concentrações de sais na viscosidade aparente dos biopolímeros obtidos no ponto ótimo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Polissacarídeos microbianos

A maior parte dos carboidratos disponíveis na natureza está na forma de polissacarídeos solúveis em água. Estes podem ser extraídos de raízes, caules e sementes de vegetais (amido e inulina), estrutura celular de tecidos vegetais terrestre (pectina, carragenas) e de algas marinhas (agar e alginato) (TONELI; MURR; PARK, 2005).

Os polissacarídeos microbianos são macromoléculas produzidas por fungos, bactérias e leveduras constituídos por monossacarídeos e derivados de ácidos (SUTHERLAND, 1982). Eles podem ser classificados como: homopolissacarídeos, compostos apenas por um tipo de monossacarídeo (exemplo: dextrana e pululana) e os heteropolissacarídeos, compostos por dois ou mais monossacarídeos com ou sem ramificações (exemplo: gelana e xantana) (LAWS; GU; MARSHALL, 2001; MONSAN *et al.*, 2001). Além dessa classificação, os biopolímeros podem ser divididos quanto a sua localização morfológica, podendo ser: intracelular, quando aparece localizado no interior da célula ou como parte da membrana citoplasmática e armazenam diferentes formas de carbono; da parede celular, quando formado como parte estrutural da célula; e extracelular, quando estão associados à superfície celular ou são secretados no meio extracelular (SUTHERLAND, 1982). As pesquisas visando à aplicação industrial estão concentradas nos polissacarídeos extracelulares (EPS), pois resultam em processos de extração e purificação mais simples e produtividade mais elevada (DRUZIAN, 2000).

A importância dos EPS nas células inclui: proteger o microrganismo contra dessecação; servir de barreira, impedindo ataque de vírus e anticorpos que se ligam aos sítios específicos da parede celular; acoplar e neutralizar toxinas carregadas ou íons metálicos tóxicos; atuar como fonte de carbono e energia, além de interagir com células de outras espécies em relações específicas, simbióticas ou patogênicas (PACE, 1991).

Os polissacarídeos microbianos por apresentarem propriedades similares aos de origem animal e vegetal, destacam-se como uma alternativa viável. Em alguns casos, tornam-se mais vantajosos, por possuírem propriedades específicas como elevada viscosidade, estabilidade térmica, elevada massa molecular, entre outras; por não

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

dependerem de condições climáticas, fatores químicos e físicos do ambiente; e por serem menos suscetíveis à variabilidade na sua qualidade, uma vez que sua produção pode ser controlada (VENDRUSCOLO, 1995; GARCÍA-OCHOA; CASAS; GÓMEZ, 2000; MAUGERI FILHO, 2001). Além disso, sua produção, ao contrário dos polissacarídeos de origem vegetal e animal, independe de instabilidades políticas das regiões produtoras, estando, portanto, menos susceptíveis a escassez e alta de preços (SOUZA, GARCÍA-CRUZ, 2004).

Os polissacarídeos microbianos são materiais renováveis, biodegradáveis, geralmente atóxicos e com propriedades reológicas específicas. Portanto, são de grande aplicabilidade industrial em substituição aos polissacarídeos convencionais (FREITAS *et al.*, 2009). A potencialidade de uso abrange as indústrias de alimentos, fármacos, tintas, defensivos agrícolas e outros, podendo ser aplicado como agentes espessantes, estabilizantes, gelificantes, emulsionantes, coagulantes e formadores de filmes (MAIA; PORTE; SOUZA, 2000; BOZA, 2002; ARAÚJO; ALVES, 2003; CUNHA *et al.*, 2004; GÓMEZ *et al.*, 2007).

Os exopolissacarídeos microbianos apresentam alto peso molecular e são constituídos por monossacarídeos aniônicos, neutros e catiônicos ou seus derivados, unidos entre si por ligações glicosídicas; contendo, frequentemente, grupos laterais (acetato, piruvato, succinato, componentes lipídicos, nitrogênio orgânico ou íons inorgânicos). O grau de substituição nestes grupos laterais exerce grande influência nas propriedades dos polímeros (PACE, 1991; SUTHERLAND, 1993).

Diversas bactérias são isoladas e cultivadas para a produção comercial de biopolímeros para serem aplicados como aditivos em diversos setores tais como: goma xantana, produzida pela bactéria *Xanthomonas* e aplicada principalmente como espessante e estabilizante em alimentos, tintas, fármacos e cosméticos; gelana, obtida de *Sphingomonas paucimobilis*, aplicada como gelificante em alimentos; curdlana, obtida de *Alcaligenes faecalis var. Myxogenes*, aplicada como modificador de textura, agente de viscosidade e em alimentos de baixa caloria; dextrana, produzida por *Leuconostoc mesenteroides* para ser aplicada como agente de viscosidade em alimentos e hipocolesterolêmico; levana, produzida por *Zimomona mobilis* e aplicada como espessante e estabilizantes em alimentos, bem como imonumodulador e anticarcinogênico; succinoglucanas, obtidas *Rhizobium meliloti e Agrobacterium radiobacter*, sendo utilizada em alimentos como gelificante e fármacos como imobilizador; Alginatos, produzidos por *Pseudomonas e Azobacter*, normalmente

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

utilizado como matriz imobilizadora de células e enzimas; por fim o ácido hialurônico, sintetizado por alguns *Streptococcus*, sendo utilizado em cosméticos como hidratante (KUMAR; MODY; JHA, 2007; PIERMARIA; CANAL; ABRAHAM, 2008; SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008)

3.2 *Xanthomonas* sp.

Xanthomonas são bactérias pertencentes à família *Pseudomonaceae*. Microrganismos deste gênero são fitopatogênicos responsáveis por causar podridão negra em crucíferas (Figura 1), com exceção da *Xanthomonas maltophilia* que é patógeno humano (HOLT *et al.*, 1994; ESGALHADO *et al.*, 1995; CROSSMAN *et al.*, 2004).

As bactérias *Xanthomonas campestris* apresentam morfologia de bastonetes delgados (0,4 - 0,7 μ m de largura e 0,7 - 1,8 μ m de comprimento), Gram-negativas, catalase positiva, oxidase negativas e móveis por único flagelo (1,7 - 3 μ m de comprimento). Suas colônias são normalmente amarelas, devido à presença de xantomonadinas; lisas e viscosas (GARCÍA-OCHOA, 2000).

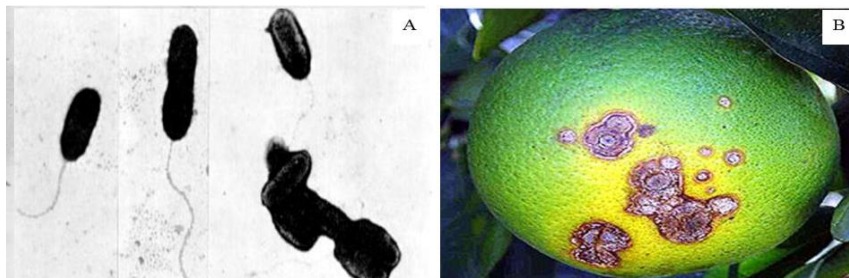


Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica de *Xanthomonas campestris* (GUEVARA; DEBROT, 1984) (A); e laranja com cancos causados por *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (FILHO, 2005) (B).

A maioria dos patovares de *X. campestris* e outras espécies produzem EPS e sua produção está relacionada com a sua sobrevivência na superfície do vegetal hospedeiro, uma vez que é um ambiente inóspito (HAYWARD, 1993). Essas bactérias são agentes causadores da podridão negra, considerada a doença mais destrutiva de crucíferas em todo o mundo. Muitas espécies são suscetíveis à infecção, incluindo couve, brócolis, couve-flor e repolho. A podridão negra ocorre em solos úmidos com temperatura em torno de 20 a 30°C, as quais são comuns em regiões tropicais e subtropicais

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

(MARIANO *et al.*, 2001). A virulência da linhagem pode estar mais relacionada com a viscosidade produzida pelo polissacarídeo do que com a quantidade de goma produzida durante a infestação (FUKUI; ARIAS; ALVAREZ, 1994).

As linhagens utilizadas para a produção de goma xantana são selecionadas e cultivadas por métodos convencionais. Contudo, modificações genéticas induzidas podem levar a melhorias nas propriedades requeridas para aplicações de recuperação de cepa ou suplementação do meio, ou ainda aumentar a produção, reduzir o tempo de fermentação e simplificar a recuperação e purificação da goma xantana (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

3.3 Goma xantana

As gomas são substâncias poliméricas que mesmo em baixas concentrações são capazes de formar soluções aquosas altamente viscosas. Industrialmente classificam-se em três grupos: naturais, modificadas ou semi-sintética e sintéticas (GLICKSMAN, 1979; FENTANES, 1985). As gomas naturais podem ser obtidas de exsudatos de árvores, sementes, algas ou por fermentação, enquanto as modificadas são derivadas de polissacarídeos, como a celulose. Maiores detalhes sobre tipos e origem destas gomas estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação das gomas industriais quanto ao tipo e origem.

Tipo	Origem	Gomas
Naturais	Exsudato de plantas	Arábica, alcatira, caraia, etc
	Extrato de plantas	Pectina
	Sementes	Guar, alfarroba e tamarindo
	Algas marinhas	Ágar, alginato e carragena
	Tubérculos	Amidos
	Gomas microbianas	Xantana, dextrana, gelana, etc.
Modificadas ou semi-sintéticas	Celulose	Carboximetilcelulose, metilcelulose e hidroxietilcelulose.
	Extrato (animal)	Derivado hidrossolúvel de quitina
	Amido	Dextrina, xantano de amilose e hidroxietilamido.
Sintéticas	Derivadas da petroquímica.	Álcool polivinílico, sal de ácido poliacrílico, policarboxivinil, etc.

Fonte: (GLICKSMAN, 1979; FENTANES, 1985).

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

A goma xantana é um polissacarídeo natural produzido biotecnologicamente por bactérias do gênero *Xanthomonas* e um importante biopolímeros industrial (HUBLIK, 2012). A descoberta desse polímero partiu de um programa de busca sistêmica iniciada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. O biopolímero foi descoberto em 1950 nos laboratórios de Pesquisa Regionais do Norte (NRRL) (MORRIS (1984). Em 1960 ocorreu a primeira produção em escala industrial e em 1969 a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou para aplicação como estabilizante, emulsificante e espessante em alimentos (ROCKS, 1971). Desde 1990 são mais de 2000 patentes incluídas no *Derwent World Patents Index* (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002). Segundo Lima *et al.* (2001) e Pradella (2006), no Brasil, a adição da goma xantana em alimentos é permitida desde 1965, pelo Decreto de Lei nº 55.871, da Legislação Brasileira de Alimentos.

Comercialmente é o polissacarídeo microbiano mais utilizado, com produção mundial anual de 30.000 toneladas, movimentando um mercado de aproximadamente 408 milhões de dólares. As principais indústrias produtoras são Kelco (EUA), Rhône-Poulenc (França), Pfizer (EUA) e Mero-Rousselot-Santia (França) (CANILHA *et al.*, 2006). Acredita-se atualmente que o volume de produção ultrapassa o valor estimado em 2006, sendo o maior produtor o Grupo Fufeng (China) (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

A xantana é um polímero de elevado interesse principalmente para as indústrias de alimentos, farmacêutica e petroquímica devido a suas propriedades físico-químicas, que superam todos os outros polissacarídeos disponíveis no mercado. Dentre estas propriedades, destaca-se a elevada viscosidade em baixas concentrações (0,05-1,0%), devido a sua estrutura ramificada e alta massa molecular, bem como estabilidade em ampla faixa de temperatura (0 a 100°C) e pH (1 a 13) (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

3.3.1 Composição da goma xantana e estrutura

Para caracterizar o biopolímero goma xantana, diferentes parâmetros podem ser levados em consideração, como estrutura química, comportamento reológico, teor de açúcares e ácidos e massa molecular (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002), além, de caracterização térmica.

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

A composição dos polissacarídeos microbianos é limitada a um número pequeno de monossacarídeos e outros componentes, principalmente grupamentos de acetila e piruvato, que estão relacionados à viscosidade das soluções aquosas destes polímeros. Porém, a composição pode gerar diversidade nas propriedades físicas. Alguns destes polímeros produzem soluções altamente viscosas, e outros, que com adição de sais, podem formar géis semelhantes ao ágar (SOUW; DEMAIN, 1979; CRESCENZI, 1995).

De acordo com García-Ochoa *et al.* (2000), a goma xantana é um heteropolissacarídeo, cuja unidade básica repetidora é um pentassacarídeo, constituído por duas unidades de glicose, duas unidades de manose, uma de ácido glucurônico e possíveis grupos piruvato e acetil, conforme mostrado na Figura 2.

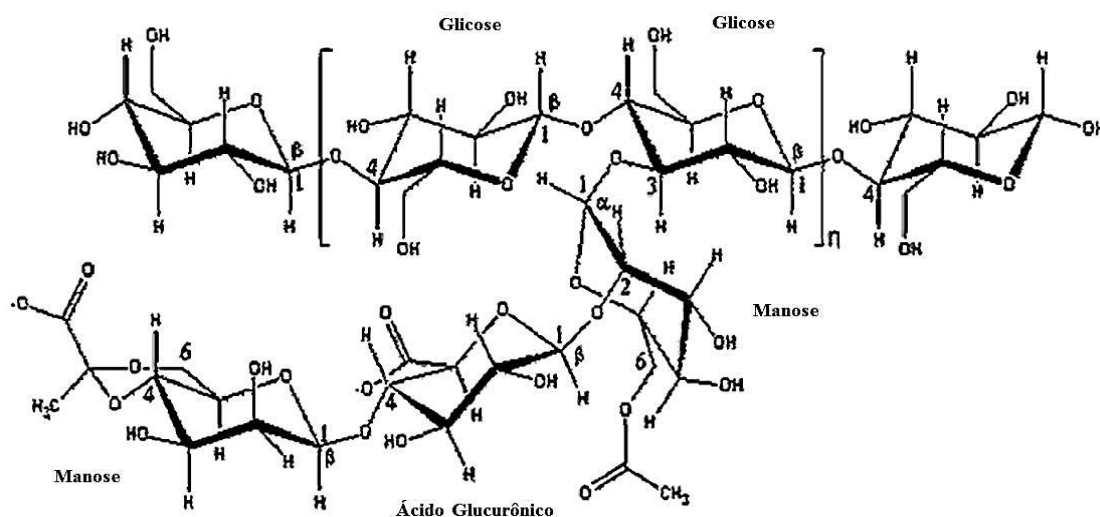


Figura 2. Estrutura do exopolissacarídeo goma xantana (MOOSAVI-NASAB; SHEKARIPOUR; ALIPOOR, 2009).

A cadeia principal consiste em unidades de β -D-glucose com ligações nas posições 1 e 4. O trissacarídeo que constitui a cadeia lateral contém uma unidade de ácido D-glucurônico entre duas unidades de D-manose ligadas na posição O-3 de resíduos de glicose da cadeia principal. Aproximadamente metade dos resíduos de D-manose terminais contém uma unidade de ácido pirúvico ligado, com distribuição indeterminada. A unidade D-manose ligada à cadeia principal contém um grupo acetil na posição O-6. A presença dos grupos piruvato e acetil torna o polissacarídeo do tipo aniônico (SUTHERLAND *et al.*, 1992; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; PORTILHO, 2002).

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

A cadeia lateral e o caráter iônico, conferido pela presença de grupamentos acetil e piruvato na molécula de xantana, aumentam a sua hidratação e conferem tonicidade à xantana e ainda estão relacionados à conformação molecular. A massa molecular deste polímero varia de 2 a 30×10^6 Da, mas pode variar dependendo do processo fermentativo e da linhagem de *Xanthomonas* utilizada (MISAKI, 1993).

A estrutura secundária da goma xantana depende das condições sob as quais a molécula é caracterizada, podendo estar na conformação ordenada ou desordenada. A conformação ordenada pode ser nativa ou renaturada; não há consenso sobre a existência de relação entre a atividade da conformação e o tipo de estrutura verificada. A forma nativa está presente em temperaturas abaixo do ponto de transição conformacional da molécula, que depende da força iônica do meio em que a xantana está dissolvida. A transição conformacional “ordem-desordem” é direcionada pela ocorrência de temperaturas acima do ponto de transição e/ou redução da força iônica. Ambas as disposições das moléculas, nativa ou renaturada dependem dos mesmos fatores (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002).

O conhecimento da composição química da xantana é fundamental para sua funcionalidade e aplicação. As gomas de interesse comercial devem ser capazes de formar estruturas secundárias, terciárias e, às vezes quaternárias em meio aquoso. Portanto, a estrutura primária deve ter configuração que favoreça estes arranjos. Além disso, é possível, através de manipulações genéticas, identificar o gene, alterar a grau de acetilação e aumentar o grau de piruvatação em 45% para obter melhores rendimentos de polímero (LIMA *et al.*, 2001; MAUGERI, 2001). A xantana também pode ter sua composição química modificada através de reações de desacetilação, via tratamento térmico (SILVEIRA *et al.*, 2008) ou hidrólise alcalina (PINTO, 2005). A modificação visa melhorar as propriedades das xantana e potencializar seu comportamento reológico.

3.3.2 Biossíntese

A compreensão bioquímica do processo fermentativo é importante para auxiliar no seu controle e otimização (LOOIJESTEIJN *et al.*, 2001). A biossíntese deste polímero é complexa e se inicia com a produção de precursores UDP-glicose, UDP-ácido glucurônico e GDP-manose a partir da conversão de açúcares simples para precursores derivados de açúcares nucleotídeos. As subunidades de pentassacarídeos

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

são fixadas no interior da membrana portadora de fosfato poliprenol e a adição de grupos acetil e piruvato ocorrem durante a polimerização de unidades repetidoras e secreção do polímero (HARDING; CLEARY; IELPI, 1995). A etapa final da biossíntese ocorre quando a goma é excretada para o meio extracelular (ROSEIRO; GIRIO; KARÁ, 1993). Cada etapa requer uma série de enzimas e substratos específicos. A ausência de um ou do outro inibe a síntese do polissacarídeo. No caso das *Xanthomonas campestris* enzimas da membrana formam a molécula acceptora do polímero (SILVA *et al.*, 2001) (Figura 3).

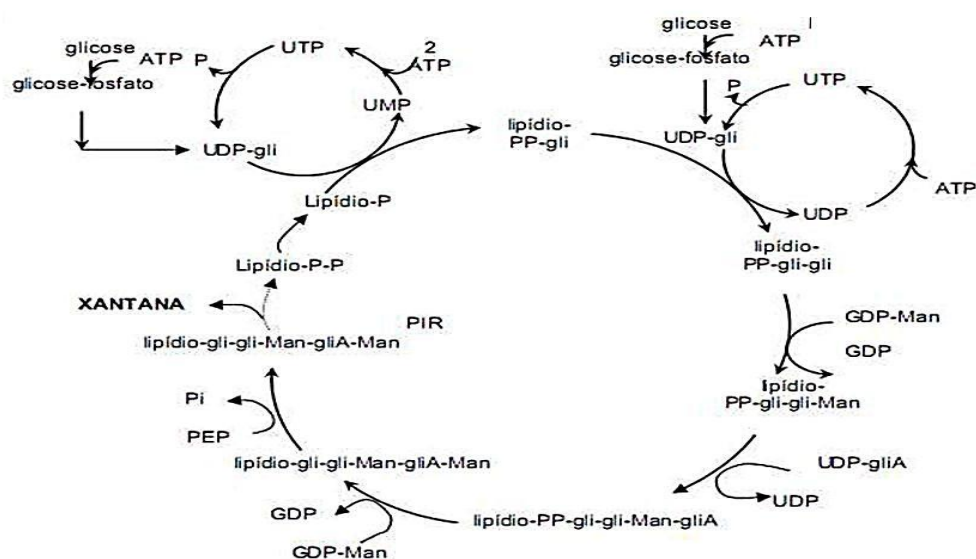


Figura 3. Rotas bioquímicas para síntese de goma xantana. Adaptado de Rosalam; England (2006).

Segundo Vashitz; Sheintuch (1991) a síntese do biopolímero não é um processo simplesmente associado ao crescimento da célula, mas é interdependente do balanço energético e da formação de metabólitos celulares. Assim, a conversão da glicose via ciclo tricarboxílico compete com a conversão da glicose para síntese da goma xantana (SHU; YANG, 1990).

As etapas de polimerização e o estágio final da secreção do polímero a partir da membrana plasmática, assim como a excreção extracelular, ainda não foram completamente elucidados. De acordo com Sutherland (2001) primeiro ocorre a polimerização no interior da célula e depois, a secreção no exterior. Já Köplin *et al.* (1992) acreditam que as unidades pentassacarídicas são secretadas no exterior da célula e então polimerizadas.

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

Uma qualidade interessante na produção industrial de goma xantana é a versatilidade nutricional da *Xanthomonas campestris*, a qual pode utilizar diferentes substratos, porém com o inconveniente de variações, principalmente da massa molar da goma sintetizada, interferindo nas qualidades reológicas e na qualidade do biopolímero (SUTHERLAND, 1993).

3.3.3 Processo fermentativo

A obtenção de goma xantana ocorre por cultivo aeróbico, a aproximadamente 28°C e depende da composição do meio, linhagens e das condições de fermentação, tais como: temperatura, pH, velocidade de agitação, concentração inicial de nitrogênio e técnicas de alimentação, resultando em variações nos rendimentos e na qualidade do polímero produzido (CASAS *et al.*, 2000; GARCÍA_OCHOA *et al.*, 2000; ROSALAM; ENGLAND, 2006).

O processo fermentativo pode ser realizado utilizando substratos sólidos ou em meio líquido. A fermentação líquida em cultivo submerso é a mais comumente utilizada por ser de fácil controle, fácil esterilização do meio, aeração estéril menos dispendiosa e por facilitar as trocas metabólicas, devido maior contato com superfície bacteriana (REGULY, 2000).

O meio de cultura consiste geralmente de 2 a 4% de glicose ou sacarose como fonte de carbono convencional, 0,05 a 0,1% de fonte de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, nitrato de amônio ou ureia), além de fosforo e traços de outros minerais. A síntese do polímero ocorre, principalmente ao cessar o crescimento microbiano, podendo atingir, em escala industrial, produção final de 20 a 30 g.L⁻¹, com rendimento de 50 a 70% e produtividade de 0,5 g.L⁻¹.h⁻¹ (MAUGERI, 2001; LIMA *et al.*, 2001).

A relação carbono: nitrogênio (C:N) no meio fermentativo também influencia a produção de goma xantana. Uma elevada concentração de nitrogênio é necessária para um rápido crescimento celular. Entretanto, elevadas concentrações de nitrogênio levam a produção de goma xantana com propriedades reológicas inadequadas e meios contendo elevado teor de fonte de carbono e baixo teor de nitrogênio favorece o acúmulo de goma xantana (NITSCHKE *et al.*, 2001). Além disso, García-Ochoa *et al.* (2000) verificaram, que meios de cultivos ricos em nitrogênio, fósforo e magnésio influenciam no crescimento, enquanto meios ricos em fósforo e enxofre influenciam na produção de goma xantana. Casas *et al.* (2000) observaram, porém, que a concentração

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

de nitrogênio exerce influência no aumento da biomassa, primeiramente de modo proporcional ao aumento da concentração de nitrogênio, chegando a um máximo quando utilizados $1,14 \text{ g.L}^{-1}$ de NH_4NO_3 . A partir dessa concentração ocorre um decréscimo na produção de biomassa, sem efeito na produção de goma xantana.

A obtenção de goma xantana pode ser efetuada por processo descontínuo ou processo contínuo. No processo descontínuo (batelada) o inóculo com as bactérias é adicionado ao meio esterilizado, contendo os substratos para o desenvolvimento dos microrganismos, e por fim, são fornecidas as condições para que as reações ocorram. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, exceto oxigênio, no caso de processos aeróbicos, antiespumante, e ácido ou base para controle de pH (SATO, 2001). Ao passo que, no sistema contínuo, inicia-se com um processo descontínuo, no qual ocorre a etapa de inoculação, e a partir de um determinado período a operação segue adicionando-se continuamente o meio esterilizado contendo o substrato. Nesse processo os produtos de reação são removidos sem a interrupção do processo. Em escala laboratorial a fermentação para obtenção de goma xantana pode ser realizada em agitadores orbitais (Shakers) ou em biorreatores por processo descontínuo. Nos agitadores orbitais apenas pode-se controlar a temperatura, o tempo e a velocidade de agitação, enquanto que em biorreator o controle é mais rigoroso sendo possível monitorar outros parâmetros como pH e concentração de oxigênio dissolvido (TAIT; SUTHERLAND; CLARKE-STURMAN, 1986).

A fermentação em batelada para a produção de xantana exibe uma cinética típica para metabólito secundário (PACE; RIGHELATO, 1981. Durante a fermentação da glicose pela *Xanthomonas campestris*, duas fases distintas podem ocorrer: a tropofase, na qual ocorre rápido crescimento celular com pouca formação de biopolímero, e a idiofase, quando pouco crescimento celular é observado e mais de 50% do polímero é sintetizado (SHU; YANG, 1990; UMA SHANKAR *et al.*, 1996).

Faria *et al.* (2009) compararam diferentes condições de produção (batelada simples a 28°C , em meio contendo 27 g.L^{-1} de sacarose) em agitador orbital (150 rpm, 60h) e em biorreator (800 rpm e 24h). Os autores relatam melhores resultados de produção e produtividade de goma xantana em biorreator (19 g.L^{-1} e $0,63 \text{ g.g}^{-1}$) do que em agitador orbital (9 g.L^{-1} e $0,34 \text{ g.g}^{-1}$).

Psomas; Liakopoulou-Kyriakides; Kyriakidis (2007) avaliaram as condições operacionais em biorreator (batelada simples) com tempo de fermentação variando de 24 a 72 h, velocidade de agitação de 100 a 600 rpm, temperatura de 25 a 35°C e aeração

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

de 1,0 vvm. Os autores obtiveram melhor produção de goma xantana a partir de glicose por *Xanthomonas campestris* ATCC 33913 a 600 rpm e 30°C por 72 horas. Casas, Santos e García-Ochoa (2000) avaliaram a produção de xantana a partir de glicose por *Xanthomonas campestris* NRRL-B (1459), em biorreator (batelada simples) a 1,0 vvm de aeração e diferentes velocidades de agitação (100, 300, 500 e 800 rpm). Segundo esses autores, o crescimento de biomassa e a produção de xantana foram máximas com velocidade de agitação fixada em 500 rpm.

Processos fermentativos com elevados níveis de agitação favorecem o aumento da produção de goma xantana, bem como o crescimento celular. Em baixas velocidades ocorrem limitações na transferência de oxigênio resultando em baixas produções e polímeros com baixa massa molar. Os efeitos benéficos do aumento da agitação está relacionado ao aumento da transferência de nutrientes e oxigênio do meio para o microrganismo, o que favorece a formação de goma xantana (PAPAGIANNI *et al.*, 2001). Peters *et al.* (1989) utilizaram baixas velocidades de agitação para fermentação em batelada e obtiveram uma produção de goma xantana significativamente menor do que as obtidas em altas velocidades. Papagianni *et al.* (2001) observaram que o aumento da agitação resultou em maiores produções de xantana e biomassa, com acréscimo de 100% ao aumentar a agitação de 100 para 600 rpm.

Casas, Santos e García-Ochoa (2000) em seus trabalhos, usaram altas velocidades de agitação (800 rpm) e observaram pouco crescimento celular e baixa produção de xantana, provavelmente causados por danos celulares devido ao estresse hidrodinâmico. Os testes em baixas velocidades (100 rpm) também apresentaram baixa produção e crescimento celular, associadas à limitação na transferência de oxigênio. Os autores ainda relatam que, além de baixas produções, agitações muito elevadas causam decréscimo na massa molecular média e nos parâmetros reológicos.

Recomenda-se uma faixa de oxigenação em torno de 1,5 a 3,5 vvm e uma boa aeração para que se obtenha uma boa produção de goma xantana com elevada viscosidade (WOICIECHOWSKI, 2001).

Tait, Sutherland e Clarke-Sturman (1986) concluíram que os teores de acetato e piruvato da goma xantana foram influenciados pelo esgotamento de amônia. Nessas condições o polímero formado continha menos piruvil (2,2%) e mais acetil (4,4%). Peters e colaboradores (1989) demonstraram que existe forte relação entre a demanda de oxigênio e o teor de piruvato.

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

As temperaturas empregadas para a produção de goma xantana variam de 25 a 34°C. A temperatura ótima para a produção de xantana depende do meio de produção utilizado, sendo esta de 28°C para o meio otimizado por García-Ochoa *et al.* (2000). Segundo Casas, Santos e García-Ochoa (2000) com uso de temperaturas entre 25 e 28°C obtém-se maior teor de acetil do que em temperaturas compreendidas entre 31 e 34°C. Além disso, com aumento da temperatura de cultivo ocorre também o decréscimo da massa molecular do polímero.

Alguns estudos apontam o pH neutro como ótimo para o crescimento da *Xanthomonas campestris*, sendo que este decresce para próximo de 5,0 durante a produção da xantana, devido aos grupos ácidos presentes no biopolímero. Um estudo dos efeitos do pH mostrou que seu controle melhora o crescimento celular, mas não tem efeito sobre a produção da goma xantana (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000). Papagianni *et al.* (2001), verificaram que o pH do meio de cultura aumentou durante a fermentação em biorreator, quando foi variada a velocidade de agitação, alcançando um máximo de 9,5, quando utilizado 600 rpm.

Esgalhado *et al.* (1995) avaliaram o pH e a temperatura para o crescimento e produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris*. O pH entre 6,0-7,0 e a temperatura entre 25-27°C foram ótimas para o crescimento. Enquanto que para a produção de goma xantana e viscosidade do polímero, o pH e a temperatura ótima situou-se entre 7,8-8,0 e 30°C, respectivamente.

Planejamentos estatísticos experimentais têm sido usados 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). 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; OZER; ELIBOL, 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. 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).

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

3.3.3.1 Inóculo

Consiste na etapa de preparação de uma população de microrganismos a partir de uma cultura estoque a fim de se obter células fisiologicamente adequadas para a etapa de produção (HUNT; STIEBER, 1986).

Um inóculo em condições adequadas, ou seja, na qualidade e concentração corretas conduz a ótimo crescimento microbiano e a bons resultados na fermentação. Hunt e Stieber (1986) constataram que o aumento da concentração celular de *Pseudomonas denitrificans* levou a diminuição na produtividade da vitamina B₁₂. Nampoothiri *et al.* (2003) mostraram que a produção de goma gelana é influenciada pela idade celular. Inóculos preparados entre 8 a 24 horas foram transferidos para meios de fermentação. O máximo rendimento de gelana foi obtido com uso do inóculo conduzido em 20 horas.

Na obtenção de goma xantana, a etapa do inóculo visa aumentar a concentração de células, limitando a produção de goma xantana, pois o polímero liberado no meio envolve as células dificultando a transferência de nutrientes e oxigênio para os microrganismos (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

3.3.3.2 Utilização de substratos alternativos como meio fermentativo

Na produção de goma xantana em larga escala, a glicose é considerada como substrato mais adequado para obter elevadas produções e melhor qualidade reológica (PAPAGIANNI *et al.*, 2001; ROSALAM; ENGLAND, 2006). No entanto, seu elevado preço de mercado e a crescente demanda sugerem que a glicose não seja economicamente viável como matéria prima. Neste sentido, outras fontes de carbono vêm sendo testadas, como sacarose (GARCIA-OCHOA, SANTOS; ALCON, 2004), que apresenta o inconveniente de concorrer com o setor alimentício e resíduos agroindustriais de baixo custo como hidrolisado de arroz, melaço de cana de açúcar (EL-SALAM; FADEL; MURAD, 1994), melaço de açúcar de beterraba (KALOGIANNIS *et al.*, 2003), suco de coco, amido não modificado (ROSALAM; ENGLAND, 2006), extrato de tâmaras (MOOSAVI-NASAB; SHEKARIPOUR; ALIPOOR, 2009), ácido cítrico (JANA; GHOSH, 1995), soro de queijo (FORNARI, 2006), resíduo de suco de maçã (DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007), soro de leite

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

(NITSCHKE *et al.*, 2001; NERY *et al.*, 2008), resíduo de crustáceos e bivalves PI011100001119 (COSTA *et al.*, 2010), soro de mandioca (BRANDÃO *et al.*, 2010), glicerina (PI0705950-7 BRANDÃO; NERY; DRUZIAN, 2009; REIS *et al.*, 2010) casca de cacau (DINIZ; DRUZIAN; AUDIBERT, 2012).

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. Sua obtenção mais comum ocorre a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois por meio de catálise alcalina ou ácida (SALAMATINIA; MOOTABADI; ABADULLAH, 2010) (Figura 4). Durante este processo, os ésteres metílicos são separados conforme o produto desejado, enquanto a glicerina é separada como sub-produto. A glicerina bruta, normalmente é gerada na razão de um mol para cada três moles de ésteres metílicos produzidos (MELERO *et al.*, 2012).

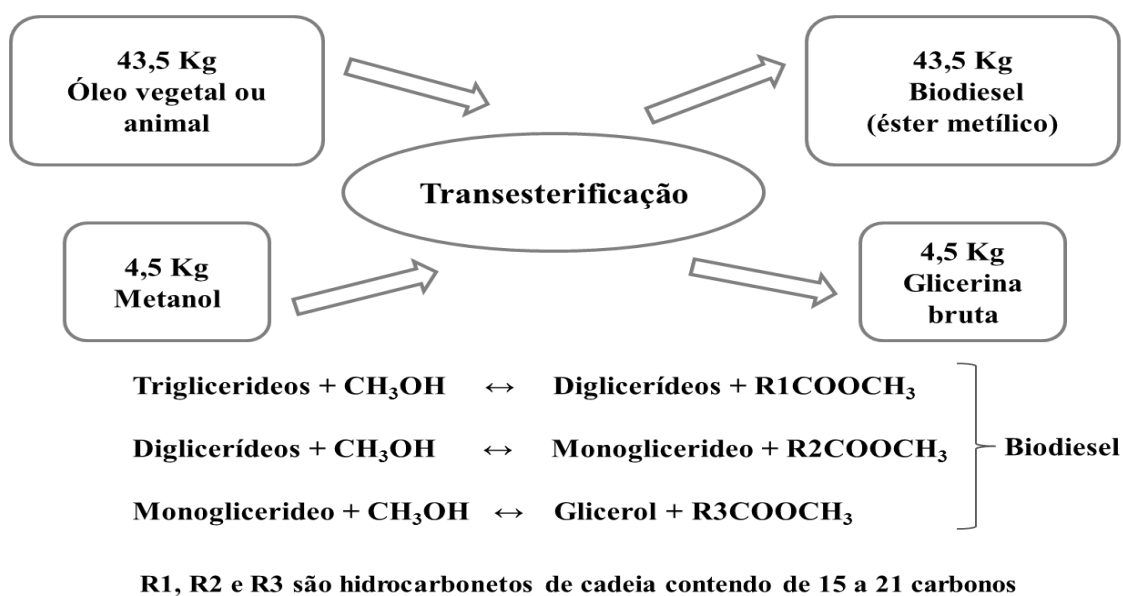


Figura 4. Formação de glicerina bruta durante o processo de transesterificação. Adaptado de Ayoub e Abdullah (2012).

A glicerina é o maior co-produto do processo de obtenção do biodiesel. Em geral, aproximadamente 4,53 Kg de glicerina bruta são gerados para cada 45,3 Kg de biodiesel produzido (CARDONA; POSADA; MONTOYA, 2007).

Atualmente, os Estados Unidos é o maior produtor de biodiesel do mundo, seguido da Alemanha e Brasil (CELULOSE ONLINE, 2013). O consumo anual de biodiesel nos Estados Unidos era de 15 bilhões de litros em 2006. Contudo a produção

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

vem crescendo a uma taxa de 30 – 50% por ano, atingindo um valor de 30 bilhões de litros no final de 2012 (USEPA, 2007). De acordo com o relatório da National Biodiesel Board, havia 105 usinas de biodiesel em operação nos estados Unidos em 2007 e outras 77 em fase de planejamento, a expectativa de produção de biodiesel nos estados Unidos será superior a 9,5 bilhões de litros. De acordo com Ayoub e Abdullah (2012) para este nível de produção de biodiesel, gera-se cerca de 1,2 milhões de toneladas de glicerina bruta. Neste contexto, estima-se que, entre 2008 e 2013, a indústria de biodiesel do Brasil terá produzido glicerina na ordem de 80.000 – 150.000 toneladas por ano (DA SILVA *et al.*, 2009; ALBARELLI; SANTOS; HOLANDA, 2011). Porém, mundialmente o mercado do biodiesel alcançará em torno de 37 bilhões de galões até 2016 e 4 bilhões de galões de glicerina bruta serão produzidas (ANAND; SAXENA, 2011). Como a demanda e a produção de biodiesel cresce exponencialmente, a utilização deste resíduo torna-se indispensável.

A glicerina oriunda do biodiesel tem elevado teor de impurezas e o custo para sua purificação inviabiliza a utilização em indústrias de cosmético, alimentos e farmacêutica (THOMPSON; He, 2006; ÇELIK *et al.*, 2008). Por isso, torna-se importante desenvolver novas aplicações para a glicerina residual do biodiesel (bruta ou loira) e/ou purificada visando atenuar os possíveis impactos causados pela crescente produção de biodiesel (LIMA, 2001). De acordo com Johnson e Taconi (2007); Da Silva; Mack e Contieiro (2009) uma alternativa promissora para este subproduto é a conversão microbiana por processos biotecnológicos em produtos de valor agregado como polihidroxibutirato (ZHU *et al.*, 2010); ácido clavulânico (TEODORO *et al.*, 2010); eritropoietina humana recombinante (ÇELIK *et al.*, 2008), ácido cítrico (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; RYWIŃSKA *et al.*, 2011) e produção de goma xantana: Patente brasileira PI0705950-7 (BRANDÃO; NERY; DRUZIAN, 2008; REIS *et al.*, 2010).

A utilização da glicerina bruta 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 à aplicação dessa goma xantana juntamente com a glicerina bruta do biodiesel na área de fluido de perfuração de poços de petróleo em cotitularidade entre a

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

Universidade Federal da Bahia (UFBA) e empresa especializada da área de fluido de perfuração (Empresa Carboflex).

3.3.3.3 Cinética da produção de xantana

As relações cinéticas entre o crescimento e a formação de produtos são importantes para determinar o modo de operação mais econômico. A velocidade e eficiência de formação de biopolímeros são influenciadas pela natureza dos fatores limitantes de crescimento, assim como oxigênio dissolvido, pH e temperatura (PACE, 1991).

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração iniciais, intermediários e finais de um ou mais componentes do sistema de cultivo (substrato, biomassa e produto), em função do tempo de fermentação, permitindo assim os traçados das curvas de ajuste. Escolhe-se para o estudo cinético o produto de interesse econômico e o substrato limitante, isto é, o valor da concentração inicial de substrato (S_i) que definirá a concentração máxima da população microbiana (X_m). No entanto, os métodos comumente utilizados para a medida da concentração celular apresentam uma informação muito simples a respeito do fenômeno biológico (HISS, 2001).

A produção de goma xantana pode ser descrita por modelos não estruturados e estruturados. O não estruturado são os modelos cinéticos mais simples para modelar sistemas microbianos. Estes modelos assumem que todas as células estão no mesmo estágio fisiológico, comportam-se da mesma maneira e os componentes celulares são considerados como reagentes ou componentes do sistema (biomassa). Por outro lado, os modelos cinéticos estruturados consideram que a biomassa é formada por diferentes componentes (GARCÍA-OCHOA; SANTOS; ALCON, 1998). Usualmente, para a modelagem da produção de goma, têm sido utilizados os modelos não estruturados (MORAINE; ROGOVIN, 1971; DE VUYST *et al.*, 1987; PONS; DUSSAP; GROS, 1990), que não consideram em seus equacionamentos todos os nutrientes essenciais do sistema e omitem alguns, como nitrogênio e oxigênio dissolvido. Apesar da simplicidade dos modelos não estruturados em relação ao estruturado, é fundamental que descrevam pelo menos a evolução da biomassa, da fonte de carbono, do produto e frequentemente de outro substrato (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 1998).

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

Os modelos não estruturados podem ser classificados em modelos que consideram o crescimento e a formação de produtos dependentes dos nutrientes do meio e modelos que expressam o crescimento e a formação de produtos como uma função somente da biomassa e sua evolução com o tempo (MORAINE; ROGOVIN, 1971; CADMUS *et al.*, 1978; DE VUYST, 1978).

De acordo com Nitschke *et al.* (2001) a goma xantana é produzida como metabólito secundário e através da dissociação de duas fases distintas: a de crescimento, onde a maior concentração de nitrogênio do meio é requerida para o crescimento celular; e a fase de produção, na qual a concentração de carbono do meio é requerida para acúmulo de produto.

3.3.3.4 Recuperação e Purificação da goma xantana.

As etapas de recuperação da goma xantana envolvem a remoção de células microbianas, precipitação, secagem e moagem do biopolímero. O método específico de purificação a ser utilizado é determinado pelo uso final do polissacarídeo (GALINDO, 1994).

Após a fermentação o meio fermentado pode ser esterilizado e centrifugado para separação dos microrganismos e para melhorar as características da goma em solução. Uma vez que as células são eliminadas, a goma xantana é precipitada com álcool, ou sais quaternários de amônio, ou separada por ultrafiltração (LIMA *et al.*, 2001).

A recuperação da goma xantana pode ser feita concentrando o meio através da evaporação do mosto. Esta técnica é possível e viável economicamente, porém apresenta a desvantagem de resultar em um produto de baixa qualidade, com coloração intensa devido à degradação dos açúcares residuais, e contendo células e compostos não metabolizados (SANFORD, 1979a; PACE; RIGHELATO, 1981).

García-Ochoa *et al.* (2000) propuseram um método de recuperação de goma xantana que envolve etapas de: desativação ou lise celular, através de processos químicos, mecânicos ou térmicos; remoção de células por filtração (se necessário, fazer diluições antes de filtrar); recuperação do polímero por precipitação com solventes orgânicos (etanol, álcool isopropílico, mistura de sais e álcool); separação do precipitado por evaporação do solvente e secagem. Segundo Moreira, Pino e Vendruscolo (2003) e Boza *et al.* (2004) as células também podem ser eliminadas por centrifugação.

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

A recuperação por precipitação baseia-se no caráter polieletrólítico do polissacarídeo por adição de cátions (como eletrólito) mono, e polivalentes, bem como pela utilização de diversos tipos de solventes (acetona, metanol, etanol, isopropanol, 1-butanol ou 1,1,1-tricloroetano) como agentes precipitantes (SMITH ; PACE, 1982; BOZA *et al.*, 2004). Além de precipitação, a técnica permite a eliminação de componentes solúveis no solvente (PACE, 1991). A precipitação total só é possível quando são adicionados três partes do solvente para uma do caldo fermentado. A adição de sais na concentração adequada também causa precipitação (PALANIRAJ, 2011).

Os polímeros, depois de isolados são purificados e secos em estufa em baixas temperaturas (GIAVASIS; HARVEY; MCNEIL, 2000; MOREIRA; PINO; VENDRUSCOLO, 2003; BOZA *et al.*, 2004) ou liofilizado (GIAVASIS; HARVEY; MCNEIL, 2000; DILTZ ; ZELLER, 2001). A purificação dos biopolímeros pode ser feita por sucessivas diálises contra água deionizada (DILTZ ; ZELLER, 2001; CHI ; ZHAO, 2003), por reprecipitação fracionada com solventes (CHI; ZHAO, 2003) ou com detergentes catiônicos, pelo uso de métodos cromatográficos ou ainda com agentes químicos ou enzimas que interagem de forma específica com certos grupos (DRUZIAN, 2000).

Em escala industrial, a etapa de recuperação pode ser iniciada com a pasteurização do caldo fermentado visando desativar as enzimas. Em seguida, utiliza-se grande quantidade de álcool para precipitar a goma xantana. O precipitado é então pulverizado em spray-drier ou resuspenso em água e, em seguida, reprecipitado. Para melhor separação das células, a centrifugação é facilitada por diluição do caldo. O solvente residual pode ser reciclado após reconcentração e purificação em coluna de destilação (ROSALAM; ENGLAND, 2006). Em laboratórios, os solventes mais utilizados são etanol e a acetona (GODET, 1973).

3.3.4 Propriedades das gomas xantanas

3.3.4.1 Reologia

A reologia é uma ciência que está relacionada à descrição das propriedades mecânicas dos vários materiais, sobre inúmeras condições de deformação, quando eles exibem a capacidade de escoar e/ou acumular deformações reversíveis (NAVARRO, 1997). As propriedades reológicas de interesse em sólidos é a elasticidade e nos líquidos

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

é a viscosidade, que pode ser interpretada como a resistência que um fluido oferece para escoar ou ainda como a medida da fricção interna de um fluido (PASQUEL, 1999).

Os fluidos podem ser classificados como Newtonianos ou não-Newtonianos conforme seu comportamento. De acordo com Oliveira (2009) a viscosidade de fluido newtoniano, como água ou óleo, depende somente da temperatura (e para alguns, da pressão). Neste caso, a deformação cresce continua e linearmente, qualquer que seja a tensão aplicada e a resistência ao escoamento é proporcional à taxa de cisalhamento (CHEREMISINOFF, 1992). Nos fluidos não-newtonianos, a tensão de cisalhamento é uma função não linear da taxa de deformação e depende ainda da temperatura, pressão, massa molecular, da morfologia das moléculas e do tempo (LOPES, 1989). Dentro dos fluidos não-newtonianos têm-se os pseudoplásticos, no qual a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento (OLIVEIRA, 2009). A classificação mais geral dos fluidos, que leva em consideração o comportamento da relação taxa de deformação/tensão de cisalhamento, subdivide os fluidos conforme mostra a Figura 5.

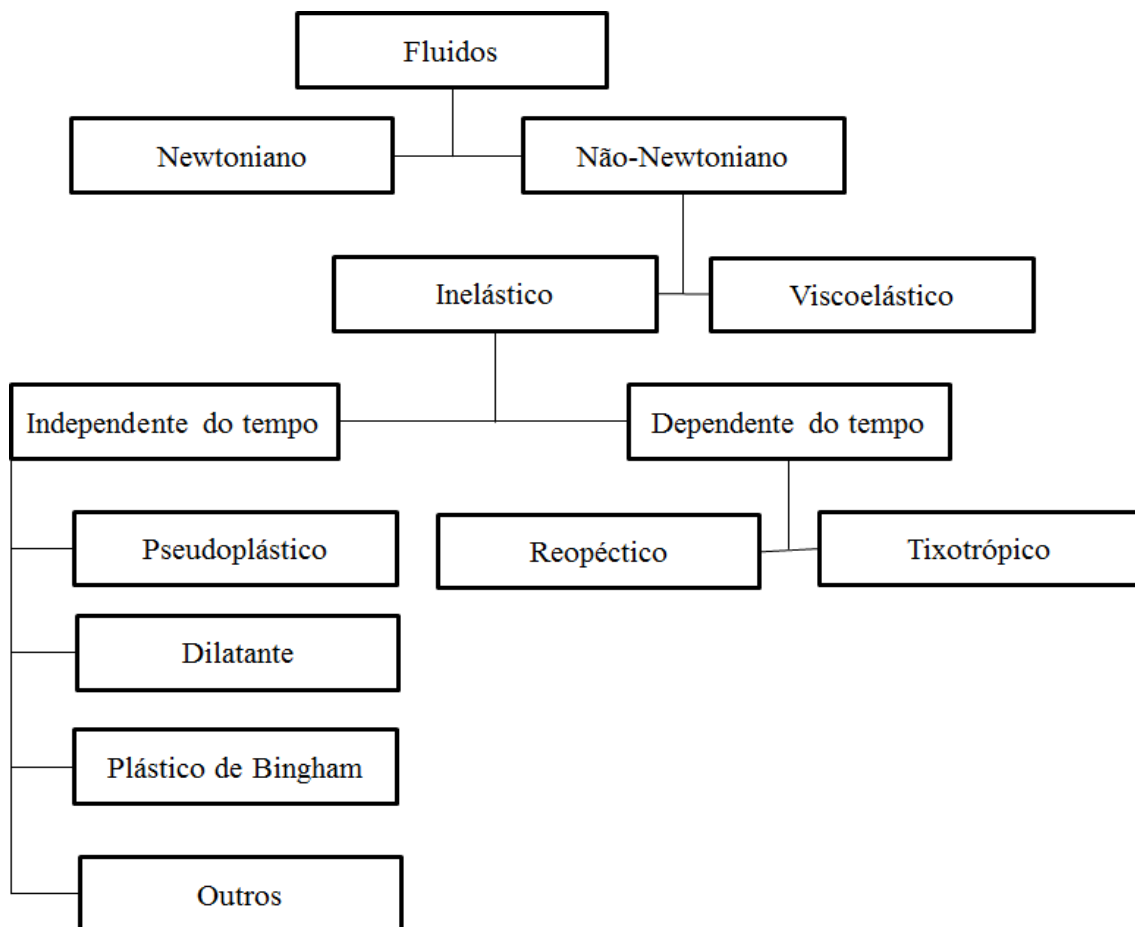


Figura 5. Classificação do comportamento reológico de fluidos. Adaptado de Rao; Steffe (1992).

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

A viscosidade de uma solução polimérica é uma função do tamanho, forma e conformação que adotam suas moléculas no solvente. Assim sendo, soluções de biopolímeros são dispersões ou agregados de moléculas hidratadas, e seu comportamento reológico é determinado pelo tamanho, forma, facilidade de deformação ou flexibilidade, e presença de magnitude das cargas elétricas nessas moléculas hidratadas ou agregadas (BEMILLER; WHISTLER, 1996). As soluções de polissacarídeos podem exibir comportamento reológico do tipo pseudoplástico ou tixotrópico (PASQUEL, 1999).

O modelo de Ostwald-de-Waele (Equação 1) é o mais usado para descrever o comportamento pseudoplástico.

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (n < 1) \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\mu_{ap} = \tau / \dot{\gamma} = K \dot{\gamma}^{(n-1)} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde: K = índice de consistência (Pa.sⁿ); τ = tensão de cisalhamento (Pa); $\dot{\gamma}$ = Taxa de deformação (s⁻¹); n = índice de comportamento de fluxo (adimensional); μ_{ap} = viscosidade aparente.

O primeiro estudo dos efeitos da taxa de cisalhamento, temperatura e concentração na viscosidade da goma xantana foi feito por Shiyang *et al.* (1992) *apud* Xuewu *et al.* (1996), entretanto, não foram propostos modelos reológicos úteis para prever a taxa de cisalhamento, concentração e temperatura apropriadas para a preparação de soluções de goma xantana com viscosidade que permitem a manipulação industrial. Assim, Xuewu e colaboradores (1996) desenvolveram um modelo que descreve os efeitos da temperatura e concentração na viscosidade da xantana e verificaram que além desses dois parâmetros a viscosidade pode ser afetada por fatores como: pH, sólidos insolúveis e substâncias iônicas.

A goma xantana é extremamente pseudoplástica, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação do fluido devido à desarticulação da rede de polímero e ao alinhamento parcial das macromoléculas na direção do fluxo de cisalhamento (KI-WON; YONG-SEOK; GAP-SHIK, 2006), sendo uma característica muito desejada em diversas situações (XUEWU *et al.*, 1996). Os mesmos autores ainda afirmam que, a viscosidade deste polímero diminui com o aumento da temperatura, sendo, portanto, importante controlá-la durante as análises, bem como citá-las com os dados de viscosidade. Na indústria petrolífera, a pseudoplasticidade de soluções de goma xantana pode fornecer baixa viscosidade à broca de perfuração, onde a taxa de

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

cisalhamento é alta, e alta viscosidade no espaço anular onde o cisalhamento é baixo (BYONG, 1996).

Segundo García-Ochoa *et al.* (2000), a viscosidade das soluções de xantana aumenta com a concentração do biopolímero. Atribui-se este comportamento a interação molecular, que aumenta a dimensão efetiva da macromolécula e o peso molecular. Apesar destas variações, a alteração da viscosidade da xantana é considerada pequena comparada com soluções de outros polímeros, sendo muito estável em termos de variações da temperatura e força iônica e pouco afetada pela mudança de pH entre 1 e 13.

As variáveis aeração e agitação são parâmetros indispensáveis para garantir condições de aerobiose necessária para o desenvolvimento dos microrganismos. A formação de goma xantana está associada ao aumento da viscosidade do meio de fermentação, gerando assim condições de anaerobiose. Logo, a combinação adequada destes parâmetros, deve ser analisada para evitar condições de estresse hidrodinâmico, assim como limitação de oxigênio (CASAS; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000; RICHARD; MARGARITIS, 2002). Borges *et al.* (2008) avaliaram a viscosidade (25 °C e 30s⁻¹) de xantanas produzidas a partir de sacarose por *Xanthomonas campestris* pv *pruni* 101 com 300 rpm – 3,0 vvm e 200 rpm e 2,0 vvm. Os autores observaram que a solução a 3,0% (m/v) de xantana obtidas com maiores valores de aeração e velocidades de agitação (3,0 vvm e 300 rpm) apresentou maior viscosidade (2.070 mPa.s), quando comparado a viscosidade aparente (1.890 mPa.s) da xantana produzida com baixos valores de aeração e velocidade de agitação (2,0 vvm e 200 rpm). Por outro lado, Moreira (2002) ao estudar a influência da aeração e velocidade de agitação de Xantanas produzidas a partir de sacarose por *Xanthomonas campestris* pv *pruni* 06, concluíram o oposto, ou seja, baixas viscosidades estavam associadas a condições de baixas aerações e velocidades de agitação.

As propriedades reológicas das soluções mudam com a natureza do polímero, uma vez que dependem do peso molecular médio, da composição molecular, e dos grupos acetil e piruvato (CASAS *et al.*, 2000; DILTZ; ZELLER, 2001). Sandford *et al.* (1977) concluíram que as xantanas de alto teor de piruvato (4,0 a 4,8%) são mais viscosas do que as de baixo teor (2,5 a 3,0%), especialmente na presença de sais. Segundo Slonecker e Jeanes (1962) *apud* Pinto (2005) a remoção dos grupos acetil de xantana sintetizada por *Xanthomonas campestris* pv *campestris* cepa NRRL B-1459

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

promove um melhoramento das suas propriedades físicas, como por exemplo, o incremento de sua viscosidade na presença de sais.

Normalmente as xantanas comerciais são adicionadas de sais de potássio, sódio e cálcio na forma de cloreto, visando facilitar a solubilização, aumentar e manter a viscosidade da solução (MORRIS, 1996). Isto é resultado da estabilização da estrutura ordenada da xantana pelo aumento da associação intermolecular. Contudo, em soluções com concentração de xantana abaixo de 0,2%, a adição de sais causa uma leve diminuição na viscosidade (SMITH; PACE, 1982; XUEWU *et al.*, 1996).

A xantana passa por uma mudança na conformação de ordem para desordem quando em solução salina, condições de baixa força iônica ou quando aquecida (MORRIS, 1996; PELLETIER *et al.* 2001). A conformação de ordem-desordem pode ser considerada um processo parcial de junção de dupla hélice. Liu e Norisuye (1988) sugeriram que o completo desenrolamento da dupla hélice pode somente ser obtido a altas temperaturas. Na conformação ordenada a cadeia lateral é dobrada em associação com a cadeia principal, enquanto na desordenada a cadeia lateral não está associada e sim distante da cadeia principal.

A adição de sais nas soluções de xantana resulta em efeitos na viscosidade, mas com relatos contraditórios. Em alguns casos, a viscosidade das soluções diluídas de xantana aumenta na presença de cloreto de sódio, em outros a viscosidade tem moderada diminuição (MOREIRA; PINO; VENDRUSCOLO, 2002).

Diaz (2002) estudou a adição de KCl e NaCl em soluções de xantana produzida por *X. campestris pv pruni* 24, verificando que a maior viscosidade aparente apresentada foi obtida com a adição de KCl na concentração de $0,1 \text{ molL}^{-1}$ (0,74%). Pinto *et al.* (2000) observou que, a adição de 1% de KCl em soluções de polímeros produzidos por diferentes cepas de *Beijerinckia*, apresentaram diferentes efeitos na viscosidade.

A influência da adição de íons univalente e trivalentes nas propriedades dinâmicas da solução de goma xantana foi estudada por Luporini; Bretas (2011). Neste estudo os autores avaliaram as mudanças de conformação da macromolécula, de energia de ativação, do tempo de relaxação e de temperatura de gelificação, e concluíram que, de uma forma geral, a presença de íons monovalentes formam ligações cruzadas fracas, enquanto em íons trivalentes, com pH 3,8, possibilitam a formação de ligações cruzadas fortes de natureza iônica.

A solução de xantana é considerada estável em uma ampla faixa de concentrações salinas (até 150 g.L^{-1} de NaCl), temperaturas (até 90°C) e pH (2-11) (ROSALAM e

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

ENGLAND, 2006). Devido a essas propriedades é largamente utilizada em uma ampla gama de indústrias, tais como de alimentos, higiene pessoal, recuperação de petróleo, cosméticos, tintas à base de água, dentre outras.

3.3.4.2 Composição química de goma xantana

Exopolissacarídeos bacterianos são compostos por uma gama de monossacarídeos, dentre estes estão D-glucose, D-galactose, D-manose, podendo ser encontrados também hexoses ou metil pentoses, como L-fucoses e L-ramnose e comumente ácidos urônicos como D-glucurônico e D-galacturônico, além de substituintes acetil e piruvato (SUTHERLAND, 2002). Lesley; Hochster (1959) identificaram a presença dos monômeros D-glucose, D-manose e D-ácido glucurônico na proporção de 1:1:1 nos polímeros produzido a partir de sacarose por *Xanthomonas phaseoli*. Sloneker, Orentas e Jeanes (1963) analisaram a composição da goma xantana obtida da fermentação de sacarose por *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 e verificaram a presença de D-glicose, D-manose, D-ácido glucurônico, ácido acético e ácido glucurônico, na proporção de 2,8:3,0:2,0:1,73:0,627. Shatwel; Sutherland; Ross-Murphy (1990) identificaram no polímero produzido a partir de sacarose por *Xanthomonas campestris* pv *campestris* 646 presença de glicose, manose, ácido glucurônico e ácido pirúvico, na proporção de 9,13:8,18:5,41:1,0. García-Ochoa *et al.* (2000) relatam presença de glicose, manose e ácido glucurônico na proporção de 2,8:2,0:2,0 no polímero obtido da fermentação de glicose por *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459.

A composição química da goma xantana tem sido amplamente estudada por se tratar de uma estrutura passível de mudanças seja por diferentes condições operacionais, seja por influência do microrganismo produtor (CHAPLIN, 1994).

Tipicamente as gomas xantana produzidas por diferentes cepas de *Xanthomonas* contêm glicose, manose e ácido glucurônico (GARCÍA-OCHOA, 2000; LESLEY; HOCHSTER, 1959), porém, Chowshury, Lindberg e Lindquist (1987) ao investigarem o polímero produzido a partir de sacarose por *Xanthomonas* ATCC 53159 encontraram além destes, ramnose. Moreira *et al.* (2001) também detectaram a presença de ramnose ao avaliar a composição da xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. Resultados semelhantes foram observados por Vendruscolo *et al.* (2000); Borges e Borges *et al.* (2008) ao utilizarem essa mesma cepa. Outros carboidratos como

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

arabinose, ribose e galactose foram encontrados em baixas concentrações por Konicek; Lasik; Wurst (1997); Souza; Vendruscolo (1999) e também por Silva *et al.* (2001).

Segundo Born; Langendorff; Boulenguer (2002) existe uma dependência entre a condição de agitação e o grau de piruvatação, que é mais elevado com maior agitação (PAPAGIANNI *et al.*, 2001; PSOMAS; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES; KYRIAKIDIS, 2007), entretanto, Psomas, Liakopoulou-Kyriakides e Kyriakidis (2007) mostraram que, a 30°C e após 48h de fermentação da glicose por *Xanthomonas campestris* ATCC 33913, não houve diferença significativa no teor de piruvato entre xantana produzida com agitação de 100 e 350rpm, resultando em 1,5% e 2%, respectivamente. O efeito foi ainda menor entre xantana produzida a 350 rpm e 600 rpm, que resultou em concentrações de 2% e 2,2% de piruvato, respectivamente. Cadmus *et al.* (1978) também não observaram influência da taxa de agitação sobre o teor de piruvato.

Smith *et al.* (1981), Lechner; Gehke; Nordmeyer (1996) relatam que amostras de goma xantana com alto teor de piruvato aumentam a viscosidade das soluções de goma xantana na presença de KCl pelo aumento na associação macromolecular. Seus resultados indicam que o substituinte piruvato promove associação e formação da macroestrutura pelo aumento na afinidade entre polímero-polímero, comparativamente à afinidade polímero-solvente. Contudo, Candia; Deckwer (1999) partem da teoria de que a grande quantidade de piruvato não assegura forte interação molecular quando os pontos de ligação estão diminuídos. Kennedy, Jones; Barker (1982); Torres *et al.* (1993) afirmam que a quantidade de piruvato não pode ser correlacionada com a variação nas propriedades reológicas. Assim, não há consenso em relação ao teor do piruvato e seu efeito nas propriedades reológicas da goma xantana.

A remoção dos grupos acetil da manose interna da cadeia lateral da molécula de xantana causa mudanças na viscosidade de soluções de xantana em água destilada ou soluções salinas (SMITH; PACE, 1982). A desacetilação também aumenta a força de interação da goma xantana com outras gomas, como guar e locusta (TAKO; NAKAMURA, 1986). Para alguns autores a desacetilação não apresenta efeito nas propriedades da solução (BRADSHAW *et al.* 1983), enquanto para outros autores (CASAS; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000) relacionaram alta viscosidade ao alto teor de acetato.

Outros componentes, além do piruvato e acetil podem influenciar nas propriedades da goma xantana. Moreira *et al.* (2001) relatam que o aumento na

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

concentração de manose mantém ou aumenta a viscosidade das soluções de xantana frente ao aquecimento, enquanto os polímeros com alta concentração de glicose apresentam um efeito oposto.

3.3.4.3 Massa Molecular

As propriedades físicas, reológicas, mecânicas, térmicas e o comportamento de um dado biopolímero durante o processamento dependem também do tamanho médio e da distribuição de comprimentos das cadeias do polímero. Se a estrutura química do biopolímero é a mesma, diferentes valores de massa molecular média (MM) e de distribuição de massa molecular (DMM) resultam em diferentes comprimentos das cadeias, podendo alterar as propriedades do biopolímero (GARCÍA-OCHOA, 2000).

As condições operacionais do processo fermentativo, a composição do meio de cultura e do substrato e as características e mutações genéticas da bactéria *Xanthomonas*, influenciam o MM e a DMM da goma xantana, sendo biosintetizadas moléculas com pesos moleculares médios e distribuições diferentes (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

Diversos estudos têm mostrado a influência da linhagem de *Xanthomonas*, da agitação e da temperatura nas variações da massa molecular. Os resultados de Shatwell; Sutherland; Ross-Murphy (1990), utilizando a técnica de espalhamento de luz, indicam variações entre $0,9 \times 10^6$ a $1,27 \times 10^6$ Da, quando utilizadas as linhagens *campestris* 646 e *phaseoli* 1128, respectivamente, enquanto a MM determinado pela técnica de viscosidade intrínseca oscilou entre $2,4 \times 10^6$ a $6,3 \times 10^6$ Da, para essas cepas, respectivamente.

A influência da velocidade de agitação na massa molecular da goma xantana foi estudada por Peters *et al.* (1989). Os autores observaram um incremento da MM de $6,9 \times 10^6$ Da para $8,6 \times 10^6$ Da, ao aumentar a agitação de 200 para 800 rpm. Papagianni *et al.* (2001), não constataram uma correlação do PM da xantana com a mudança da velocidade de agitação de 100 para 600 rpm (5×10^5 Da). Faria *et al.* (2011) obteve valor máximo de MM ($4,2 \times 10^6$ Da) ao submeter o meio fermentativo a 750 rpm, enquanto o aumento da temperatura de 25 para 34°C reduziu a massa molar do polímero de aproximadamente $4,2 \times 10^6$ Da para $2,5 \times 10^6$ Da (CASAS *et al.*, 2000).

Os teores de ácido pirúvico e acético apresentam relação com MM da xantana (CALLET; MILAS; RINAUDO, 1987). Variações de MM foram observadas ao se

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

comparar goma xantana livre de piruvato ($2,3 \times 10^6$ Da) com a xantana livre de acetil e piruvato ($2,3 \times 10^6$ Da) e a goma xantana nativa ($5,2 \times 10^6$ Da). A desacetilação não afetou o teor de ácido pirúvico nem a MM da xantana. Embora a influência das condições operacionais na relação estrutura molecular e MM da xantana estejam descritas, não existe consenso entre os resultados obtidos, pois geralmente, apenas uma única variável é estudada (CASAS *et al.*, 2000).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é um dos métodos mais utilizados para separar e analisar polímeros acoplado o 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 médio e a distribuição do mesmo, mediante programas estatísticos específicos incorporados aos cromatógrafos (CIOLA, 1998). A técnica GPC permite uma seletiva e dinâmica distribuição das moléculas dos polímeros, podendo ser aplicada de maneira a eluir moléculas com densidade e formas similares, fornecendo um método rápido e útil para avaliar o PM e DPM (CANEVAROLO, 2004).

O mecanismo de separação da cromatografia por exclusão está baseado na propriedade da resina empacotada na coluna (fase estacionária) ser macromoléculas com ligações cruzadas, apresentando afinidade pelos solventes, mas insolubilidade nos mesmos. Portanto, a resina da fase estacionária é um gel não carregado equilibrado no mesmo eluente que separa as moléculas em análise (COLLINS; BRAGA; BANATO, 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 os menores são retidos nesses poros e as maiores são eluídas primeiro, havendo a separação contínua das macromoléculas por tamanho molecular. O mecanismo de separação depende principalmente do tamanho (massa molecular), da estrutura e da conformação química das macromoléculas (DRUZIAN, 2000).

Face as dificuldades na determinação da MM de polímeros hidrossolúveis, principalmente aqueles de elevada massa molecular, a CPG apresenta propriedades como simplicidade da técnica e possibilidade de separar macromoléculas com MM

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

menores de 1 kDa ou acima de 1000 kDa, apenas variando a matriz do gel da fase estacionária (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995). As moléculas de alto MM penetram nos poros, passando rapidamente por entre os espaços intersticiais, apresentando um menor tempo de retenção (T_r); diferentemente das partículas que ao penetrarem os poros percorrem a coluna lentamente, portanto, com um maior T_r (MANO, 1985). Para determinar o PM, uma curva de calibração com padrões de diferentes massas moleculares definidos e estrutura química análoga, deve ser usada para obter a relação massa molecular: volume de eluição. Muitos destes padrões moleculares não estão disponíveis comercialmente (COLLINS; BRAGA, BONATO, 1995).

3.3.4.4 Análise Termogravimétrica

Ao longo do século XIX e início do século XX, na busca pelo conhecimento a respeito da estabilidade térmica das substâncias, seja para evitar decomposição ou para provoca-la, pesquisadores construíram, ponto a ponto, gráficos de perdas de massa em função da temperatura, cujos valores eram obtidos por pesagem em balança analítica e as curvas eram denominadas termogramas (HARMELINI, 1968). Atualmente as curvas são obtidas por termobalanças que permitem registrar diretamente a alteração de massa em função da temperatura ou do tempo (CASTELLÓ, 2009).

Assim, a termogravimetria é a técnica na qual a mudança da massa de uma substância é medida em função da temperatura ou tempo, quando submetida a uma programação controlada de temperatura (CARVALHO FILHO, 2000; ZARONI, 2006).

A termogravimetria derivativa é um artifício matemático que torna mais perceptíveis as mudanças de massa ao longo de uma análise termogravimétrica. A curva resultante é uma curva que mostra a derivada da massa em função do tempo (dm/dt) para cada temperatura em curso durante a análise. Os resultados a partir da DTG aparecem de forma mais visualmente acessível, uma vez que as inflexões da TG são enfatizadas e possibilitam a separação de eventos sobrepostos e maior exatidão das temperaturas correspondentes ao início, fim e máxima decomposição. Habitualmente, as curvas de TG e DTG são apresentadas em um mesmo diagrama cartesiano de forma a facilitar as comparações e as determinações dos pontos de interesse (CARVALHO FIHO, 2000; CASTELLÓ, 2009).

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

As análises termogravimétricas são ditas isotérmicas quando a variação de massa é registrada em função do tempo à temperatura constante. Na TGA quase isotérmica, o aquecimento é interrompido no início do evento de perda de massa permanecendo isotérmico até obtenção de massa constante. Na TGA 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 importantes sobre a estabilidade térmica da amostra e dos compostos intermediários do processo de termodecomposição (PINHO, 1999; 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 alterações de até $\pm 10\%$ na temperatura programada podem provocar erros consideráveis (PINHO, 1999; HEAL, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

A cepa *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, utilizada neste trabalho, é oriunda da Coleção de Culturas do Instituto Biológico (Campinas-SP) e foi isolada do solo brasileiro.

4.2 Metodologias

4.2.1 Composição centesimal do substrato alternativo

A glicerina residual do biodiesel foi doada pela Planta Piloto de Biodiesel da Universidade Estadual de Santa Cruz em Ilhéus-BA. A composição centesimal da Glicerina Residual do Biodiesel (GRB) contemplou a determinação do teor de voláteis, cinzas, proteína bruta, lipídeos totais e carboidratos totais. Estas análises, além de fornecer informações nutricionais do substrato alternativo, são importantes para definir a suplementação do meio fermentativo.

Os voláteis foram determinados por secagem a 105°C em estufa com circulação de ar, de acordo com método da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1997). O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 700°C (AOAC, 1997). Os valores para proteína bruta foi calculado a partir do total de nitrogênio pelo método de Kjeldahl usando o fator geral de conversão (6,25) (AOAC, 1997); O total de lipídios foi obtido pelo método de Bligh-dyer (1959) AOAC (1997) e por fim, o total de carboidratos foi determinado por diferença entre 100 e o total dos outros componentes em porcentagem.

4.2.2 Esterilização dos meios e materiais

Todos os materiais empregados nos ensaios microbiológicos e de produção foram esterilizados por vapor úmido (autoclave) a temperatura de 121°C. Os materiais e meios de cultura foram esterilizados durante 15 minutos, enquanto o biorreator juntamente com o meio de produção foi esterilizado por 30 minutos.

4.2.3 Manutenção dos microrganismos

Os microrganismos foram mantidos em meio YM-ágar (Yeast Malt) contendo: 3,0 % de extrato de levedura, 3,0 % de extrato de malte, 0,5 % de peptona, 1,0 % de glicose, 2,0 % de ágar, água destilada e pH ajustado para 7,0.

A fim de verificar possíveis alterações morfológicas das colônias, foram realizados repiques a cada 15 dias e acondicionados sob refrigeração (4°C). Para minimizar baixas produções pelos sucessivos repiques e diminuir as flutuações de resultados devido a variações nas populações e alterações genéticas, foi realizado o congelamento imediato da linhagem, após repique, em ultra freezer a -80°C. A cultura foi incubada em meio YM padrão a 28°C por 48h, transferida para tubos (1,5 mL), suspensa em um agente crioprotetor estéril (glicerol 20% v/v) e armazenada em ultra freezer a - 80°C (GALINDO; SALCEDO; RAMIREZ, 1994). Cada experimento foi iniciado com a reativação de uma cultura preservada em glicerol. A Figura 6 mostra o aspecto da cepa *X. campestris* 2103.



Figura 6. Aspectos das colônias de *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103.

4.2.4 Preparo do Inóculo

Foram distribuídos 50 mL do meio YM líquido (sem ágar) com pH ajustado para 7,0, em frascos Erlenmeyeres de 250 mL. Os frascos contendo meio foram esterilizados, inoculados com uma alçada (~10 µL) do microrganismo reativado e incubados em agitador orbital (Tecnal, Mod. TE-424) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e 180 rpm por 24 horas.

4.2.5 Curva de crescimento

Capítulo 4 – Material e métodos

A curva de crescimento microbiano foi obtida através da transferência asséptica, em triplicata, de uma alçada do inóculo para 50 mL de meio YM líquido. Este foi incubado em agitador orbital a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 180 rpm por 48h. Amostras do meio fermentado foram coletadas a cada 3 horas e analisadas quanto ao crescimento celular. Esta avaliação foi feita através da leitura de absorvância, em comprimento de onda de 620 nm em espectrofotômetro (Perkin Elmer UV / VIS Lambda 35), contra um branco constituído de YM sem inóculo; e por contagem em YM-ágar através da técnica de profundidade (Pour plate). As curvas de crescimento foram montadas com as médias dos dados de absorvância e contagem total de colônias ($\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$) em função do tempo.

4.2.6 Produção de goma xantana

4.2.6.1 Avaliação do tempo de fermentação

O tempo de fermentação foi definido tomando como parâmetros a máxima produção e a viscosidade aparente das xantanas, obtidas ao longo de 168 horas de fermentação. Os experimentos foram realizados em biorreator de bancada Tecnal (Mod. TecBio, Piracicaba, SP, Brasil) com capacidade para 4,5 L e volume útil de 3,0 L (Figura 7).

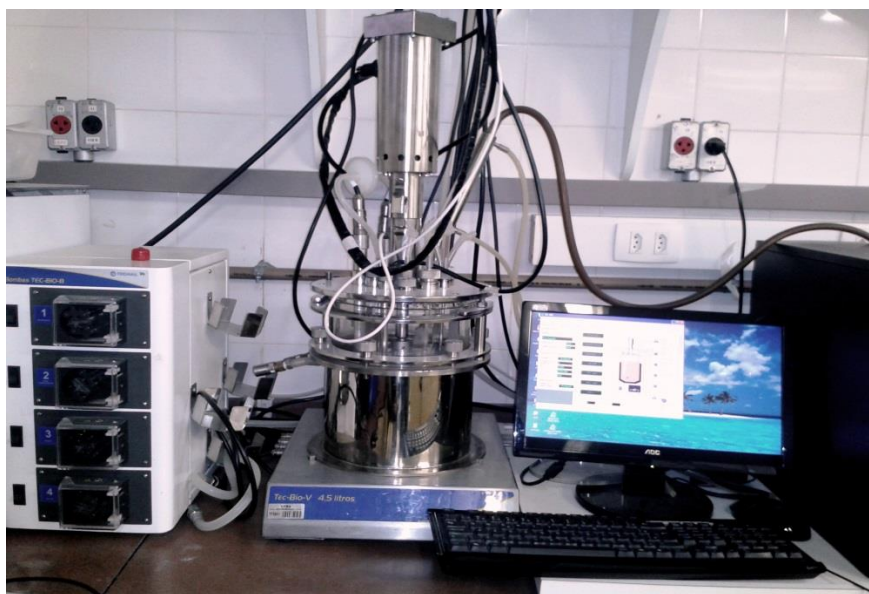


Figura 7. Biorreator Tecnal-TecBio de 4,5 L utilizado para produção de gomas xantana a partir da fermentação de GRB.

Capítulo 4 – Material e métodos

O meio fermentativo composto por: 2,0% de GRB (m/v), 0,1% de K_2HPO_4 (m/v) e 0,01% de uréia (m/v) teve o pH inicial ajustados para 7,0, foi esterilizado e inoculado (20% v/v). A fermentação foi conduzida com velocidade de agitação de 300 rpm e taxa de aeração de 1,0 vvm.

4.2.6.2 Efeito de variáveis de processo

Para selecionar as melhores condições e avaliar os efeitos das variáveis aeração (vvm) e agitação (rpm), os ensaios de produção foram conduzidos em biorreator de bancada (4,5 L) contendo meio fermentativo composto por: 2,0% de GRB (m/v), 0,1% de K_2HPO_4 (m/v) e 0,01% de ureia (m/v). O pH inicial do meio foi ajustado para 7,0, esterilizados e inoculados (20% v/v).

Os níveis de aeração e agitação utilizados variaram de acordo com o planejamento dos experimentos. Todos os ensaios foram conduzidos a 28°C por 120h.

Foi realizado um planejamento estatístico DCCR (Delineamento Composto Central rotacional) fracionado 2^2 , com 2 pontos axiais ($\alpha = \pm 1,41$) para cada variável independente e triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos.

A Tabela 2 mostra os níveis e valores codificados em parênteses, onde -1 refere-se ao menor nível das variáveis, 0 corresponde ao ponto central e +1 ao maior. Os valores codificados foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Valor codificado} = \frac{(\text{valor atual} - (\text{maior nível} + \text{menor nível}) / 2)}{(\text{maior nível} - \text{menor nível}) / 2}. \quad (\text{Eq. 3})$$

Os efeitos individuais e interativos da taxa de aeração (X1) (0,3 – 1,7 vvm) e da velocidade de agitação (X2) (317 – 783 rpm) sobre a concentração de goma xantana (Y1) e biomassa (Y2), assim como nas propriedades do biopolímero, foram estudados utilizando a MSR (Metodologia de Superfície de Resposta) (MEYRS; MONTGOMERY, 2002).

As respostas das variáveis dependentes foram analisadas usando o software *Statistica* versão 7 e nível de confiança de 95%. Os níveis das variáveis independentes foram escolhidos com base em testes preliminares.

Modelos matemáticos foram ajustados aos dados experimentais e por meio da ANOVA (Análise de variância) foram testados quanto a sua capacidade preditiva,

Capítulo 4 – Material e métodos

através do teste de Fischer (F) para regressão. A falta de ajuste dos modelos foi avaliada pelo teste de F da falta de ajuste e pelo coeficiente de determinação (R^2) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Todos os testes de ajuste e previsão dos modelos foram realizados ao nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

Tabela 2. Matriz do planejamento experimental composta com a variável aeração (X1) e agitação (X2) e seus respectivos níveis em valores reais e codificados.

Ensaio	X1 (vvm)		X2 (rpm)	
	Valor real	Valor codificado	Valor real	Valor codificado
1	0,5	-1	300	-1
2	0,5	-1	700	+1
3	1,5	+1	300	-1
4	1,5	+1	700	+1
5	0,3	-1,41	500	0
6	1,7	+1,41	500	0
7	1,0	0	217	-1,41
8	1,0	0	783	+1,41
9	1,0	0	500	0
10	1,0	0	500	0
11	1,0	0	500	0

A otimização foi feita a partir da determinação do ponto estacionário da superfície de resposta (X_s), seguindo a seguinte equação:

$$X_s = -0,5B^{-1}.b \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde, B é a matriz simétrica (k x k), na qual a diagonal têm-se os coeficientes da regressão de segunda ordem e fora da diagonal os coeficientes de interação; e b um vetor (k x 1) composto pelos coeficientes de regressão de primeira ordem.

O valor predito da variável resposta no ponto ótimo é dado pela seguinte equação:

$$\hat{Y}_s = \beta_0 + 0,5X_s.b \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde, β_0 é o coeficiente do modelo matemático.

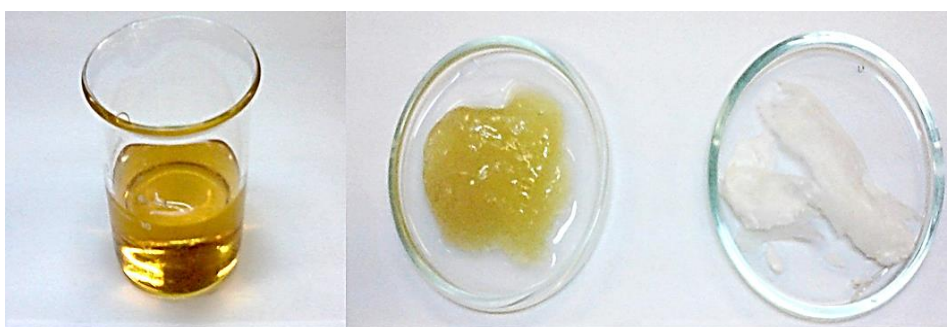
O estudo da natureza da superfície foi realizado a partir da função resposta na forma canônica, dada pela seguinte equação:

$$\hat{Y} = \hat{Y}_s + \lambda_1 W_1^2 + \lambda_2 W_2^2 \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde, W são s variáveis independentes transformadas; λ são constantes (autovalores ou raízes da matriz B) e \hat{Y}_s resposta estimada no ponto ótimo.

4.2.7 Recuperação da goma xantana

O caldo fermentado foi diluído em solução de NaCl (0,85%) na proporção de 1:1 com a finalidade de diminuir a viscosidade de caldo e facilitar a separação da biomassa. Posteriormente a solução foi centrifugada a uma velocidade de 18800 x g (12000 rpm) por 30 minutos à 5°C. Ao sobrenadante foi adicionado álcool etílico 98°GL na proporção de 1:3 (v/v) para a precipitação da xantana, que posteriormente foi seca em estufa com circulação (Tecnal, modelo TE-394/2) ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) até massa constante. A biomassa foi resuspensa em 10 mL da solução salina, novamente centrifugada nas mesmas condições anteriores e seca em estufa com circulação ($45 \pm 2^\circ\text{C}$) até peso constante (biomassa seca).



GRB

Goma xantana bruta

Goma xantana purificada

Figura 8. Efeito da purificação no aspecto visual da goma xantana oriunda da fermentação de GRB.

Para a purificação da goma xantana, soluções aquosas a 2% (m/v) foram dialisadas, sob agitação, contra água ultrapura (durante 72 horas a 4°C, em membranas semipermeáveis de celulose com limite de exclusão de peso molecular de 12.000-16.000 Da e porosidade de 24A°. A troca da água foi realizada de 3 a 5 vezes ao dia. Após a diálise, as soluções de biopolímeros foram congeladas, liofilizadas (LIOTOP

Capítulo 4 – Material e métodos

mod. L101) e armazenadas em embalagens herméticas. Com as gomas xantana purificadas e submetidas à radiação UV para inativação celular, foram realizadas as análises de caracterização.

4.2.8 Cinética do processo fermentativo

O acompanhamento da cinética do processo fermentativo foi realizado nas condições referentes ao ponto estatisticamente selecionado como melhor para produção de goma xantana. Foram coletadas amostras a cada 24 horas e quantificado a concentração, em g.L^{-1} , de goma xantana, biomassa e GRB consumida.

A quantificação da goma xantana e biomassa seca foram realizadas conforme descrito no item 3.2.7. O consumo de GRB ao longo da fermentação foi mensurado por cromatografia de exclusão por tamanho em sistema GPC – CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) em cromatógrafo (Perkin Elmer, serie 200, Shelton, EUA) com colunas Shodex OHpak SB 803, 804, 805, 806 (Kawasaki-Ku, Japan) dispostas em série, usando NaNO_3 (0,05M) como eluente a uma taxa de 1 mL.min^{-1} . O detector usado foi índice de refração (IR) Perkin Elmer serie 200 (Shelton, EUA). A concentração de GRB foi quantificada através da curva de calibração construída a partir de soluções aquosa de GRB (máxima de 22 g.L^{-1}) *versus* área dos respectivos picos.

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

- Velocidade instantânea de formação de biomassa ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$): $r_x = dX/dt = (X_f - X_i)/(t_f - t_i)$
- Velocidade instantânea de formação de produto ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$): $r_p = dP/dt = (P_f - P_i)/(t_f - t_i)$
- Velocidade instantânea de consumo de substrato ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$): $r_s = -dS/dt = (S_i - S_f)/(t_f - t_i)$
- Fator de conversão substrato-biomassa: $Y_{x/s} = (X_f - X_i)/(S_i - S_f)$
- Fator de conversão produto-biomassa: $Y_{x/p} = (X_f - X_i)/(P_f - P_i)$
- Fator de conversão substrato-produto: $Y_{p/s} = (P_f - P_i)/(S_i - S_f)$
- Velocidade específica de formação de biomassa (h^{-1}): $\mu_x = (1/X)(dX/dt)$
- Velocidade específica de formação de produto (h^{-1}): $\mu_p = (1/X)(dP/dt)$
- Velocidade específica de consumo de substrato (h^{-1}): $\mu_s = (1/X)(-dS/dt)$

Onde:

X_i = concentração de biomassa no tempo inicial (t_i)

X_f = concentração de biomassa medida no tempo (t_f)

Capítulo 4 – Material e métodos

P_i = concentração de produto formado no tempo inicial (t_i)

P_f = concentração de produto formado medido no tempo (t_f)

S_i = concentração de substrato medido no tempo inicial (t_i)

S_f = concentração de substrato medido no tempo (t_f)

As velocidades específicas (μ) foram calculadas através do método geométrico proposto por Le Duy e Zajic (1973).

4.2.9 Caracterização das gomas xantana

As gomas xantana obtidas nos 11 experimentos foram submetidas a análises de viscosidade aparente (Y3) em mPa.s, composição química em mgL^{-1} de glicose (Y4), manose (Y5), ácido glucurônico (Y6) e ácido pirúvico (Y7); massa molecular ponderada, estimada pelo Tr (Tempo de retenção) (Y8); e temperatura inicial de degradação térmica (Y9).

O estudo cinético da produção de xantana e da influência de sais na viscosidade das soluções de xantana foi avaliado apenas com a goma xantana obtida na combinação ótima de aeração e agitação.

4.2.9.1 Análise reológica das gomas xantana

Foram preparadas soluções aquosas das xantanas purificadas na concentração de 0,5% (m/v), para análise de viscosidade aparente, a 25°C. O polímero foi dissolvido em água ultrapura e dissolvido sob agitação mecânica durante 15 minutos. As soluções foram mantidas sob refrigeração por 12 horas e posteriormente medida a viscosidade.

As análises foram conduzidas em viscosímetro Haake Rheotest, Mod. 2.1, Medingen, Alemanha, com cilindros concêntricos, acoplados a um banho-maria para controle de temperatura e taxa de cisalhamento entre 25 a 1000 s^{-1} .

Foram utilizados os dados de tensão cisalhante, medidos a partir das taxas de deformação, seguindo o modelo de Ostwald-de-Waele. O modelo foi utilizado para avaliação do comportamento pseudoplástico dos biopolímeros. As unidades de medida utilizadas foram: mPa.s para viscosidade aparente, s^{-1} para taxa de cisalhamento e mPa para tensão de cisalhamento.

4.2.9.2 Composição química

Foram quantificados teor de glicose, manose, ácido glucurônico e ácido pirúvico, em mg.L^{-1} , das gomas xantana obtidas da GRB. As amostras purificadas e submetidas a Radiação UV (10 mg) foram inicialmente hidratadas com água grau cromatográfico (0,5 mL) durante 12 h, posteriormente hidrolisada com 0,5 mL ATF (Ácido Trifluoracético) a 1,0 M por 10 horas em estufa com temperatura controlada a $100 \pm 2^\circ\text{C}$. O hidrolisado foi seco com fluxo de gás nitrogênio (SCHERZ; BONN, 1998) e liofilizado para remoção dos resíduos de ATF. Em seguida o hidrolisado seco foi dissolvido em 1,0 mL de água grau cromatográfico.

Para a determinação dos açúcares, soluções de polímero hidrolisado foram analisados no sistema CLAE (PerkinElmer série 200) com detector de IR, utilizando uma pré-coluna Polypore Ca (30 mm x 4,6 mm x 10 μm), seguido por uma coluna Polypore Ca (220 mm x 4,6 mm x 10 mm) ambas acondicionadas num forno a 80°C . A fase móvel foi de água grau cromatografico sob um fluxo de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O volume de injeção foi de 5 μl .

A identificação dos açúcares foi feita por comparação entre os tempos de retenção dos padrões de glucose e manose e os tempos de retenção das amostras de xantana hidrolisadas. A quantificação foi feita mediante curva de calibração construída a partir de diferentes concentrações dos padrões de açúcares ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $1,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e as áreas dos seus respectivos picos.

Para a determinação dos ácidos urônicos, soluções poliméricas hidrolisadas foram analisadas pelo sistema CLAE com detector de ultravioleta (UV) a um comprimento de onda de 195 nm (PerkinElmer série 200), utilizando uma pré-coluna Polypore H (4,6 mm x 30 mm x 10 mm), seguida por uma coluna H Polypore (220 mm x 4,6 mm x 10 μm). As colunas foram acondicionadas em forno a 50°C durante toda a análise. A fase móvel usada foi uma solução aquosa de H_2SO_4 com pH 1,9 e um fluxo de $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O volume de injeção foi de 10 μL .

A identificação dos ácidos foi feita por comparação entre os tempos de retenção dos padrões de ácido glucurônico e ácido pirúvico e os tempos de retenção das amostras de xantana hidrolisadas. A quantificação foi feita mediante curva de calibração construída a partir de diferentes concentrações dos padrões de ácido glucurônico ($2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e ácido pirúvico ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a $82 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e as áreas dos seus respectivos picos.

4.2.9.3 Massa molecular ponderada

A massa molecular ponderada, assim como os limites de distribuição de massa molecular das gomas xantana obtidas por fermentação da GRB foram determinadas por cromatografia por exclusão de tamanho em sistema CPC-CLAE, utilizando colunas Shodex SB 803, 804, 805, 806 conectadas em série e acopladas a um detector IR (Índice de Refração). Solução de NaNO₃ a 0,05 M a um fluxo de 1,0 mL. min.⁻¹ foi utilizada como fase móvel do sistema.

A goma xantana Sigma foi utilizada como controle para comparação da massa molecular com os biopolímero obtidos nos ensaios. Foram injetados 80 µL das soluções (0,3% m/v) de todas as amostras do planejamento, da goma xantana padrão (Sigma) e dos padrões de dextrana. A quantificação da massa molecular das xantanas foi realizada através da curva de calibração construída a partir de padrões de dextrana (American Polymers Standards) de diferentes massas moleculares (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) e seus respectivos TR (tempos de retenção), em minutos.

4.2.9.4 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises não isotérmicas das gomas xantana foram feitas por termogravimetria utilizando TGA- Perkin Elmer. Uma massa inicial de amostra (7,0 mg) foi submetida a uma variação de temperatura entre 0 e 1000°C, com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ em atmosfera dinâmica de gás inerte (20 mL.min⁻¹).

As curvas de DTGA, correspondentes a derivada primeira das curvas de TGA, foram usadas para determinar a máxima temperatura (°C) de degradação térmica e perda de massa (%) do polímero. O software Pyris Manager foi utilizado para determinação das curvas e quantificação das perdas de massas.

4.2.10 Influência de diferentes sais na viscosidade aparente das gomas xantana

Foram avaliados os efeitos da adição de sais na viscosidade aparente das gomas xantana purificadas obtidas a partir da GRB. Para este estudo foi selecionado apenas a goma xantana produzidas no ensaio correspondente à combinação ótima de aeração e

Capítulo 4 – Material e métodos

agitação para as respostas produção e viscosidade. Soluções aquosas (água ultrapura) a 0,01% e 0,1% de sais monovalente (KCl), bivalentes (CaCl₂) e trivalentes (FeCl₃) foram preparadas e usadas para dissolver a massa de goma xantana suficiente para formar uma solução do biopolímero a 0,5% (m/v). As soluções foram homogeneizadas com auxílio de um agitador de laminas em baixa velocidade por 15 minutos. As soluções foram armazenadas por 24h sob refrigeração (4°C).

No estudo foram avaliados os efeitos dos diferentes tipos e concentrações de sais na viscosidade aparente das gomas, nos parâmetros n (índice de fluxo) e K (índice de consistência) e no comportamento das viscosidades frente a diferentes temperaturas (25, 45, 65 e 85°C).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O decorrente parágrafo apresenta os resultados e discussão dos seguintes estudos:

-Composição centesimal da glicerina residual do biodiesel, utilizada como fonte alternativa de carbono;

-Seleção do tempo de fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, em biorreator de 4,5L (3,0 L útil), a partir do seu efeito na produção e viscosidade da goma obtida;

-Avaliação do efeito das variáveis independentes aeração (X1) em vvm e velocidade de agitação (X2) em rpm, sobre as seguintes variáveis dependentes: produção de goma xantana e biomassa em g.L⁻¹; viscosidade aparentes em mPa.s; composição química mensurada em mg.L⁻¹ de glicose, manose, ácido glucurônico e ácido pirúvico; massa molecular (Da) e temperatura inicial de degradação térmica em °C das gomas xantanas obtidas da fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, em biorreator de 4,5 L (3,0 L útil). Para todas as respostas, foram verificadas as possibilidades de efeitos individuais (X1, X2) e/ou interativos (X1*X2) das variáveis de processo e avaliado o ajuste e a predição de cada modelo gerado pelas respostas avaliadas.

-Avaliação de parâmetros cinéticos da produção do biopolímero obtido pela fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 na combinação ótima de aeração e agitação.

-Avaliação do efeito da concentração e natureza de sais na viscosidade aparente da goma xantana produzida nas condições ótimas de aeração e agitação.

5.1 Composição da glicerina residual do biodiesel (GRB)

O estudo da composição da glicerina proveniente do biodiesel (GRB) mostrou teores de voláteis (53,50 ± 0,01), cinzas (3,40 ± 0,01), lipídios totais (6,70 ± 0,02), proteínas (2,71 ± 0,03) e glicerol (33,69 ± 0,02), em percentagens. Os elevados teores de minerais, nitrogênio orgânico e lipídios totais devem-se aos resíduos das oleaginosas, ácidos graxos livres e triglicérides não hidrolisados, derivados do processamento de biodiesel.

Capítulo 5 – Resultados e discussão

Em geral, os meios fermentativos contêm 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). Os processos industriais procuram utilizar meios que disponibilizem condições tanto para o crescimento como para o acúmulo do polímero (TEIXEIRA, 2005). Neste contexto, existe a necessidade de suplementação de nitrogênio livre e fósforo no meio fermentativo composto de glicerina residual do biodiesel.

Os componentes C e N fornecidos como nutrientes para o crescimento das bactérias são conhecidos por afetar a produção de xantana, dependendo da sua composição e quantidades relativas. A relação C:N na GRB é de aproximadamente 15:1, correspondendo a 20,21 g de glicerina, 4,02 g de lipídeos e 1,63 g de proteína, considerando a utilização de 2,0 % (m/v) do substrato em biorreator de 3,0 L de volume útil para a fermentação. A composição química da glicerina encontrada está em concordância com as condições de fermentação que indicam que concentração de nitrogênio não limitante é necessária para o rápido crescimento celular, enquanto o excesso de carbono e baixa concentração de nitrogênio são essenciais para a produção de goma xantana com propriedades reológicas adequadas (SUTHERLAND, 1996). De acordo com Uma Shankar *et al.* (1996), as fontes de nutrientes influenciam a via de síntese do polímero. Na GRB utilizada nesse trabalho, glicerol e lipídios totais são os componentes majoritários, mas de acordo com Thompson e He (2006), glicerina derivada de biodiesel também contém uma variedade de outros elementos, tais como cálcio (3-15 ppm), magnésio (1-2 ppm), fósforo (8-13 ppm), e enxofre (22-26 ppm), independente da fonte de matéria prima (canola, colza e soja). Assim, um meio fermentativo rico em nutrientes e micronutrientes e a adaptação bacteriana a um meio alternativo, podem contribuir para um aumento na produção de goma de xantana.

Para alcançar uma produção elevada de goma xantana é necessária regular o crescimento das células e a biossíntese do polímero durante o processo. Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de GRB (1,0 %, 2,0 %, 4,0 % e 6,0 %, m/v) sobre a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris magiferaeindicae* 2103, em biorreator de 4,5 L e 3,0 L de volume útil a 28°C, 400 rpm, 1,0 vvm por 72 h). A utilização de 2,0% de GRB nos meios de fermentação proporciona a formação de 1,15 g.L⁻¹ de biomassa e produção de 2,34 g.L⁻¹ de goma xantana, enquanto a 1,0 % de GRB proporciona a formação de 0,36 g.L⁻¹ de biomassa e 0,84 g.L⁻¹ de goma xantana. As

Capítulo 5 – Resultados e discussão

fermentações conduzidas a 4,0% e 6,0% de GRB apresentou muita formação de espuma, que acarretou em perda significativa do meio fermentativo. Portanto, a concentração de 2,0% de GRB para a produção do polímero em biorreator de 4,5 L com 3,0 L volume útil, é a mais adequada. Isto é consistente com diferentes estudos sobre as exigências nutricionais dos meios fermentativos por *Xanthomonas*, visando à sustentabilidade do processo em relação ao custo-benefício da produção (CASAS *et al*, 2000;. GARCÍA-OCHOA *et al*, 2000; DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007).

5.2 Curva de crescimento microbiano

As curvas de crescimento de *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 foram construídas a fim de se obter informações da fase exponencial da bactéria, através da variação da concentração celular ao longo do processo. O conhecimento a cerca desse estudo permite maior reprodutibilidade dos experimentos, uma vez que os inóculos contem a mesma faixa de concentração celular.

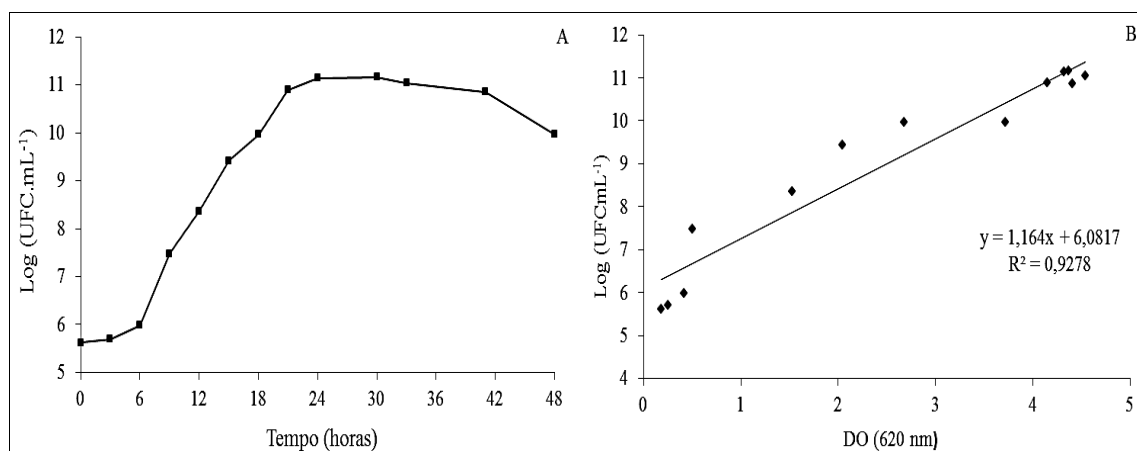


Figura 9. Curvas de crescimento plotadas a concentração celular de *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 em função do tempo de fermentação (A); e em função da densidade ótica do meio (B) ao longo de 48 h de incubação a 180 rpm e 28°C.

A partir da análise da Figura 9A, observa-se que os microrganismos apresentam fase lag compreendida entre as seis primeiras horas de incubação. Isso indica que as condições de processo favorecem à rápida adaptação dos microrganismos ao meio de cultura. A partir de 6 horas, iniciou-se a fase de crescimento exponencial, cujo ápice ocorre em 24 horas de incubação. A partir de então, inicia-se a fase estacionária de

Capítulo 5 – Resultados e discussão

crescimento celular, na qual a concentração atinge o valor máximo e se mantém praticamente constante. Como as concentrações celulares entre 24 e 33 horas são similares, adotou-se 24 horas de incubação como tempo ideal para obtenção de máxima concentração celular do inóculo, a ser transferido para o meio fermentativo contendo GRB. Neste período a concentração celular foi em média $1,03 \times 10^{11}$ UFC.mL⁻¹. Rottava (2005) utilizou concentração na mesma ordem, ao avaliar a curva das bactérias *Xantomonas campestris* (01-1537) e *Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* (02-1230), porém numa faixa de 36 a 48 horas de incubação a 120 rpm.

A Figura 9B mostra a regressão linear entre a média das medidas de Densidade Óptica (DO) e o log da média das contagem de colônias, com uma correlação de 92,78%. A baixa correlação pode estar associada à inclusão do exopolissacarídeo na leitura de densidade óptica do meio, uma vez que há formação do polímero ao longo do processo de incubação. Sendo assim, torna-se mais preditivo a utilização da curva composta da concentração de microrganismo em função do tempo de incubação (Pour Plate).

5.3 Influência do tempo de fermentação na produção e viscosidade da goma xantana

A Figura 10 mostra a variação na produção e viscosidade aparente de goma xantana obtida na fermentação de 2,0 % (m/v) de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 ao longo de 168h de fermentação.

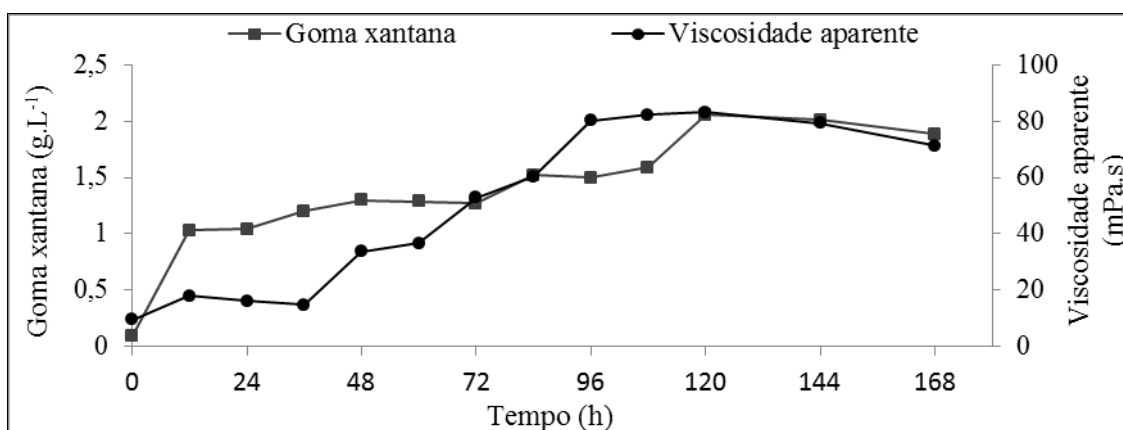


Figura 10. Produção e viscosidade de goma xantana obtida da fermentação de GRB por *X. campestris mangiferaeindicae* 2103 (2,0% GRB, 300 rpm e 1,0 vvm) em biorreator de 3,0 L de volume útil ao longo de 168 de fermentação.

Capítulo 5 – Resultados e discussão

O fermentação foi conduzida em biorreator de 3,0 L de volume útil, a 300 rpm e 1,0 vvm e a viscosidade aparente da solução aquosa do polímero resultante (0,5 %, m/v) determinada a 25°C e 25s⁻¹.

As produções de goma xantana, bem como as respectivas viscosidades aumentam continuamente ao longo do tempo de fermentação, atingindo valores de produção e viscosidade máximos (2,06 g.L⁻¹ e 83,29 mPa.s) em 120 h de fermentação. Nota-se que a partir de 120 h ocorre uma redução tanto da produção quanto da viscosidade aparente, possivelmente devido hidrólise da goma xantana por ação enzimática dos microrganismos, causada pelo esgotamento total da fonte de carbono (GRB), e necessidade da mesma para manutenção bacteriana (Figura 10).

Padilha (2003) relata que a produção e viscosidade de goma xantana por linhagens de *Xanthomonas* sofrem influência do tempo de fermentação. A cepa *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 289 produz maior quantidade de polímero (7,9 g.L⁻¹) e maior viscosidade aparente (320 mPa.s) da solução a 1,0 % (m/v) (25°C e 25 s⁻¹) em 96 horas de fermentação.

5.4 Estudo dos efeitos da aeração e agitação na produção e propriedades da goma xantana em biorreator de 4,5 L (3,0 L de volume útil)

Os dados para estudo da influência da aeração (X1) e agitação (X2) na produção de goma xantana (Y1); produção da biomassa seca (Y2); viscosidade aparente (Y3); teores de glicose (Y4), manose (Y5), ácido glucurônico (Y6) e ácido pirúvico (Y7); massa molecular média (Y8) e temperatura de degradação térmica (Y9) das gomas xantana obtidas após 120 de fermentação estão sumarizados na Tabela 3.

O software *Statistica* 7.0 foi utilizado para calcular os efeitos dos fatores (variáveis independentes) em cada resposta (variáveis dependentes), por regressão múltipla; enquanto o ajuste e capacidade preditiva dos modelos foram avaliados através da ANOVA.

A fim de encontrar os níveis que maximizam ou minimizam cada resposta estimada, foi calculado o ponto estacionário da superfície, aqui chamado de combinação ótima. Além disso, a natureza de cada superfície foi avaliada com base nos sinais das raízes características das equações quadráticas (λ_1 e λ_2) provenientes da superfície de segunda ordem.

Capítulo 5 – Resultados e discussão

Tabela 3. Matriz do planejamento experimental composto por variáveis independentes (valores reais e codificados) e resposta de produção e caracterização das gomas xantanas purificadas obtidas em 120 hpor fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 em biorreator de 4,5 L e 3,0 L de volume útil.

Ensaio	X1 (vvm)	X2 (rpm)	Y1 (gL ⁻¹)	Y2 (gL ⁻¹)	Y3 (mPa.s)	Y4 (mgL ⁻¹)	Y5 (mgL ⁻¹)	Y6 (mgL ⁻¹)	Y7 (mgL ⁻¹)	Y8 (10 ⁶ Da)	Y9 (°C)
1	0,5 (-1)	300 (-1)	2,02	1,31	97,80	244,80	288,11	137,47	69,86	26,29	198,14
2	0,5 (-1)	700 (+1)	1,78	0,73	79,60	254,01	390,26	45,15	27,09	13,31	208,48
3	1,5 (+1)	300 (-1)	2,89	1,71	137,20	196,15	208,11	110,00	56,94	26,48	209,47
4	1,5 (+1)	700 (+1)	1,45	1,32	106,20	126,90	233,86	116,18	61,45	15,62	216,38
5	0,3 (-1,41)	500 (0)	4,18	1,89	165,60	0,00	750,12	71,50	149,95	17,22	194,22
6	1,7 (+1,41)	500 (0)	2,84	1,36	134,50	478,86	513,31	133,59	51,98	24,19	204,32
7	1,0 (0)	217 (-1,41)	0,87	1,23	115,20	181,60	172,60	48,03	41,20	27,79	206,52
8	1,0 (0)	783 (+1,41)	0,26	0,89	87,00	217,33	377,36	81,45	43,63	26,29	200,15
9*	1,0 (0)	500 (0)	6,07	3,31	262,20	311,83	226,78	76,47	169,74	27,38	220,41
10*	1,0 (0)	500 (0)	5,21	3,11	258,00	340,50	267,54	87,48	118,88	23,85	218,12
11*	1,0 (0)	500 (0)	5,47	3,23	243,50	392,03	303,51	136,45	142,17	27,41	226,45

*Ponto central.

Y1 = produção de xantana, Y2 = biomassa, Y3 = viscosidade aparente das soluções(0,5% (m/v),25°C e 25 s⁻¹), Y4 = teor de glicose, Y5 = teor de manose, Y6 = teor de ácido glucurônico, Y7 = teor de ácido pirúvico, Y8 = massa molecular ponderada e Y9 = temperatura inicial de degradação térmica do polímero.

Capítulo 5 – Resultados e discussão

5.4.1 Produção de goma xantana (Y1)

A variação das variáveis independentes X1 (aeração de 0,3 a 1,7 vvm) e X2 (agitação de 217 a 783 rpm) exercem grande influência na produção de goma xantana, com variação de 0,26 a 6,07 g.L⁻¹, dependendo das condições utilizadas no processo fermentativo (Tabela 3).

Para a resposta produção de goma xantana (Y1) (Tabela 3) foram calculados os coeficientes de regressão, mostrados na Tabela 4, onde se observa que apenas os efeitos quadráticos da aeração e agitação são significativos ($p < 0,05$). Os demais efeitos apresentaram valor de $p > 0,05$.

Os coeficientes mostrados na Tabela 4 reportam que tanto a aeração quanto a agitação apresentaram efeito negativo sobre a produção do polímero, sendo o efeito da agitação 2,4 vezes menor do que o da aeração, em valores absolutos. Nota-se na Tabela 3, que quando a aeração é mantida a 0,5 vvm a variação da agitação do valor mínimo (300 rpm) para o máximo (700 rpm), resulta em redução de 11, 88% na produção. O mesmo comportamento ocorre quando se manteve a aeração em 1,5 vvm, porém com uma queda na produção (49,82%). Por outro lado, a agitação mantida a 300 rpm e a aeração variando de 0,5 para 1,5 vvm, aumentou a produção em 30,10%, enquanto a mesma variação da aeração à 700 rpm, reduziu em 18,82%. Logo, o uso de baixas velocidades de agitação, quando comparados aos valores máximos testados, indica acréscimo na produção de xantana.

Tabela 4. Estimativa de efeitos de X1 e X2 na produção de goma xantana (Y1).

Termo	Coefficiente	p-valor
Constante	5,582	0,002
X1	-0,339	0,393
X1*X1	-2,073	0,031
X2	-0,636	0,180
X2*X2	-5,019	0,005
X1*X2	-0,598	0,310

Capítulo 5 – Resultados e discussão

A ANOVA, reportada na Tabela 5, mostra que um modelo polinomial de segunda ordem (Equação 7) foi ajustado para a variável Y1 com 95% de confiança, e portanto, considerado preditivo. A predição do modelo foi verificada pelo fato do F calculado ter sido aproximadamente 4,06 vezes maior do que o F tabelado. De acordo com Barros Neto, Scarminio; Bruns (2010) o valor de F calculado deve ser de 4 a 5 vezes maior que o F tabelado para o modelo ser preditivo.

Tabela 5. Análise de variância para avaliação estatística do modelo de produção de goma xantana (Y1) obtidas da fermentação da GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F Calculado	F Tabelado
Regressão	37,516	5	12,505	20,488	5,05
Resíduo	1,220	5	0,610		
Falta de ajuste	0,825	3	0,275	1,391	19,16
Erro puro	0,395	2	0,197		
Total	38,737	10			
R^2			0,968		

Resíduo = Falta de ajuste + erro puro.

$$Y1 = 5,5829 - 0,1696X1 - 1,0366X1^2 - 0,3182X2 - 2,5096X2^2 - 2,2994X1X2 \quad (\text{Eq. 7})$$

A análise da Tabela 5, ainda permite concluir que o modelo (Equação 7) apresenta F calculado $<$ F tabelado da falta de ajuste. Além disso, o valor do coeficiente de determinação (R^2) do modelo foi 0,968, indicando que o modelo apresenta bom ajuste, e que apenas 3,15% do total de variações não podem ser explicados pelo modelo proposto.

A partir do modelo foi possível a construção da superfície de resposta apresentada na Figura 11. A máxima produção de goma xantana foi encontrada no ponto central do planejamento (1,0 vvm e 500 rpm), no qual obteve-se em média 5,58 g.L⁻¹ de goma xantana purificada.

Capítulo 5 – Resultados e discussão

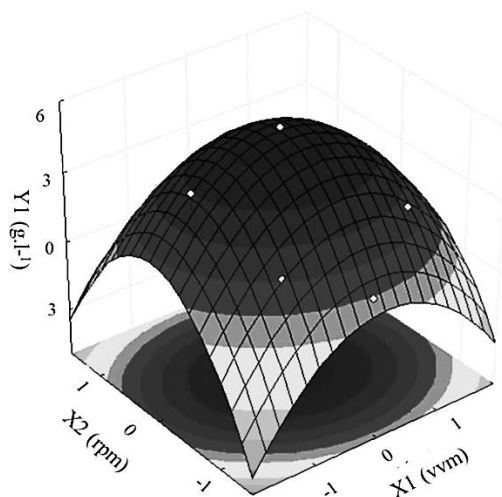


Figura 11. Superfície de resposta mostrando a variação de produção de goma xantana purificada (Y1) em função da variação da aeração (X1) e da agitação (X2) para a fermentação da GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103.

A Equação 8 representa a superfície de resposta ajustada na forma canônica.

$$\hat{Y}_1 = 5,5895 - 0,6414W_1^2 - 4,1875W_2^2 \quad (\text{Eq. 8})$$

Os sinais negativos para a raiz λ_1 (-0,6414) e λ_2 (-4,1875) mostram que Y1 apresenta um ponto de máximo, confirmado pela superfície mostrada na Figura 11. O ponto de otimização encontrado para a maximização da produção de goma xantana foi de -0,06 (0,97 vvm) para aeração e de -0,01 (498,00 rpm) para velocidade de agitação. Este resultado está de acordo com os dados experimentais mostrados na Tabela 3, em que as máximas produções foram obtidas no ponto central (1,0 vvm e 500 rpm). A combinação de variáveis no ponto ótimo prevê a produção de 5,59 g.L⁻¹ de goma xantana purificada.

A análise da Tabela 3 para Y1 mostra que as mínimas produções de goma xantana estão associadas a condições extremas de agitação. O ensaio conduzido a 783 rpm e 1,0 vvm (Ensaio 8) apresentou um decréscimo de 84,35% na produção de xantana quando comparado com a produção no ponto central a 500 rpm e mesma agitação (Ensaio 9). Segundo Casas; Santos; García-Ochoa (2000), elevadas velocidades de agitação são responsáveis por causar stress hidrodinâmico, assim como, possíveis danos às células. Respostas similares foram observadas na fermentação a 217 rpm e 1,0 vvm (Ensaio 7). Nesta condição houve redução em torno de 83,46% na produção em relação à resposta

Capítulo 5 – Resultados e discussão

obtida a 500 rpm com a mesma aeração (ensaio 9). De acordo com Peters *et al.* (1989) baixas velocidades de agitação podem provocar limitações de oxigênio, além de comprometer o transporte de nutrientes para as células (Papagianni, 2001).

O controle das condições de aeração e agitação na produção de goma xantana é importante para prevenir condições de anaerobiose decorrente do aumento de viscosidade do meio ocasionado devido o aumento de formação do polissacarídeo (CASAS; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000).

A produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 a partir de sacarose, em diferentes velocidades de agitação (100, 300, 500 e 800 rpm) com fluxo de ar de 1,0 vvm num volume de 1,5 L, foi testada por Casas *et al.* (2000). Os autores observaram que a 100 rpm ($\sim 4,0 \text{ g.L}^{-1}$) e 800 rpm ($\sim 2,5 \text{ g.L}^{-1}$) houve baixas produções de xantana, sendo a máxima produção também alcançada a 500 rpm (16 g.L^{-1}). Papagianni *et al.* (2001) avaliaram a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* ATCC 1395, em 100, 200, 300, 400, 600 e 800 rpm com 1,0 vvm em 1,0 L de meio contendo glicose. Nesse estudo, a produção de goma xantana quase dobrou quando a velocidade de agitação foi aumentada de 100 ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$) para 600 rpm ($6,3 \text{ g.L}^{-1}$). Psomas *et al.* (2007) estudaram a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* ATCC 33913, com a agitação de 100 a 600 rpm, temperatura entre 25 e 35, fluxo de 1,0 vvm em 2,0 L de meio também contendo glicose, com máxima produção em 600 rpm ($6,9 \text{ g.L}^{-1}$).

Moshaf; Hamidi-Esfahani; Azizi (2011) avaliaram a produção de xantana obtida pela fermentação de 100 mL de meio contendo resíduo de tâmaras por *Xanthomonas campestris* ATCC 1473 a 200, 300 e 400 rpm, e a máxima produção foi obtida à 400 rpm ($6,93 \text{ g.L}^{-1}$) e a mínima ($1,55 \text{ g.L}^{-1}$) a 200 rpm.

A máxima produção de goma xantana purificada obtida na fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 (1,0 vvm, 500 rpm, 28°C, 120h em bioreator de 4,5 L e 3,0 L de volume útil) obtida neste estudo ($5,59 \text{ g.L}^{-1}$) foi 35,4 e 30,0 vezes maior do que as obtidas em agitador orbital (180 rpm, 28°C, 250 mL) sintetizada a partir de glicerol por cepas de *Xanthomonas sp* C1 e C9, respectivamente (REIS *et al.*, 2010), e 4,5 vezes maior do que a goma xantana produzidas em agitador orbital (250 rpm, 28°C, 80 mL) com 2,0 % de GRB por *Xanthomonas axonopodis manihotis* 356 FIGUEREDO *et al.* (2011).

Capítulo 5 – Resultados e discussão

5.4.2 Produção de Biomassa (Y2)

A variação das variáveis independentes X1 (aeração de 0,3 a 1,7 vvm) e X2 (agitação de 217 a 783 rpm) exercem grande influência na produção de biomassa (Y2), com variação de 0,73 a 3,31 g.L⁻¹, dependendo das condições utilizadas no processo fermentativo.

A Tabela 6 mostra os coeficientes calculados para a variável dependente concentração de biomassa (Y2) (Tabela 3), onde se observa que a aeração quadrática apresenta efeito positivo ($p < 0,05$), enquanto a agitação linear e quadrática efeitos negativos na produção de biomassa ($p < 0,05$), sendo o efeito quadrático da agitação 6,3 vezes maior do que o linear e 1,5 vezes maior do que o quadrático da aeração.

Tabela 6. Estimativa de efeitos das variáveis independentes aeração (X1) e velocidade de agitação (X2) na concentração de biomassa (Y2).

Termo	Coefficiente	p-valor
Constante	3,246	0,001
X1	0,247	0,097
X1*X1	1,471	0,005
X2	-0,365	0,048
X2*X2	-2,291	0,002
X1*X2	0,100	0,487

Partindo da análise dos dados de Y2 na Tabela 3, observa-se que ao fixar a aeração em 0,5 vvm e alterar a agitação de 300 (Ensaio 1) para 700 rpm (Ensaio 2) houve redução de 44,27 % na concentração de biomassa seca. O mesmo ocorre ao fixar a aeração em 1,5 vvm (Ensaio 3 para Ensaio 4), porém com redução de 22,80% na formação biomassa. No entanto, a agitação do sistema mantida a 300 rpm e a aeração variando de 0,5 (Ensaio 1) para 1,5 vvm (Ensaio 3) resulta em um acréscimo de 23,39 % na produção de biomassa. Quando mantido a 700 rpm (Ensaio 2 para Ensaio 4), a mesma variação na aeração levou a um acréscimo de 44,70 % na produção de biomassa seca. Portanto, a utilização de baixa agitação e elevada aeração pode levar a maiores concentrações de biomassa.

Capítulo 5 – Resultados e discussão

As maiores concentração de biomassa foram obtidas em 500 rpm de agitação, sendo a máxima ($3,31 \text{ g.L}^{-1}$) obtida com 1,0 vvm (Ensaio 9), que foi cerca de 58,91 e 42,90 % maiores do que as concentrações obtidas em 1.7 vvm (Ensaio 6) e 0,3 vvm (Ensaio 5), respectivamente. As menores concentrações ($0,73$ e $0,89$ e $1,32 \text{ g.L}^{-1}$) foram obtidas nos ensaios conduzidos com máxima agitação (700 rpm). Assim como na produção do biopolímero, baixas produções de biomassa podem estar associadas a danos causados nas células, em decorrência das elevadas velocidades de agitação.

Psomas *et al.* (2007) variaram a agitação de 100 a 600 rpm, com fluxo de 1,0 vvm, em 2 L de meio contendo glicose fermentada durante 72 h por *Xanthomonas campestris* ATCC33913 e obtiveram máxima concentração de biomassa a 600 rpm ($3,46 \text{ g.L}^{-1}$) e mínima em 100 rpm ($1,51 \text{ g.L}^{-1}$). Papagianni *et al.* (2001) também avaliaram a concentração de biomassa entre 100 e 800 rpm com 1vvm em 1 L de meio contendo glicose fermentada por *Xanthomonas campestris* ATCC 1395. Os autores concluíram que até 600 rpm ($\sim 3,0 \text{ g.L}^{-1}$) o aumento da agitação favorece o crescimento celular, o que condiz com os resultados encontrados neste trabalho.

A análise de variância para os dados de Y2, apresentados na Tabela 7, mostrou que o modelo codificado quadrático proposto (Equação 9) apresentou F calculado < F tabelado da falta de ajuste, sendo portanto bem ajustado aos dados experimentais. Além disso, o valor do coeficiente de determinação (R^2) do modelo foi de 0,968, indicando que o modelo apresenta bom ajuste, e que apenas 3,2% do total de variações não podem ser explicadas pelo modelo proposto.

Tabela 7. Análise de variância para avaliação estatística do modelo da concentração de biomassa (Y2).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F Calculado	F Tabelado
Regressão	8,797	5	2,932	18,609	5,05
Resíduo	0,284	5	0,142		
Falta de ajuste	0,256	3	0,085	6,097	19,16
Erro puro	0,028	2	0,014		
Total	9,081	10			
R^2			0,968		

Resíduo = falta de ajuste + erro puro

Capítulo 5 – Resultados e discussão

$$Y2 = 3,2466 + 0,12396X1 - 0,73583X1^2 - 0,1826X2 - 1,1458X2^2 + 0,05X1X2 \quad (\text{Eq. 9})$$

A Tabela 7, ainda permite concluir que o modelo é preditivo, uma vez que o valor de F calculado da regressão foi aproximadamente 3,7 vezes maior que o valor de F tabelado.

A superfície de resposta (Figura 12), obtida a partir do modelo empírico codificado, mostra que a máxima concentração de biomassa ocorreu na região do ponto central (1,0 vvm e 500 rpm), no qual pode-se obter em média 3,25 g.L⁻¹ de biomassa.

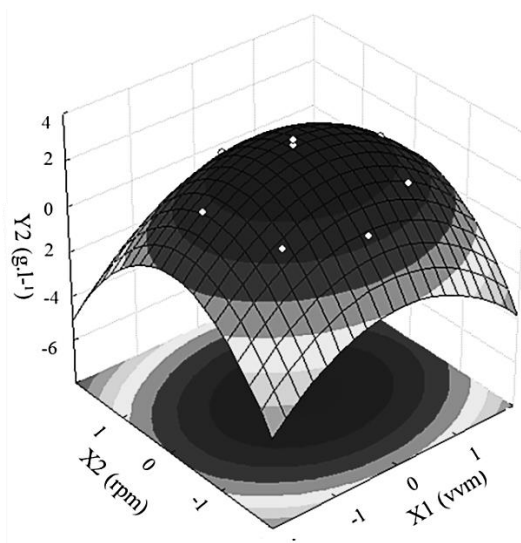


Figura 12. Superfície de resposta para produção de biomassa (Y2) em função das variáveis independentes: aeração (X1) e agitação (X2).

A Equação 10 representa a superfície de resposta ajustada na forma canônica.

$$\hat{Y}2 = 3,259 - 0,737W1^2 - 1,147W2^2 \quad (\text{Eq. 10})$$

Os sinais negativos para a raiz λ_1 (-0,737) e λ_2 (-1,147) mostram que Y2 apresenta um ponto de máximo, confirmado pela superfície mostrada na Figura 12. O ponto de otimização encontrado para a maximização da formação de biomassa (3,26 g.L⁻¹) foi de 0,09 (1,05 vvm) para aeração e -0,08 (484,75 rpm) para a velocidade de agitação. Este resultado está de acordo com os mostrados na Tabela 3, onde a máxima produção de biomassa foi obtida no ponto central (1,0 vvm e 500 rpm), assim como a produção do biopolímero (Y1).

Capítulo 5 – Resultados e discussão

5.4.3 Viscosidade aparente (Y3)

A variação das variáveis independentes X1 (aeração de 0,3 a 1,7 vvm) e X2 (agitação de 217 a 783 rpm) exercem grande influência na viscosidade aparente (Y3) das soluções aquosas de goma xantana a 0,5 % (m/v), com variação de 79,60 a 262,20 mPa.s, dependendo das condições utilizadas no processo fermentativo (Tabela 3).

Para verificar a qualidade das gomas xantana produzidas, foram preparadas soluções aquosas à 0,5 % (m/v) do biopolímero e medidas as viscosidades aparentes (Y3), em mPa.s a 25°C e taxa de cisalhamento de 25 s⁻¹ (Tabela 3). Os tratamentos estatísticos foram realizados com 95% de confiança e os coeficientes calculados para a viscosidade aparente das soluções de xantana (mPa.s) estão expostos na Tabela 8. Constata-se que os parâmetros quadráticos da aeração e agitação foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). A aeração apresenta efeito positivo e agitação efeito negativo sobre a viscosidade aparente do biopolímero, sendo o efeito da agitação 1,4 vezes maior do que o da aeração.

Tabela 8. Estimativa de efeitos de X1 e X2 na viscosidade aparente das soluções a 0,5% xantana (Y3) medidas a 25°C e taxa de cisalhamento de 25s⁻¹.

Termo	Coefficiente	p-valor
Constante	254,580	0,000494
X1	27,471	0,058179
X1*X1	114,680	0,005037
X2	-6,845	0,427510
X2*X2	-163,630	0,002533
X1*X2	24,650	0,128406

As viscosidades aparentes medidas estão apresentadas na Tabela 3. Ao fixar a aeração em 0,5 vvm e alterar a agitação de 300 (Ensaio 1) para 700 rpm (Ensaio 2) constata-se uma redução de 18,61 % na viscosidade. O mesmo ocorre ao manter 1,5 vvm e alterar a agitação de 300 (Ensaio 3) para 700 rpm (Ensaio 4), porém com redução de 22,52 % na viscosidade. Para velocidade de agitação de 300 rpm, o aumento na aeração de 0,5 (Ensaio 1) para 1,5 (Ensaio 3) promove um acréscimo na 28,71 % na

Capítulo 5 – Resultados e discussão

viscosidade. O mesmo comportamento foi observado nos ensaios a 700 rpm com mudança na aeração de 0,5 vvm (Ensaio 2) para 1,5 vvm (Ensaio 4), porém com incremento de 25,05 % na viscosidade. Portanto, o aumento individual da agitação resulta na diminuição da viscosidade, enquanto o aumento individual da aeração pode levar ao aumento na viscosidade aparente das soluções do biopolímero.

Os maiores valores de viscosidade aparente foram obtidas para as soluções de goma xantana sintetizadas sob 500 rpm de agitação, sendo a máxima (262,2 mPa.s), obtida à 1,0 vvm (Ensaio 9), que é 48,70 % e 36,84 % maior do que as obtidas à 1.7 vvm (Ensaio 6) e 0,3 vvm (Ensaio 5), respectivamente. As menores viscosidades (79,6 e 87 mPa.s) foram obtidas em condições de máxima agitação (700 e 783 rpm). Resultados similares foram encontrados por Casas; Santos; García-Ochoa (2000) ao avaliarem as viscosidades das gomas xantana produzidas a partir de sacarose por *Xanthomonas campestris* NRRL-1459, em diferentes velocidades de agitação. Os autores concluíram que em baixas velocidades (100 e 300 rpm) ocorre limitação de oxigênio, e em velocidades superiores a 500 rpm resulta no decréscimo da viscosidade devido a stress hidrodinâmico.

Borges *et al.* (2008) avaliaram a viscosidade aparente (25 °C e 30 s⁻¹) de xantana produzida por fermentação de sacarose por *xanthomonas campestris* pv *pruni* 101 em 300 rpm – 3,0 vvm e também em 200 rpm e 2,0 vvm. Os autores observaram que a solução a 3,0 % (m/v) de xantana obtida sobre alta aeração e agitação (300 rpm e 3,0 vvm) apresentou maior viscosidade (2.070 mPa.s), quando comparada a produzida com baixa aeração e velocidade de agitação (1.890 mPa.s). A influência da taxa de aeração na viscosidade de goma xantana produzida por fermentação de sacarose por *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, também foi estudada por Cadmus *et al.* (1978) ao variar a aeração de 0,25 a 1,5 vvm. Seus resultados mostraram que o aumento na aeração aumentava a viscosidade da goma xantana obtida. Mesomo (2007) obteve a mesma conclusão, ao perceber que as melhores viscosidades das soluções a 3.0% de goma xantana obtida da fermentação de soro de queijo por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* IBSBF 1230 foram obtidas em ensaios conduzidos a 600 rpm (1831,34 mPa.s) e as mais baixas obtidas a 180 rpm (32,37 mPa.s) e em 700 rpm (70,16 mPa.s).

A ANOVA para os dados de Y3 (Tabela 9), mostrou que o modelo codificado quadrático proposto (Equação 11) apresentou F calculado < F tabelado da falta de ajuste, sendo, portanto, bem ajustado aos dados experimentais.

Capítulo 5 – Resultados e discussão

O coeficiente de determinação (R^2) do modelo foi 0,971, sendo que 2,9% do total de variações não são explicadas pelo modelo proposto. Além disso, a análise ainda permite concluir que o modelo é preditivo, uma vez que o valor de F calculado da regressão foi aproximadamente 4,4 vezes maior do que o valor de F tabelado.

Tabela 9. Análise de variância para avaliação estatística do modelo para viscosidade aparente das soluções das gomas xantana (Y3).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	46855,672	5	15618,557	22,007	5,05
Resíduo	1419,420	5	709,710		
Falta de ajuste	1227,20	3	409,070	4,256	19,16
Erro puro	192,22	2	96,111		
Total	48275,09	10			
R^2			0,970		

Resíduo = Falta de ajuste + erro puro.

$$Y3 = 254,58 + 13,7352X1 - 57,340X1^2 - 3,4226X2 - 81,815X2^2 + 12,325X1X2 \quad (\text{Eq.11})$$

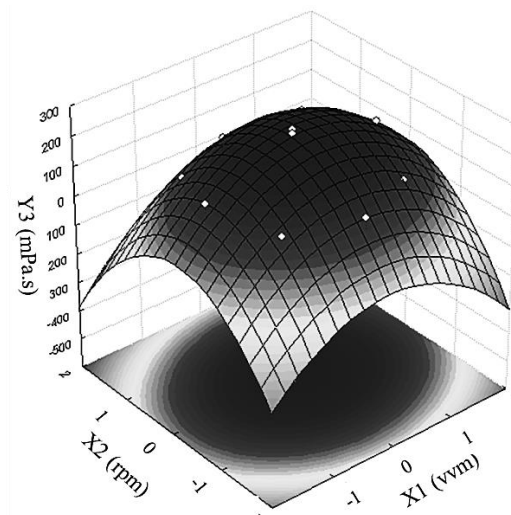


Figura 13. Superfície de resposta para viscosidade aparente (Y3) em função da aeração (X1) e da velocidade de agitação (X2).

A Equação 12 representa a superfície de resposta ajustada na forma canônica.

$$\hat{Y}_3 = 255,403 - 52,209W1^2 - 86,951W2^2 \quad (\text{Eq. 12})$$

Capítulo 5 – Resultados e discussão

Os sinais negativos para a raiz λ_1 (-52,209) e λ_2 (-86,951) mostram que Y3 apresenta um ponto de máximo, confirmado pela superfície da Figura 13. O ponto de otimização encontrado para a maximização da viscosidade aparente foi de 0,11 (1,05 vvm) para aeração e -0,01 (497,60 rpm) para a velocidade de agitação. Estes resultados estão de acordo com a Tabela 3, onde as máximas viscosidades experimentais foram obtidas no ponto central (1,0 vvm e 500 rpm). A combinação de variáveis no ponto ótimo prevê produção de goma com viscosidade aparente de 255,403 mPa.s.

Reis *et al.* (2010) produziram goma xantana em Shaker (180 rpm e 28°C) por fermentação de glicerol suplementado com sacarose por *X. campestris* sp C1 e C9. A média das máximas viscosidades aparente (254,56 mPa.s) (Tabela 3) das soluções a 0,5% de goma xantana obtidas da fermentação de GRB foi 1,8 e 2,7 vezes maior do que a viscosidade das soluções a 3,0% (m/v) de xantana sintetizadas por *Xanthomonas* C1 e C9, respectivamente. FIGUEREDO *et al.* (2011) obteve goma xantana a partir da fermentação de GRB por *Xanthomonas axonopodis manihotis* 356 com viscosidade aparente (102,60 mPa.s) 2,5 vezes menor do que a viscosidade (254,56 mPa.s) da solução de goma xantana (0,5 % (m/v), 25°C e 25 s⁻¹) obtida com GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103.

Para confirmação do comportamento pseudoplástico das gomas xantanas obtidas da fermentação da GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 nos 11 Ensaios (Tabela 3) foram realizados ajustes do modelo de Ostwald-de-Waele aos dados experimentais (Figura 14).

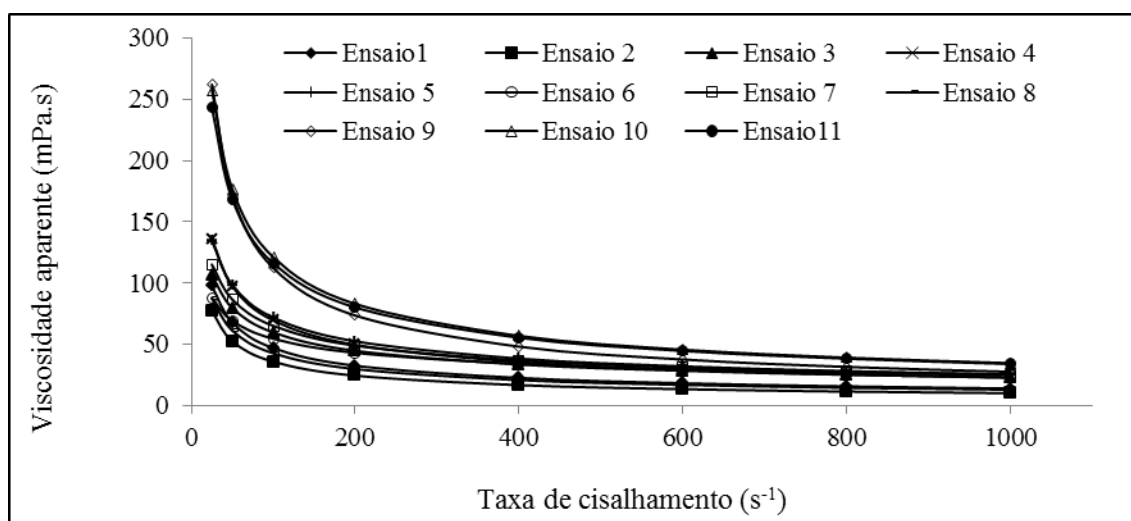


Figura 14. Viscosidade aparente (Y3) das soluções aquosas das gomas xantana a 0,5% (m/v) e 25 °C, frente à variação na taxa de cisalhamento (25 – 1000 s⁻¹).

Capítulo 5 – Resultados e discussão

A partir da análise da Figura 14, conclui-se que todas as curvas apresentaram boa correlação ($R^2 > 0,97$) ao modelo de Ostwald-de-Waele e que todos os polissacarídeos produzidos no planejamento (Tabela 3) apresentaram comportamento pseudoplástico típico de goma xantana, uma vez que as curvas de viscosidade decresceram com o aumento da taxa de cisalhamento. Segundo Dario *et al.* (2011) e Shaw (1975), quando a taxa de cisalhamento é elevada, além de ocorrer o alinhamento das cadeias, as ligações entre estas podem se desfazer, levando portanto, ao rompimento das ligações entre elementos estruturais do material, resultando em baixas viscosidades.

A goma xantana obtida da fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 pode ser aplicada como componente de fluido de perfuração de poços de petróleo, onde grandes quantidades deste biopolímero se fazem necessárias, tornando-o mais competitivo do que o obtido da fermentação de glicose (goma xantana comercial). Para isso, é necessário atender as condições exigidas pelas Normas Internas da empresa Petrobrás. Além desta aplicação, estas gomas, por serem purificadas (dialisada e liofilizada), poderiam também ser utilizadas na área de alimentos e farmacêutica. Entretanto, como se trata de um produto grau alimentício, maiores avaliações de toxicidade se fazem necessárias.

5.4.4 Composição química dos biopolímeros (Y4, Y5, Y6, Y7)

A variação das variáveis independentes X1 (aeração de 0,3 a 1,7 vvm) e X2 (agitação de 217 a 783 rpm) exercem influência na composição química da goma xantana obtida da fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, com teor de glicose variando de 0,00 a 478,86 mg.L⁻¹, manose de 172,60 a 390,26 mg.L⁻¹, ácido glucurônico de 45,15 a 136,45 mg.L⁻¹ e ácido pirúvico variando de 27,90 a 169,74 mg.L⁻¹, dependendo das condições utilizadas no processo fermentativo.

Os cromatogramas mostrados na Figura 15 referem-se aos padrões de glicose, manose, ácido glucurônico e ácido pirúvico, separados por CLAE. A composição das gomas obtidas nos 11 ensaios deste estudo (Tabela 3) foi quantificada usando curvas de calibração construídas a partir da área do pico do padrão *versus* concentração (mg.L⁻¹), mostradas na Tabela 10.

Capítulo 5 – Resultados e discussão

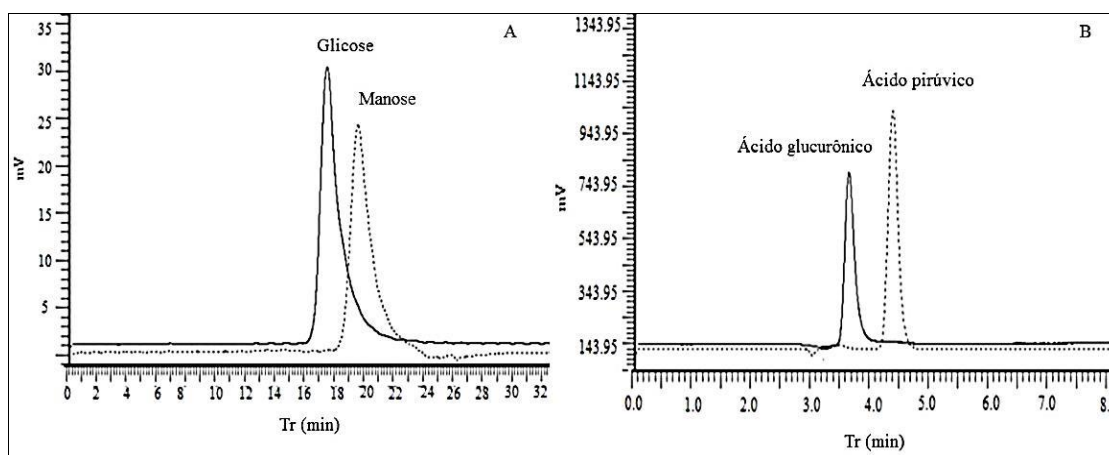


Figura 15. Cromatogramas dos padrões de açúcares (glicose e manose) separados por CLAE-IR (A); e dos padrões de ácidos (glucurônico e pirúvico) separados por CLAE-UV (195 nm) (B).

A composição química das gomas xantana obtidas no planejamento foi determinada em função das concentrações de glicose (Y4), manose (Y5), ácido glucurônico (Y6) e ácido pirúvico (Y7) (Figuras 16 e 17). As respostas destas variáveis independentes ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) são apresentados na Tabela 3.

Tabela 10. Equações da regressão linear obtidas da relação entre concentração e área dos picos dos padrões de açúcares e ácidos urônicos.

Monômero (mg/L)	Equação da reta	R ²
Glicose (Y4)	$Y4 = 3,323 \times 10^{-6} x (\text{área do pico}) - 0,037$	0,987
Manose (Y5)	$Y5 = 2,25 \times 10^{-6} x (\text{área do pico}) + 0,015$	0,998
Ácido glucurônico (Y6)	$Y6 = 7,32 \times 10^{-4} x (\text{área do pico}) - 0,035$	0,998
Ácido pirúvico (Y7)	$Y7 = 5,676 \times 10^{-4} x (\text{área do pico}) - 0,132$	0,999

Os efeitos das variáveis sobre todas as respostas foram calculados a 95% de confiança e sumarizados na Tabela 11. A análise desses resultados indica que a agitação quadrática teve efeitos nas concentrações de glicose e de ácido pirúvico das gomas xantana ($p < 0,05$), enquanto que a agitação linear teve efeito apenas na concentração de manose. O parâmetro linear da aeração demonstrou efeito na concentração de glicose e manose ($p < 0,05$) e o quadrática apenas na concentração de manose ($p < 0,05$).

Capítulo 5 – Resultados e discussão

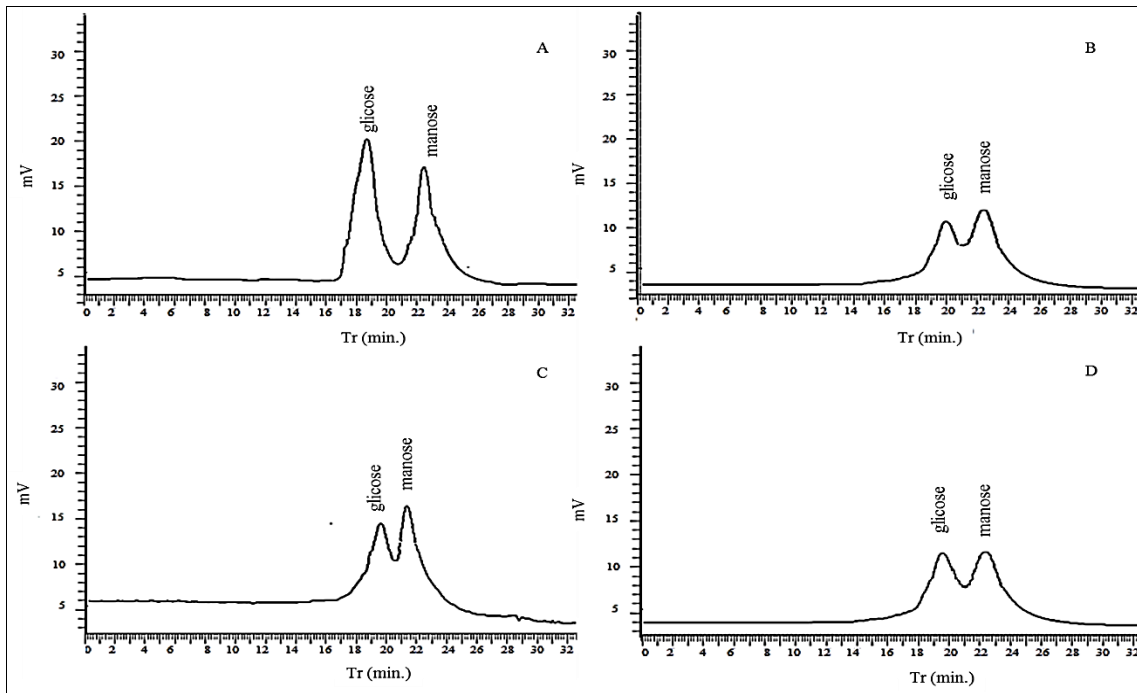


Figura16. Cromatograma (CLAE-IR) da composição de açúcares das gomas xantana obtidas no ponto central (A); nos níveis máximos de aeração e agitação (1,5 vvm e 700 rpm) (B); nos níveis mínimos (0,5 vvm e 300 rpm) (C) e da goma xantana Sigma (D).

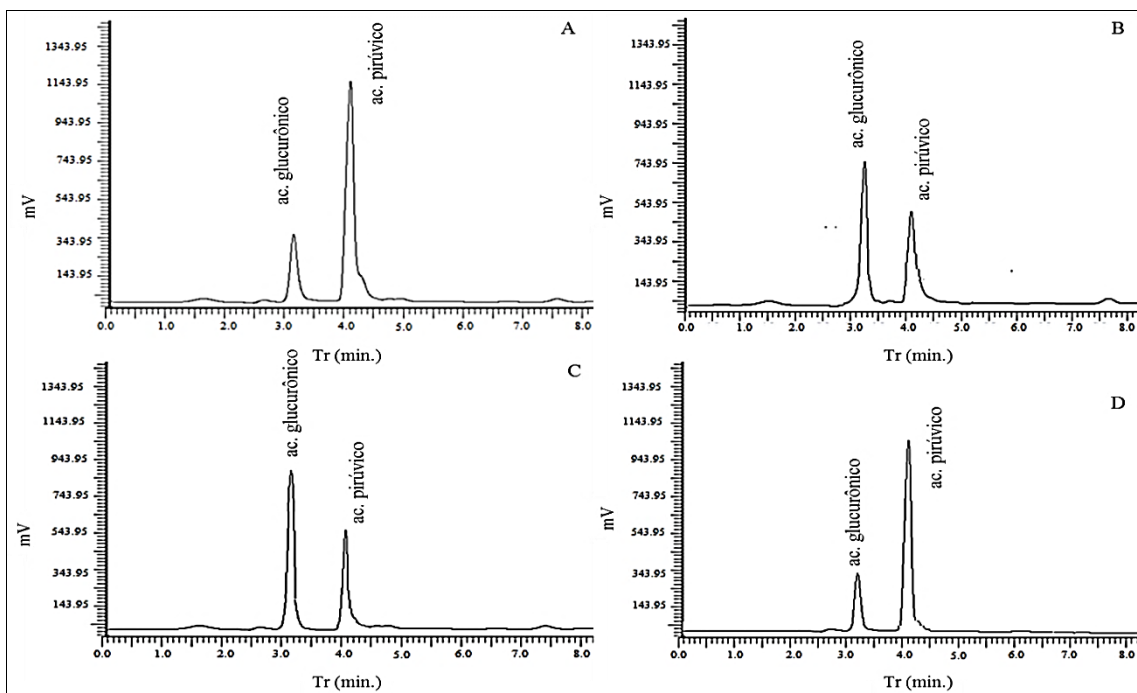


Figura 17. Cromatograma da composição de ácidos das gomas xantana obtidas no ponto central (A); nos níveis máximos de aeração e agitação (1,5 vvm e 700 rpm) (B); nos níveis mínimos (0,5 vvm e 300 rpm) (C); e da goma xantana Sigma (D).

Capítulo 5 – Resultados e discussão

O sinal dos coeficientes isolados de X1 e X2 para Y4 (Tabela 11) indica que o aumento na aeração ou a diminuição da velocidade de agitação confere ao polímero maior concentração de glicose. Esse comportamento foi constatado ao manter a velocidade de agitação a 500 rpm e aumentar a aeração de 0,3 vvm (Ensaio 5) para 1,5 vvm (Ensaio 6), que resulta em um acréscimo de 100% da concentração de glicose do polímero (Tabela 3), porém para os demais casos não se aplica. Ao manter a agitação em 300 rpm e alterar a aeração de 0,5 vvm (Ensaio 1) para 1,5 vvm (Ensaio 3), constata-se uma redução de 19,87 % no teor de glicose da cadeia polimérica. Quando mantida a 700 rpm, a mesma alteração na aeração (do Ensaio 2 para Ensaio 4) levou a um decréscimo de 50,04 % no teor de glicose da cadeia. Assim, o aumento da taxa de aeração, sob agitação constante, confere redução na concentração de glicose, indicando, portanto, que a aeração tem efeito negativo sobre a concentração de glicose.

Com relação ao efeito da agitação, nota-se que ao manter a aeração em 0,5 vvm e alterar a agitação de 300 (Ensaio 1) para 700 rpm (Ensaio 2), ocorre um pequeno acréscimo de 3,62 % no teor de glicose, por outro lado, ao manter a aeração de 1,5 vvm e alterar a agitação de 300 rpm (Ensaio 3) para 700 rpm (Ensaio 4) constata-se um acréscimo significativo de 35,3 % no teor de glicose da cadeia polimérica. Portanto, o uso de baixas velocidades de agitação na fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 induz a produção de xantana com maiores teores de glicose (Tabela 3).

Tabela 11. Estimativa de efeitos para composição em termos de Y4, Y5, Y6 e Y7.

Termo		Constante	X1	X1*X1	X2	X2*X2	X1*X2	R ²
Y4	Coefficiente	348,12	125,36	-115,68	-2,38	-155,65	-39,23	0,447
	p-valor	0,001	0,05	0,07	0,94	0,01	0,44	
Y5	Coefficiente	265,95	-142,83	279,14	104,36	-77,59	-38,20	0,759
	p-valor	0,01	0,03	0,01	0,05	0,14	0,43	
Y6	Coefficiente	100,13	32,84	11,69	-9,72	-26,12	-49,25	0,548
	p-valor	0,03	0,28	0,70	0,71	0,43	0,26	
Y7	Coefficiente	143,59	-29,28	-51,56	-8,71	-110,11	23,64	0,789
	p-valor	0,01	0,25	0,14	0,67	0,03	0,45	

Y4= teor de glicose; Y5= teor de manose; Y6= teor de ácido glucurônico; Y7= teor de ácido pirúvico.

Capítulo 5 – Resultados e discussão

Os maiores teores de glicose foram encontrados para as gomas xantana sintetizadas sob 500 rpm de agitação, sendo o máximo (478,86 mg.L⁻¹), obtida com a 1,5 vvm (Ensaio 6), seguida das produções a 1,0 vvm (ponto central). Porém, no ensaio 5 (500 rpm e 0,3 vvm) não foi encontrado glicose. O evento pode estar associado à limitação de oxigênio do meio fermentativo, o que confirma a influência da aeração no teor de glicose da cadeia polimérica da xantana.

O sinal dos coeficientes isolados X1 e X2 para a resposta Y5, mostrados na Tabela 11, indica que a diminuição na taxa de aeração ou o aumento na velocidade de agitação proporciona ao polímero maior teor de manose na cadeia polimérica. A análise pode ser confirmada ao observar o aumento de 26,17 % na resposta Y5 ao manter a aeração em 0,5 vvm e alterar a agitação de 300 rpm (Ensaio 1) para o 700 rpm (Ensaio 2), assim como o aumento de 11,01 % ao manter 1,5 vvm com a mesma alteração da agitação (do Ensaio 3 para o ensaio 4). Com relação ao efeito da aeração, nota-se uma redução de 27,80 % e 40,07 % na resposta Y5 ao manter a agitação em 300 rpm (Ensaio 1) e alterar a aeração de 0,5 vvm (Ensaio 3), e uma redução de 40,70 % no teor de manose da cadeia polimérica ao manter 700 rpm e alterar a aeração de 0,5 vvm (Ensaio 2) para 1,5 vvm (Ensaio 4) (Tabela 3).

Contrário ao que afirma Moreira *et al* (2001), neste estudo a teor de manose da cadeia polimérica não apresentou correlação com a viscosidade das soluções poliméricas.

As maiores concentrações de manose foram encontradas nas gomas xantana sintetizadas a 500 rpm. A máxima concentração ocorreu na fermentação conduzida a 0,3 vvm de aeração (750,12 mg.L⁻¹), seguida da fermentação conduzida a 1,7 vvm (513,31 mg.L⁻¹). No entanto a utilização de 1,0 vvm (ponto central) reduziu em mais de 50 % a concentração de manose da cadeia da xantana (Tabela 3). Estes resultados podem indicar que mesmo não sendo significativo a 95 % de confiança, as variáveis X1 e X2 apresentam efeito de interatividade na composição do polímero.

Os coeficientes calculados para as concentrações de ácido glucurônico (Y6) dos polímeros (Tabela 3) estão reportados na Tabela 11 e indicam que, a 95 % de confiança, as variáveis X1 e X2, bem como suas interações, não apresentaram efeitos sobre a resposta Y6. Porém a análise dos dados para esta resposta (Tabela 3) permite traçar tendências a respeito das influências das variáveis independentes X1 e X2 em Y6. Observa-se que ao manter a taxa de aeração constante a 0,5 vvm e variar a velocidade de agitação do mínimo nível (300 rpm, Ensaio 1) para o máximo nível (700 rpm, Ensaio

Capítulo 5 – Resultados e discussão

2) ocorre uma redução de 67,16 % na resposta Y6. O mesmo efeito foi observado ao fixar a taxa de aeração a 1,5 vvm, porém a redução foi de apenas 5,32 % na resposta Y6. Estas observações levam a concluir que, isoladamente, o uso de baixas velocidades de agitação no processo fermentativo resulta em maiores concentrações de ácido glucurônico da cadeia polimérica da goma xantana obtida da fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103.

O sinal do coeficiente isolado X2 (velocidade de agitação) para o teor de ácido pirúvico (Y7) (Tabela 11), indica que o uso de baixas agitações no processo fermentativo favorece o aumento da concentração de ácido pirúvico da cadeia polimérica da goma xantana. A estimativa partiu da análise dos resultados de Y7 (Tabela 3), na qual se observa uma redução de 61,22 % ao manter a aeração em 0,5 vvm e variar a agitação do mínimo nível (300 rpm) para o máximo nível (700 rpm). O mesmo efeito é constatado para manutenção constante da aeração em 1,5 vvm, porém com menor redução na resposta Y7 (7,48 %).

As máximas concentrações de ácido pirúvico foram encontradas nas gomas xantana sintetizadas a 500 rpm (Tabela 3), sendo a máxima ($169,74 \text{ mg.L}^{-1}$) obtida com 1,0 vvm (ponto central), seguida da obtida com 0,3 vvm (149 mg.L^{-1} , Ensaio 5). Porém a xantana produzida com a mesma agitação e excesso de oxigênio (1,7 vvm) apresentou baixa concentração de ácido pirúvico ($51,98 \text{ mg.L}^{-1}$, Ensaio 6). Na Tabela 3, ainda se observa que as mínimas concentrações de ácido pirúvico estão associadas às condições extremas de agitação (217 e 783 rpm, Ensaios 7 e 8). Psomas *et al.* (2007) relatam um aumento de apenas 0,5 % no grau de piruvatação ao variar a agitação de 100 rpm para 350 rpm e de 0,2 % ao passar de 350 para 600 rpm.

A influência da agitação no grau de piruvatação de goma xantana também foi observada por Psomas *et al.* (2007) e Papagianni *et al.* (2001). De acordo com os autores, maiores agitações levam a maiores grau de piruvatação. Entretanto, Cadmus *et al.* (1978) não observaram influência a taxa de agitação sobre o teor de ácido pirúvico dos polímeros.

O sumário da análise de variância para os dados de Y4, Y5, Y6 e Y7, apresentados na Tabela 12, mostra que os seus respectivos modelos empíricos (Equações 10, 11, 12 e 13) apresentam valores de $R^2 < 0,8$, indicando, portanto, que os modelos não foram devidamente ajustados aos dados experimentais, e que mais de 20% do total das variações não podem ser explicadas pelos modelos propostos. Além disso, os valores de F calculados das regressões foram respectivamente, 39,22; 9,52; 24,69 e

Capítulo 5 – Resultados e discussão

7,98 vezes menores que os valores de F tabelados das regressões e, portanto, os modelos não são preditivos à 95% de confiança.

Tabela 12. Sumário da análise de variância para avaliação estatística do modelo para os dados de composição das gomas xantana em termos do teor de glicose (Y4), manose (Y5), ácido glucurônico (Y6) e ácido pirúvico (Y7).

Fator		Y4	Y5	Y6	Y7
	R²	0,44	0,76	0,55	0,79
Regressão	F calculado	0,51	2,10	0,81	2,51
	F tabelado	5,05			
Falta de ajuste	F calculado	0,06	0,06	0,53	0,34
	F tabelado	19,16			

$$Y4 = 348,123 + 62,682X1 - 57,841X1^2 - 1,192X2 - 77,824X2^2 - 19,612X1X2 \quad (\text{Eq.13})$$

$$Y5 = 265,944 - 71,412X1 + 139,568X1^2 + 52,184X2 - 38,798X2^2 - 19,100X1X2 \quad (\text{Eq.14})$$

$$Y6 = 100,132 + 16,422X1 + 5,847X1^2 - 4,861X2 - 13,057X2^2 + 24,624X1X2 \quad (\text{Eq.15})$$

$$Y7 = 143,597 - 14,638X1 - 25,779X1^2 - 4,354X2 - 55,054X2^2 + 11,82X1X2 \quad (\text{Eq.16})$$

Assim, as variáveis independentes lineares (X1 e X2) e quadráticas (X1² e X2²), não foram suficientes para descrever precisamente as respostas Y4, Y5, Y6 e Y7 e/ou suas faixas de variação não foram adequadas, sendo possível apenas descrever suas tendências.

Mesmo que pequenas, as alterações na composição dos carboidratos do polímero são frequentemente dependentes do microrganismo e dos componentes do meio utilizado para a produção (LINDEN; LORIENT, 1996).

Em 10 dos 11 ensaios do planejamento foram identificados glicose, manose, ácido glucurônico e ácido pirúvico nos biopolímeros obtidos da fermentação de GRB por *Xanthana campestris mangiferaeindicae* 2103. Segundo Padilha (2003), esta composição é a mais comumente encontrada nas gomas xantana produzidas por cepas de *Xanthomonas campestris*.

A Tabela 13 mostra a fração molar para a composição dos 11 biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 a partir da fermentação de GRB. A composição dos polissacarídeos obtidos a 500 rpm e 1,0 vvm (Figuras 16-A e 17-A) apresentam estrutura primária constituída de repetidas unidades

Capítulo 5 – Resultados e discussão

heptassacarídicas composta por aproximadamente 3 unidades de glicose, 3 unidades de manose e 1 unidade de ácido glucurônico, além de 2 unidades do substituinte ácido pirúvico. Diferentemente da composição da goma xantana sigma, que apresentou glicose, manose, ácido glucurônico e ácido pirúvico na proporção de 2,2:0,9:1,0:1,2, e diferente também dos polímeros obtidos nos níveis máximos de aeração e de agitação (Ensaio 4) (Figura 16-B e 17-B) e níveis mínimos (Ensaio 1) (Figuras 16-C e 17-C), que apresentam glicose, manose e ácido glucurônico e ácido pirúvico na proporção de 1,1:2,0:1,0:0,5 e 1,8:2,1:1,0:0,5, respectivamente. Lesley; Hochster (1959) analisaram a composição do biopolímero produzido pela fermentação de sacarose por *Xanthomonas phaseoli* e constataram a presença de D-glicose, D-manose e D-ácido glucurônico, na proporção de 1:1:1. Sloneker e Jeanes (1962) relatam para goma xantana obtida da fermentação sacarose por *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 a presença de D-glicose, D-manose, D-ácido glucurônico, ácido acético e ácido glucurônico, na proporção de 2,8:3,0:2,0:1,73:0,627. García-Ochoa *et al.* (2000) para goma xantana obtida da fermentação de glicose por *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 encontraram glicose, manose e ácido glucurônico na proporção de 2,8:2,0:2,0. A goma xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv *campestris* 646 ao fermentar sacarose, também foi avaliada por Shatwel; Sutherland; Ross-Murphy (1990) com presença de glicose, manose, ácido glucurônico e ácido pirúvico, na proporção de 9,13:8,18:5,41:1,0. Assim, pode-se concluir que a composição, bem como a proporção dos componentes, varia de acordo com o microrganismo produtor, substrato fermentescível e as condições do processo.

Tabela 13. Fração molar das gomas xantanas obtidas no planejamento experimental.

Ensaio	Glicose	Manose	Ácido glucurônico	Ácido pirúvico
1	1,8	2,1	1,0	0,5
2	5,6	8,6	1,0	0,6
3	1,8	1,9	1,0	0,5
4	1,1	2,0	1,0	0,5
5	0,0	10,5	1,0	2,1
6	3,6	3,8	1,0	0,4
7	3,8	3,6	1,0	0,9
8	2,7	4,6	1,0	0,5
PC	3,2	2,9	1,0	1,8

PC = ponto central

Capítulo 5 – Resultados e discussão

Borges e Vendruscolo (2008) também relatam que a concentração de ácido pirúvico pode variar a depender das condições do processo fermentativo. De acordo com Sandford (1979), o teor de ácido pirúvico pode ser usado como um indicador da qualidade reológica. As gomas xantana obtidas por fermentação de GRB em processo conduzido a 500 rpm apresentaram 15,43% de piruvato a 0,3 vvm (Ensaio 5); e 19,83%, 15,69% e 20,26% utilizando 1,0 vvm (pontos centrais). Estes valores são muito elevados comparados aos encontrados por Orentas; Sloneker; Jeanes (1963), Sandford *et al.* (1977); e Shatwell; Sutherland; Ross-Murphy (1990), que obtiveram valores máximos de 7,6%, 4,4% e 6,0%, respectivamente, usando *Xanthomonas campestris* para fermentar sacarose. Segundo Sandford (1979) gomas xantana com teor de ácido pirúvico maior que 4,0% exibem viscosidades maiores do que as com teores entre 0,5 e 3,0%. Neste sentido, foi verificado que as viscosidades aparentes (25°C e 25 s⁻¹) das soluções das gomas xantana a 0,5% (m/v) apresentam uma correlação direta com o teor de ácido pirúvico ($R^2 = 0,800$). Essa relação pode estar associada com a fonte de carbono utilizada neste trabalho e/ou com a formação de macromoléculas devido o alto teor de substituinte piruvato, promovendo assim, maior afinidade entre as cadeias do polímero (SMITH *et al.*, 1981).

5.4.5 Massa molecular (Y8)

A variação das variáveis independentes X1 (aeração de 0,3 a 1,7 vvm) e X2 (agitação de 217 a 783 rpm) exercem grande influência na produção de goma xantana com variação de 13,31x10⁶ Da a 27,79x10⁶ Da a depender das condições utilizadas no processo fermentativo.

A massa molecular das gomas xantana purificadas obtidas no planejamento experimental foi determinada a partir de separação por GPC CLAE-IR e estimada com auxílio da curva de calibração construída com as massas moleculares de padrões de dextranas nas mesmas condições cromatográficas. A curva linearizada do log MM *versus* Tr apresentou $R^2 = 0,97$ (Figura 18).

De acordo com a Figura 18 nota-se que a massa molecular tem uma relação inversa com o tempo de retenção. Assim, a menor massa molecular foi separada em 31,56 minutos e a maior massa molecular em 26,43 minutos. Porém as gomas xantana obtidas neste trabalho apresentaram Tr menores do que 26,43 minutos, indicando, portanto, massas moleculares muito maiores que 5,9 x 10⁶ Da (Figura 19, Tabela 3).

Capítulo 5 – Resultados e discussão

Segundo Mano (1985), as moléculas de alta massa molecular penetram nos poros da matriz da fase estacionária, passando rapidamente entre os espaços intersticiais, apresentando um menor tempo de retenção (Tr); diferentemente das moléculas de baixa massa molecular, que ao penetrarem os poros percorrem a coluna lentamente conferindo, portanto, um maior tempo de retenção.

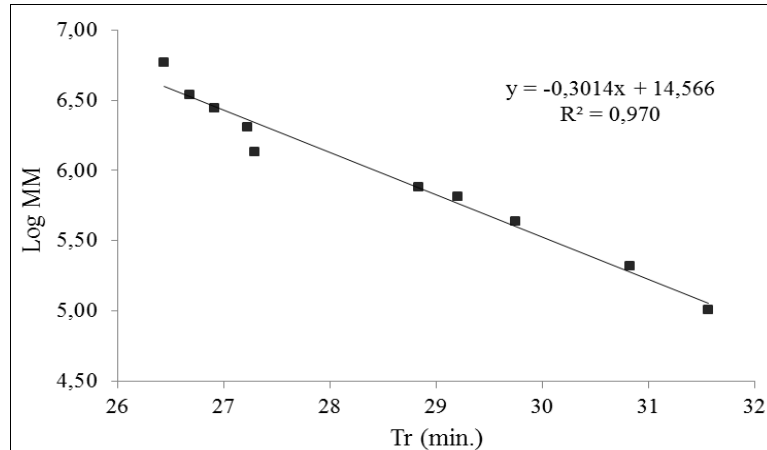


Figura 18. Curva de calibração (\log MM *versus* Tr) dos padrões de dextranas usados para a quantificação de massa molecular das gomas xantana.

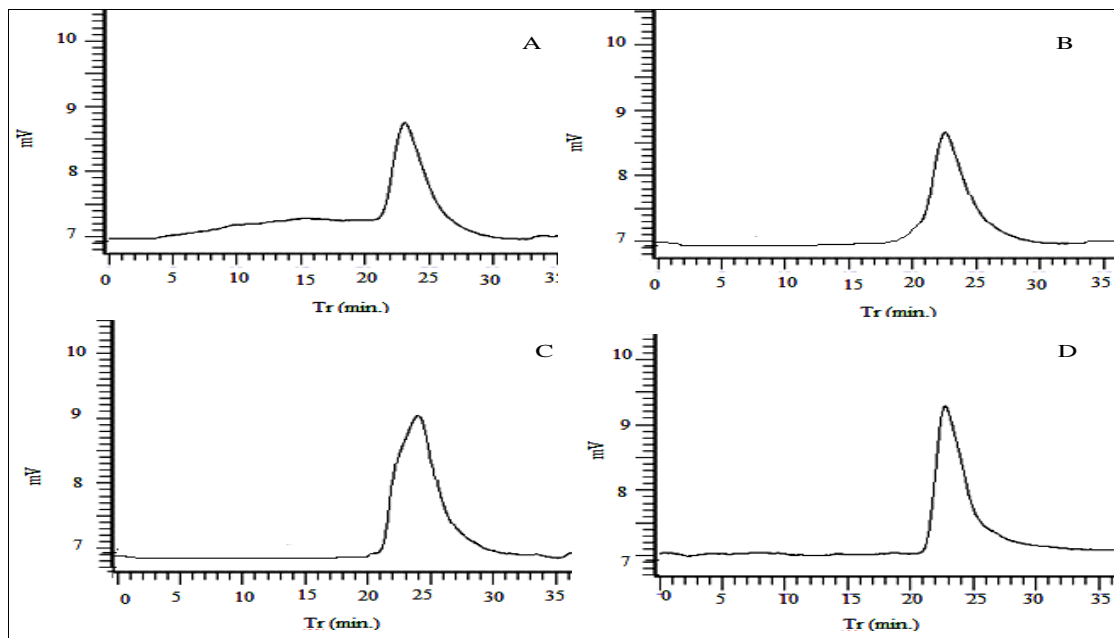


Figura 19. Cromatogramas da separação em GPC CLAE-IR das gomas xantana obtidas no ponto central (1,0 vvm e 500 rpm) (A); nos níveis mínimos de aeração e agitação (0,5 vvm e 300 rpm) (B); nos níveis máximos (1,5 vvm e 700 rpm) (C); e da goma xantana padrão (Sigma) (D).

Capítulo 5 – Resultados e discussão

A Tabela 14 traz os valores dos coeficientes calculados para a massa molecular das gomas xantana (Y8, Tabela 3). Verifica-se que, a 95% de confiança, apenas agitação linear teve influência significativa sobre a resposta Y8 ($p < 0,05$).

O sinal negativo do coeficiente X2 (Tabela 14) indica que o aumento na velocidade de agitação induz a produção de xantana com menores valores de massa molecular. Logo, fermentações conduzidas a baixas velocidades de agitação pode favorecer a produção de xantana com elevado valor de massa molecular. Segundo Psomas *et al.* (2007) a velocidade de agitação não tem influência sobre a massa molar da goma xantana.

Tabela 14. Estimativa de efeitos da aeração (X1) e agitação (X2) na massa molecular ponderada das xantanas obtidas (Y8).

Termo	Coefficiente	p-valor
Constante	26,883	0,001
X1	3,088	0,259
X1*X1	-7,087	0,081
X2	-6,478	0,050
X2*X2	-1,573	0,409
X1*X2	1,06	0,732

Os resultados de Y8, reportados na Tabela 3, indicam que, ao manter a taxa de aeração a 0,5 vvm e aumentar a velocidade de agitação de 300 rpm (Ensaio 1) para 700 rpm (Ensaio 2) ocorre uma redução de 49,37% na massa molecular ponderada do polímero. O mesmo comportamento ocorre ao passar do Ensaio 3 para o Ensaio 4, porém com redução de 41,01%. O aumento da velocidade de agitação empregada durante a fermentação de glicose por *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 foi avaliada por Peters *et al.* (1989). Os autores concluíram que a variável influenciou a massa molecular da xantana, alcançando $6,9 \times 10^6$ Da em 200 rpm e $8,6 \times 10^6$ Da em 800 rpm. Entretanto, Papagianni *et al.* (2001) não conseguiram correlacionar a massa molecular da xantana obtida da fermentação de glicose por *Xanthomonas campestris* ATCC 1395 com a velocidade de agitação utilizada durante a fermentação, obtendo 5×10^5 Da.

Capítulo 5 – Resultados e discussão

Embora não seja significativa a 95% de confiança, a aeração exerce efeito positivo sobre a resposta Y8. A observação é evidenciada ao aumentar a aeração de 0,5 vvm para 1,5 vvm mantendo a agitação a 300 rpm (Ensaio 1 para Ensaio3) e com agitação de 700 rpm (Ensaio 2 para Ensaio 4) (Tabela 3). Em ambos os casos, os polímeros produzidos apresentaram aumento da massa molecular. Neste caso, pode-se inferir que o uso de altas taxas de aeração pode proporcionar a produção de xantana obtida da fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 com elevada massa molecular.

A ANOVA para os dados de Y8, apresentados na Tabela 15, mostra que o modelo empírico proposto (Equação 17) apresenta valor de $R^2 < 0,8$, indicando, portanto, que o modelo não se ajusta devidamente aos dados experimentais, e que mais de 20% do total das variações não podem ser explicadas pelo modelo proposto. Além disso, o valor de F calculado da regressão foi 4,13 vezes menor que o valor de F tabelado da regressão. Portanto o modelo não é preditivo a 95% de confiança. Assim, as variáveis independentes lineares (X1 e X2) e quadráticas ($X1^2$ e $X2^2$), não foram suficientes para descrever precisamente as respostas Y8 e/ou suas faixas de variação não foram adequadas, sendo possível apenas descrever suas tendências.

Tabela 15. Análise de variância para a avaliação estatística do modelo referente massa molecular ponderada das gomas xantana obtidas da fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* (Y8).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	0,931	5	0,310	1,22	5,05
Resíduo	0,525	5	0,2624		
Falta de ajuste	0,478	3	0,159	3,830	19,16
Erro puro	0,046	2	0,023		
Total	1,455	10			
R²			0,649		

Resíduo = Falta de ajuste + erro puro

$$Y8 = 23,683 - 0,116X1 + 0,263X1^2 + 0,232X2 + 0,060X2^2 - 0,055X1X2 \quad (\text{Eq. 17})$$

Capítulo 5 – Resultados e discussão

García-Ochoa *et al.* (2000) afirmaram que a composição do meio fermentativo, a cepa de *Xanthomonas* e as condições operacionais causam impactos significativos na estrutura molecular das gomas xantana, produzindo polissacarídeos com massa molecular que podem variar de 2,0 a 20×10^6 Da. Assim, os diferentes valores encontrados para essa resposta, mostrados na Tabela 3 e Figura 19, podem estar associados a utilização da GRB como substrato, a bactéria utilizada e as condições operacionais selecionadas neste estudo. Os resultados ainda permitem afirmar que, entre os resultados do planejamento (Tabela 3), a fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 com 500 rpm e 1,0 vvm (ponto otimizado) origina goma xantana com massa molecular de $29,37 \times 10^6$ Da (23,55 min), sendo máxima com emprego de 1,0 vvm e 217 rpm ($27,79 \times 10^6$ Da) (23,63 min.), porém, ambos os resultados são inferiores à massa molecular da goma xantana Sigma ($49,44 \times 10^6$ Da) (22,8 min.), que é obtida em condições controlada de processo (escala industrial) a partir da fermentação de glicose.

Galindo, Salcedo; Ramirez (1994) reportaram que elevada massa molecular da goma xantana e a estrutura terciária conferem a solução aquosa deste polissacarídeo a propriedade de ser mais ou menos viscosa. Neste estudo a goma xantana com baixos valores de TR (maior massa molecular média) foi obtida com 1,0 vvm e 500 rpm (ponto otimizado), no qual foi verificado máxima viscosidade aparente (262,2 mPa.s).

5.4.6 Degradação térmica (Y9)

A variação das variáveis independentes X1 (aeração de 0,3 a 1,7 vvm) e X2 (agitação de 217 a 783 rpm) exercem grande influência na estabilidade térmica, de goma xantana obtida da fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, com variação de 194,22 a 226,45°C, dependendo das condições utilizadas no processo fermentativo.

Foram realizadas análises termogravimétricas não isotérmicas das gomas xantana resultantes, de acordo com o planejamento experimental (Tabela 3) e da goma xantana padrão (Sigma) (Figura 20).

Capítulo 5 – Resultados e discussão

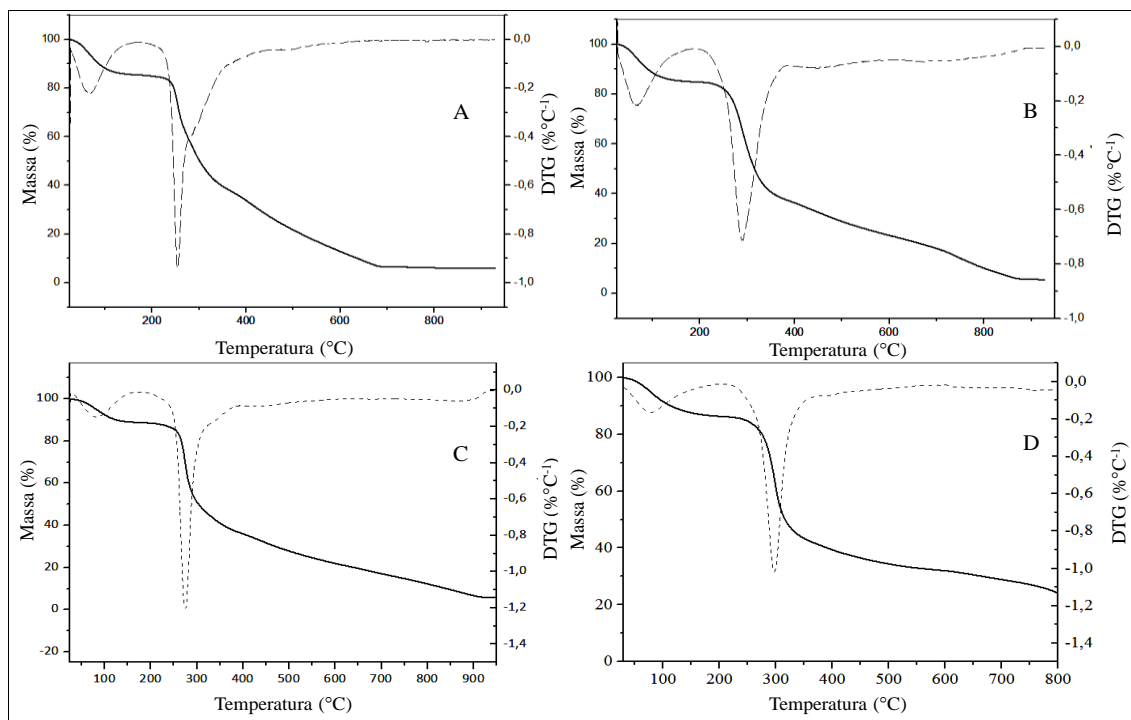


Figura 20. Cuvras de TG (—) e DTG (---) das gomas xantanas obtidas da fermentação de GRB no ponto central (1,0vvm e 500 rpm) (A); com as condições mínimas de aeração (0,5vvm) e agitação (300rpm) (B), com as condições máximas (1,5 vvm e 700 rpm) (C); e da Sigma (D).

A análise das curvas TG/dTG (Figura 20) mostram que as gomas xantana oriundas da GRB apresentam comportamento similar a curva da goma xantana padrão (Sigma), caracterizadas por dois eventos térmico. O primeiro evento térmico (24,80 – 68,71°C), (23,6 – 68,70°C), (22,5 – 82,6°C) e (21,8 – 78,50°C) ocorreu com perda de aproximadamente 15,70 %, 15,16 %, 12,05 % e 12,80 % de massa referente à desidratação das gomas xantana purificada e liofilizada produzidas no ensaio do ponto central (1,0 vvm e 500 rpm), nos níveis mínimos de aeração e agitação (0,5 vvm e 300 rpm), nos níveis máximos de aeração e agitação (1,5 vvm e 700 rpm) e da xantana Sigma (Tabela 3). De acordo com Faria *et al* (2011) a absorção de água pela goma xantana é devido a presença de grupos polares da estrutura, especialmente grupo OH. A presença de água nos polímeros liofilizados pode estar associada à rápida absorção de umidade durante a pesagem das amostras, uma vez que o processo de liofilização aumenta o caráter higroscópico do polímero.

O segundo evento (Figura 20) está relacionado com a perda de massa decorrente da degradação da cadeia polimérica da xantana (VILLETTI *et al.*, 2002; ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004). Assim, a goma xantana obtida da GRB no ensaio do ponto

Capítulo 5 – Resultados e discussão

central (1,0 vvm e 500 rpm) e a goma xantana Sigma degradaram no intervalo de 220,41 a 279,56°C e 200,71 a 299,60°C com perdas de massa em torno de 49,92 % e 47,30 % e máximas perdas em 252,95°C e 296,30°C, respectivamente. Assim, a goma xantana obtida no ponto otimizado apresenta maior estabilidade térmica do que a goma xantana Sigma, podendo, portanto, ser utilizada em processos que demandam altas temperaturas, como o de extrusão. As xantanas produzidas com os níveis mínimos de aeração (0,5 vvm e 300 rpm) e com os níveis máximos de aeração (1,5 vvm e 700 rpm) degradaram no intervalo de 198,14 a 292,32°C e de 216,38 a 274,6°C com perdas de massa correspondente a 48,63 % e 52,61 %, e perdas máximas em 291,12°C e 288,54, respectivamente.

ZOHURIAAN; SHOKROLAHI (2004) avaliaram eventos térmicos de gomas naturais e modificadas. A goma xantana comercial (Aldrich) apresentou no primeiro evento perda de massa de 8,7 % entre 30 e 91,3 °C. O segundo evento apresentou perda de massa de 41,6 % entre 251,5°C e 330,3°C com máxima perda em 290,8°C. As análises foram realizadas até 600 °C, em atmosfera inerte (N₂) com fluxo de 10 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 20°C.min⁻¹, apresentando portanto, similaridade com os resultados apresentados neste estudo.

Análises termogravimétricas de gomas xantana obtidas a partir de caldo de cana foram avaliadas por Faria *et al.* (2011). As análises revelaram que o biopolímero apresentou no primeiro evento perda de 15% de massa entre 30 e 140°C com máxima desidratação a 58°C, enquanto o segundo evento, referente à perda de mais de 40% do polímero, ocorreu entre 220 e 320°C com máxima decomposição em 283°C. A análise foi realizada com taxa de aquecimento de 20 °C.min⁻¹ sob uma atmosfera de N₂ a um fluxo de 30 mL.min⁻¹ até 600°C.

A fim de se investigar os possíveis efeitos da aeração (X1) e da agitação (X2) sobre a termorresistência das xantanas obtidas, foram avaliadas como respostas, as temperaturas inicial da degradação térmica (Y9) dos polímeros obtidos nos 11 ensaios (Tabela 3).

As estimativas dos efeitos realizadas a 95% de confiança compõe a Tabela 16, na qual se observa que apenas a aeração quadrática apresentou efeito significativo sobre a resposta Y9 ($p < 0,05$). Tomando como base os dados da Tabela 3 e o sinal do coeficiente de X2 na Tabela 16, conclui-se que o incremento da aeração induz a produção de goma xantana com maior resistência á degradação térmica. Os resultados mostram que ao variar a taxa de aeração do nível mínimo (0,3 vvm) para o nível

Capítulo 5 – Resultados e discussão

máximo (1,5 vvm) e mantendo a agitação em 300 rpm, ocorre um acréscimo de 5,41 % na temperatura inicial de degradação térmica. O mesmo efeito ocorre ao manter a agitação em 700 rpm, porém com aumento de 3,65 %.

Tabela 16. Estimativa de efeitos da aeração (X1) e agitação (X2) na temperatura inicial de degradação térmica (Y9) das xantanas obtidas da fermentação de GRB.

Termo	Coefficiente	p-valor
Constante	221,661	0,001
X1	8,403	0,109
X1*X1	18,995	0,034
X2	2,035	0,572
X2*X2	-14,930	0,060
X1*X2	-1,665	0,731

Embora a agitação não tenha efeito significativo a 95% de confiança ($p > 0,05$), percebe-se que, mantendo a aeração constante, a variação da agitação do nível mínimo (300 rpm) para o nível máximo (700 rpm) resultou em um aumento na temperatura inicial de degradação térmica. Portanto, o aumento individual da taxa de aeração ou da velocidade de agitação pode favorecer a produção de goma xantana com maior estabilidade térmica.

A ANOVA para os dados de Y9, apresentados na Tabela 17, mostram que o modelo empírico proposto (Equação 18) apresentou valor de $R^2 < 0,8$, indicando, portanto, que o mesmo não foi bem ajustado aos dados experimentais, e que mais de 20% do total das variações não podem ser explicadas pelo modelo proposto.

Tabela 17. Análise de variância para avaliação estatística do modelo referente à temperatura inicial de degradação térmica (Y9).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	796,582	5	265,527	2,436	5,05
Resíduo	217,963	5	108,981		
Falta de ajuste	180,925	3	60,308	3,256	19,16
Erro puro	37,038	2	18,519		
Total	1014,546	10			
R^2			0,785		

Capítulo 5 – Resultados e discussão

$$Y9 = 221,662 + 4,201X1 - 9,497X1^2 + 1,017X2 - 7,465X2^2 - 0,832X1X2 \quad (\text{Eq. 18})$$

O valor de F calculado da regressão foi 2,1 vezes menor que o valor de F tabelado da regressão. Portanto o modelo não é preditivo a 95% de confiança (Tabela 17). Assim, as variáveis independentes lineares ($X1$ e $X2$) e quadráticas ($X1^2$ e $X2^2$), não foram suficientes para descrever precisamente as respostas $Y9$, e/ou suas faixas de variação não foram adequadas, sendo possível apenas descrever suas tendências.

5.5 Cinética da produção de goma xantana a partir da fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103

O estudo cinético e avaliação dos seus parâmetros foram realizados com os dados obtidos nas condições ótimas de aeração (0,97 vvm) e agitação (498 rpm) para produção de goma xantana a partir da fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103.

O consumo de substrato (S) ao longo do processo fermentativo foi determinado através da curva de calibração construída a partir das áreas dos picos da GRB *versus* concentração de GRB separada por GPC CLAE-IR, que gerou a equação $S = (\text{área do pico} - 1972,3) / 33550$, obtida da regressão linear dos dados com $R^2=0,989$.

A Figura 21 mostra a separação da GRB antes da fermentação, após 72 h e depois de 120 horas de fermentação por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103.

A Figura 22 apresenta a evolução da biomassa (X), formação de produto (P) e consumo de substrato (S) ao longo das 120 horas de fermentação. Os perfis apresentados nesta figura revelam que as curvas referentes à formação de biomassa e produto exibem forma sigmoideal ascendente, enquanto a que se refere ao consumo de GRB foi decrescente.

Para maiores esclarecimentos a cerca do processo fermentativo, envolvendo a utilização de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, foram calculados os seguintes parâmetros: fator de conversão substrato-biomassa ($Y_{x/s}$), produto-biomassa ($Y_{x/p}$) e substrato-produto ($Y_{p/s}$); velocidade instantânea do consumo de substrato (r_s), da formação de biomassa (r_x) e da formação de produto (r_p); e velocidades específicas de consumo de substrato (μ_s) de formação de biomassa (μ_x) e de formação de produto (μ_p), mostrados na Tabela 18.

Capítulo 5 – Resultados e discussão

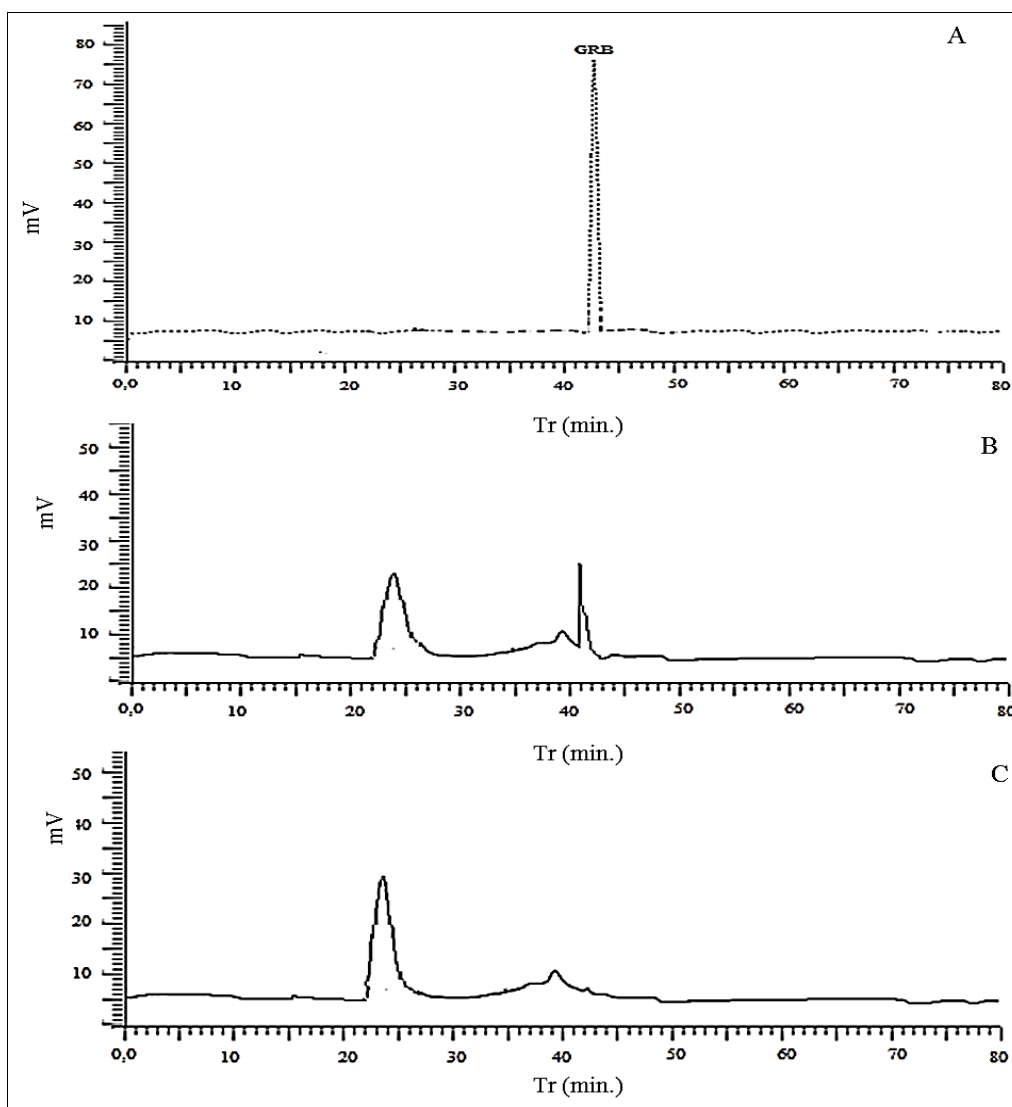


Figura 21. Cromatograma (GPC CLAE-IR) da solução aquosa de GRB a 2,0 % (m/v) antes da fermentação (A); após 72h (B); e após 120 horas de fermentação (C).

As curvas em paralelo aos dados da Tabela 18 mostram que até 48h de fermentação houve crescimento acentuado da biomassa, evidenciado pela máxima velocidade instantânea (r_x), que foi $0,049 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$). A partir de 48 horas de fermentação a formação de biomassa continuou ascendente, porém com decréscimo de velocidade instantânea (r_x), atingindo o mínimo em 120 h ($0,024 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$), que corresponde a metade da velocidade alcançada em 48 h. Possivelmente, o decréscimo na velocidade pode estar associado à passagem para a fase estacionária de crescimento bacteriano.

Capítulo 5 – Resultados e discussão

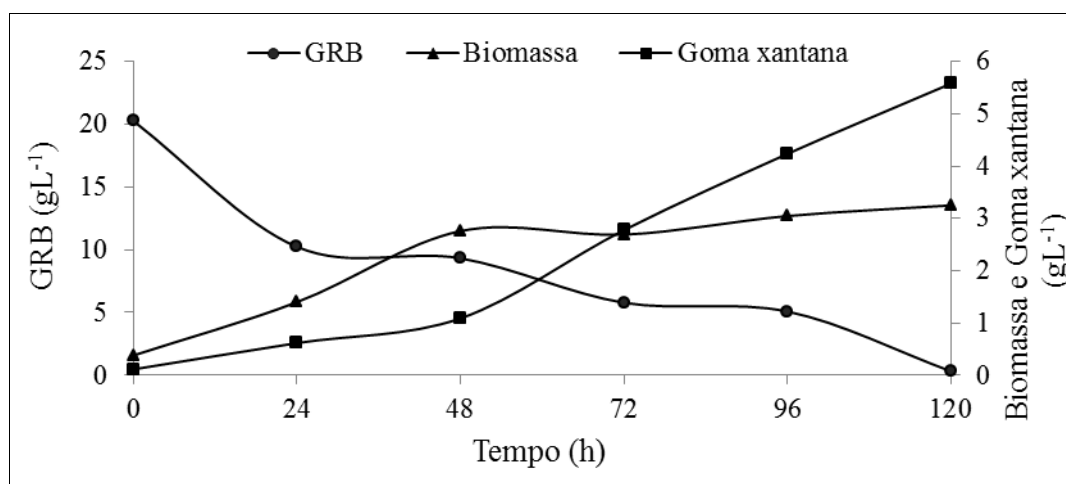


Figura 22. Acompanhamento do consumo de substrato e formação de biomassa e produto purificado ao longo de 120 horas de fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103.

Tabela 18. Parâmetros cinéticos obtidos ao longo de 120 de fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 nas condições ótimas de aeração e agitação (1,0 vvm, 500 rpm, 3,0 L de volume útil).

Parâmetros	Tempo de fermentação					
	inicial	24	48	72	96	120
S (gL⁻¹)	20,27	10,23	9,32	5,78	5,08	0,30
X (gL⁻¹)	0,380	1,400	2,760	2,690	3,047	3,250
P (gL⁻¹)	0,113	0,617	1,090	2,780	4,240	5,583
Y_{x/s}	0,00	0,102	0,217	0,159	0,176	0,144
Y_{x/p}	0,000	0,050	0,089	0,184	0,272	0,274
Y_{p/s}	0,000	2,026	2,437	0,866	0,646	0,525
r_s (gL⁻¹h⁻¹)	0,000	0,418	0,228	0,201	0,158	0,166
r_x (gL⁻¹h⁻¹)	0,000	0,043	0,049	0,032	0,028	0,024
r_p (gL⁻¹h⁻¹)	0,000	0,021	0,020	0,037	0,043	0,046
μ_s (h⁻¹)	0,387	0,155	0,044	0,062	0,028	0,011
μ_x (h⁻¹)	0,112	0,035	0,010	0,000	0,000	0,000
μ_p (h⁻¹)	0,009	0,010	0,016	0,023	0,000	0,000

X = Biomassa; S = Substrato; P = Produto; Y_{X/S} = Fator de conversão substrato-biomassa; Y_{X/P} = Fator de conversão produto-biomassa; Y_{P/S} = Fator de conversão substrato-produto; r_S = Velocidade instantânea de consumo de substrato; r_X = Velocidade instantânea de formação de biomassa, r_P = Velocidade instantânea de formação de produto; μ_X = velocidade específica de formação de biomassa; μ_S = velocidade específica de consumo de substrato.

Capítulo 5 – Resultados e discussão

Com relação à formação de produto (P) (Tabela 18), nota-se que foi mais acentuada após 48h ($1,09 \text{ g.L}^{-1}$), atingindo o máximo em 120 h ($5,583 \text{ g.L}^{-1}$). Ao longo desse período (48-120h) foram consumidos 98,52 % do total de substrato. No entanto, o comportamento da curva P leva a compreender que, nas primeiras 48h o consumo foi mais direcionado ao crescimento celular e após esse período, mais direcionado à formação de produto. Ao analisar a evolução das velocidades instantâneas r_x e r_p , observa-se que, até 48h de fermentação, a r_p ($0,020 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi mais de duas vezes menor que a r_x ($0,049 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$); por outro lado, entre 48 e 120h ocorreu decréscimo de 51,02 % em r_x contra um acréscimo de 56,52 % em r_p .

WOICIECHOWKI (2001) afirma que baixos valores de ($Y_{X/S}$) indicam que mais substrato estará disponível para formação de produto. Portanto, para formação de produto, quanto menor o coeficiente ($Y_{X/S}$) melhor será o processo. Os dados referentes a esses fatores (Tabela 18) mostram que houve uma evolução desses valores, com máximo em 48h (0,217). A partir desse momento ocorreu decréscimo dos valores de $Y_{X/S}$ com mínimo em 120h (0,144).

O fator de conversão $Y_{X/S}$ obtido neste estudo, ao final da fermentação (0,144), é considerado baixo, quando comparado aos valores obtidos pela fermentação da sacarose por cepas de *Xanthomonas campestris*, por outros autores. Serrano-Carreon *et al.* (1998) obtiveram 0,33, Letisse *et al.* (2001) 0,31, Pinches e Pallent (1986) 0,81 e Weiss e Ollis (1980) 0,50, porém, maior do que os valores encontrados por Rottava (2005) e García-Ochoa *et al.* (2000) de 0,04 e 0,07, respectivamente.

Ao final do processo, o fator de conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$ foi em torno de 3,6 vezes maior que o fator de conversão de substrato em biomassa. Esta observação mostra que *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, utilizada nas condições deste estudo, apresenta excelente capacidade de utilizar a GRB para a síntese de goma xantana.

O valor do coeficiente $Y_{P/S}$ obtido em 120 h de fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 (0,525) foi superior ao relatado por Ramos (2011), que obteve 0,262 utilizando *Xanthomonas campestris* XC02 para fermentar efluente da indústria de petróleo e por Rottava (2005), que obteve 0,422 utilizando *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (68-07) para fermentar sacarose.

Os comportamentos relativos das funções $\mu = \mu(t)$, mostradas na Figura 23 e Tabela 18 fornecem a base para classificação dos processos fermentativos, proposto por Gaden (1955).

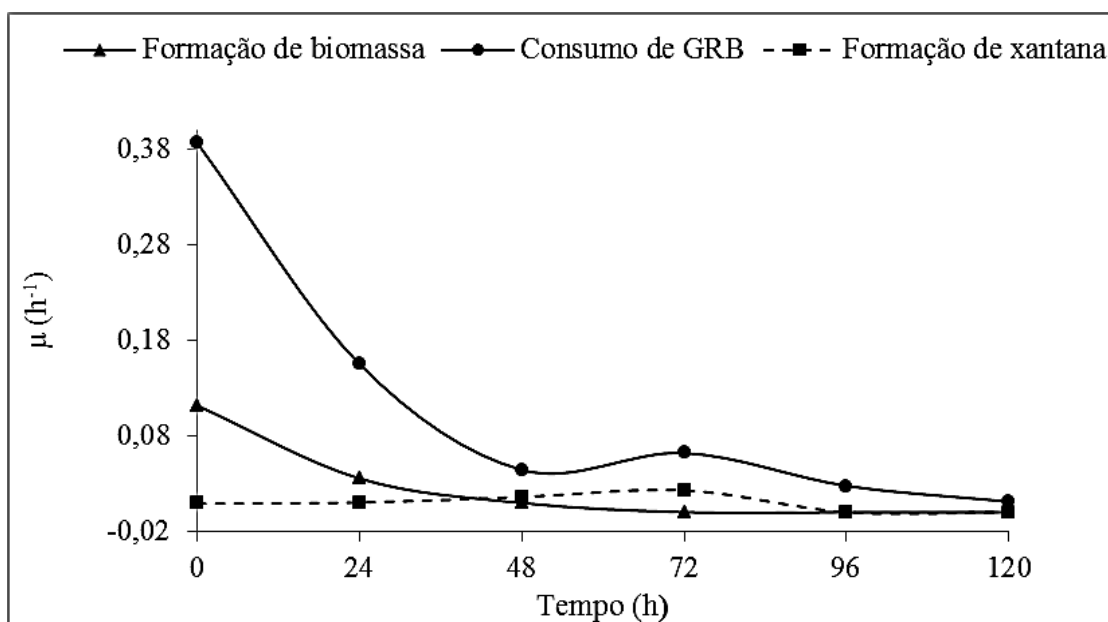


Figura 23. Estimativa do tipo de processo fermentativo baseado no comportamento das velocidades específicas (μ) ao longo de 120 de fermentação.

Os perfis das velocidades específicas de consumo de GRB (μ_s), produção de goma xantana (μ_p) e formação de biomassa (μ_x) revelam que, no início do processo a velocidade específica de consumo de GRB está diretamente relacionada à velocidade de formação de biomassa, não havendo praticamente produção de goma xantana; após 48h de fermentação, observa-se uma melhor correlação entre os perfis das três velocidades específicas. De acordo com Garden (1955), esses perfis são típicos de fermentações em que a formação de produto está parcialmente associada ao crescimento bacteriano. Além disso, sua formação não está diretamente ligada ao caminho metabólico produtor de energia.

5.6 Influência da natureza e concentração de sais na viscosidade aparente da goma xantana produzida nas condições otimizada

Neste estudo foi utilizada a goma xantana purificada, produzida por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 a partir da fermentação de GRB com 1,0 vvm de aeração e 500 rpm de agitação, uma vez que esta foi a combinação otimizada para a máxima viscosidade aparente a 0,5% (m/v) do biopolímero. As avaliações foram baseadas nas medidas da viscosidade de soluções aquosa e salinas

Capítulo 5 – Resultados e discussão

(KCl, CaCl₂ e FeCl₃) de goma xantana a 0,5 % (m/v) em diferentes temperaturas. As soluções salinas foram preparadas a 0,1 e 0,01 % (m/v) de cada sal. Os índices de consistência (*K*) e fluxo (*n*) foram obtidos através do ajuste dos dados ao modelo de Ostwald-de-Waele com R² superior a 0,98, em todos os casos.

Os resultados da Tabela 19 mostram que a adição de KCl resulta na diminuição da viscosidade aparente das soluções de xantana em todas as temperaturas. A 25°C a adição de 0,1 % e 0,01 % de KCl causa uma redução de viscosidade em torno de 14,35 % e 19,65 % em relação a solução de xantana sem sal, respectivamente; enquanto a 85°C a redução foi menos acentuada, 4,88 % e 9,65 %, respectivamente.

Mesmo configurando redução na viscosidade em relação à goma xantana sem sal, a adição de CaCl₂ apresentou menores efeitos na viscosidade quando comparada com a adição de KCl. A 25°C solução com 0,1% e 0,01% de CaCl₂ causou uma redução em torno de 6,96% e 12,26% em relação a xantana sem sal (controle), respectivamente. Contudo, a 85°C a adição de CaCl₂ a 0,1 e 0,01% apresentou redução de 12,93% e 13,94%.

Tabela 19. Influências de sais mono, bi e trivalente, em diferentes concentrações, na viscosidade aparente da goma xantana oriunda da GRB nas condições ótimas.

Saís (%)			Viscosidade aparente (mPas)*			
K ⁺	Ca ⁺²	Fe ⁺³	25°C	45°C	65°C	85°C
0	0	0	254,56	214,76	156,65	135,83
	0,1		218,02	183,94	138,62	129,19
	0,01		204,53	170,17	129,03	122,72
	0,1		236,82	200,87	146,92	118,26
	0,01		223,35	187,04	144,64	116,89
		0,1	285,27	243,17	181,11	158,84
		0,01	279,60	234,52	175,36	143,79

A análise desses resultados permite verificar que a adição de sais mono e bivalentes contribuem para a redução da viscosidade aparentes das soluções de xantana produzidas com GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, sendo este

Capítulo 5 – Resultados e discussão

efeito mais acentuado com adição de KCl, e em ambos os sais a 0,01 %. De acordo com Luporini e Bretas (2011) a presença de íons monovalentes formam ligações cruzadas fracas. Logo, o comportamento do biopolímero na presença dos íons mono e bivalentes pode estar associado à baixa interação intermolecular.

Segundo Milas; Rinauto (1986) sais divalentes como CaCl_2 e MgCl_2 são mais efetivos no aumento da temperatura de transição que os sais monovalentes. Entretanto, a 85°C o uso do KCl proporcionou maior estabilidade à viscosidade, quando comparada com a redução causada pelo uso de CaCl_2 na solução.

A queda na viscosidade das soluções de goma xantana com o aumento da temperatura também foi observado por Borges *et al.* (2009). Segundo os autores, soluções aquosas de xantanas comerciais apresentaram menores quedas com aumento da temperatura, sendo atribuída à presença de elevados teores de sais bivalentes.

Xie e Lecourtie (1992) *apud* Borges *et al.* (2009) avaliaram o comportamento reológico de uma suspensão de argila com xantana comercial, em presença de NaCl ou CaCl_2 . Os resultados mostraram que baixas concentrações de NaCl (0,01%) não resultam em variação de viscosidades entre 30 e 70°C, contudo, em 90°C a viscosidade sofreu redução. Com utilizando CaCl_2 ocorreu decréscimo da viscosidade em menor relevância.

O uso de FeCl_3 , ao contrário do KCl e CaCl_2 , causou aumento da viscosidade aparente das soluções com 0,5% de goma xantana, conforme mostrado na Tabela 19. A 25°C, as soluções preparadas com 0,1 e 0,01% de FeCl_3 , quando comparadas com a solução aquosa de goma xantana sem sal (controle), exibiram acréscimo de 10,76 % e 8,95 %, respectivamente. A 85°C chegou a apresentar viscosidade em torno de 14,48 % e 5,53 % superior a da solução aquosa de goma xantana. Nesse caso, constata-se que a utilização do sal trivalente (Fe_3) contribui para o aumento da viscosidade aparente da solução de goma xantana, sendo mais significativo o uso de 0,1 %. O efeito causado pela adição de sal trivalente gera a expectativa de aplicação da goma xantana obtida com GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 em processos que requer alta viscosidade e altas temperaturas. De acordo com Monteiro *et al.* (2004) comumente, durante a perfuração de poços a temperatura varia entre a ambiente na superfície, até 60°C no fundo do poço. Porém em alguns poços pode chegar a valores acima de 150 °C.

A Figura 24 mostra o efeito de diferentes temperaturas (25, 45, 65 e 85°C) no índice de fluxo (n) das soluções na taxa de cisalhamento de 25 s^{-1} . Nota-se que todas as

Capítulo 5 – Resultados e discussão

soluções apresentam comportamento pseudoplástico ($n < 1$). No entanto, o aumento da temperatura causou diminuição da pseudoplasticidade de todas as soluções, independente da natureza e concentração do sal.

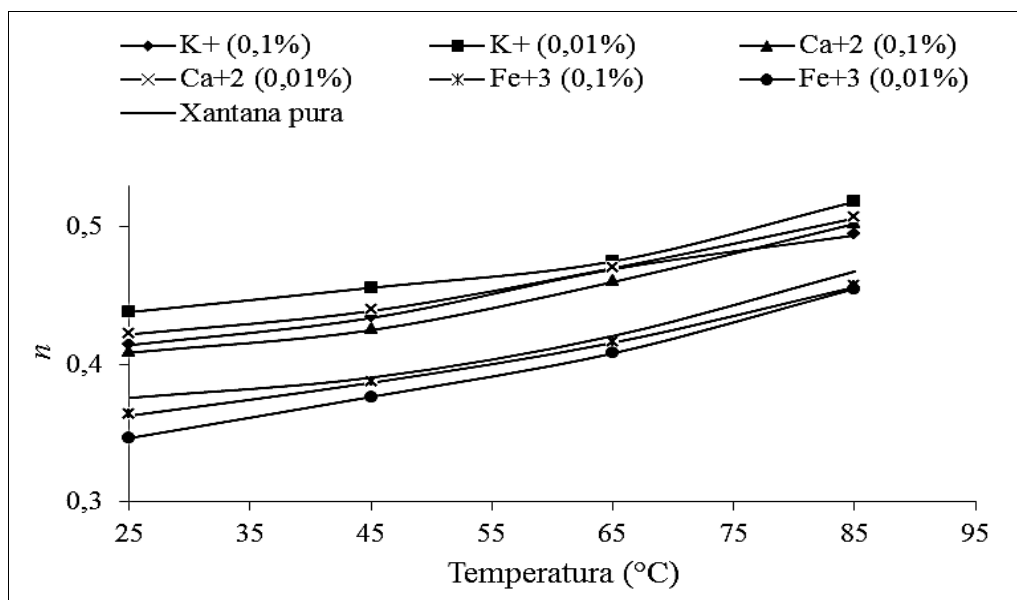


Figura 24. Influência da temperatura no índice de fluxo das soluções aquosa e salinas da goma xantana obtida por fermentação de GRB com *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 no ponto ótimo (1,0 vvm e 500 rpm).

Os dados revelam que, independente da temperatura, as soluções preparadas com sais mono (KCl) e bivalentes (CaCl_2) apresentam diminuição da pseudoplasticidade em relação às soluções sem adição de sais (controle), sendo este efeito mais acentuado nas soluções salinas mais diluídas (0,01%). A adição de sal trivalente (FeCl_3) contribui para o aumento da pseudoplasticidade das soluções, sendo mais significativa a adição de 0,01% até 65°C. De acordo com Borges *et al.* (2009) para aplicação em fluido de perfuração de poços são desejáveis baixos valores de n , uma vez que facilita a injeção do fluido, além de melhorar a taxa de perfuração.

De acordo com Dario *et al.* (2011) o parâmetro K ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$) indica o grau de resistência do fluido diante do escoamento, em outras palavras, quanto maior o valor de K maior será a viscosidade do fluido. A Figura 25 mostra o efeito de diferentes temperaturas (25, 45, 65 e 85°C) nos valores de K das soluções aquosa e salinas.

Capítulo 5 – Resultados e discussão

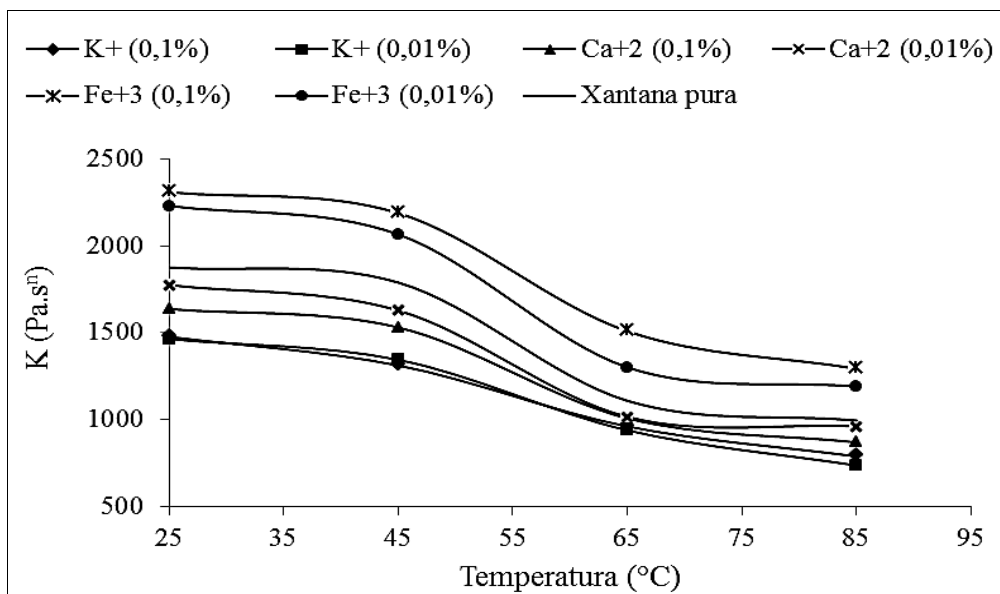


Figura 25. Influência da temperatura no índice de consistência (K) das soluções aquosa e salinas da goma xantana produzida por fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 no ponto otimizado (1,0 vvm e 500 rpm).

Em todas as avaliações o aumento da temperatura contribuiu para o decréscimo do valor de K e conseqüentemente da viscosidade aparente das soluções. Este decréscimo está associado a mudanças na conformação da molécula de xantana, que com o aumento da temperatura passa de ordenada para desordenada (MILAS; RINAUDO, 1979; MEDEIROS *et al.* 2000; STHERLAND, 1996). Machado (2002) menciona que elevado valor de K é desejado para fluidos de perfuração, uma vez que altas viscosidades são requisitadas para manter os cascalhos em suspensão durante a perfuração.

6 CONCLUSÕES

Os resultados das fermentações de 2,0% de GRB minimamente suplementada com 0,1% de K_2HPO_4 por *xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, em diferentes aerações (0,5 – 1,5 vvm) e agitações (300 – 700 rpm) conduzidas em biorreator de 4,5L a 28°C, obtidos levaram as seguintes conclusões:

- A produção de goma xantana foi influenciada individualmente, pela velocidade de agitação, sendo a produção favorecida com utilização de baixas agitações. A otimização para esta resposta apontou 0,97 vvm e 498,00 rpm como combinação para maximizar a produção de xantana em até 5,59 gL^{-1} .
- A concentração de biomassa seca foi influenciada, individualmente, pela aeração e pela agitação, sendo favorecida com baixas velocidades de agitação ou aumento na taxa de aeração. A otimização indica o emprego de 1,05 vvm e 484,75 rpm para maximizar a concentração de biomassa em até 3,26 gL^{-1} .
- O aumento individual da velocidade de agitação resultou na redução da viscosidade aparente das soluções de xantana; enquanto que o aumento na aeração induziu aumento da viscosidade. A otimização desta resposta indicou condições similares a do ponto central (1,05 vvm e 497,60 rpm) como condições ótimas para obter máxima viscosidade aparente (255,40 mPa.s) das soluções de xantana a 0,5% (m/v), medidas a 25°C e 25s⁻¹.
- Taxas de aeração baixas favorecem o aumento no teor de glicose e manose da cadeia de goma xantana, além desta condição, o aumento individual na velocidade de agitação resultou no aumento no teor de manose e redução no teor de glicose. A concentração de ácido glucurônico tende a aumentar com emprego de baixas agitações, enquanto a concentração de ácido pirúvico foi influenciada significativamente pela agitação, sendo favorecida nas condições inferiores da variável agitação. Além disso, o teor de ácido pirúvico influencia diretamente na viscosidade da goma xantana obtida da fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103.
- A massa molecular ponderada das gomas xantana obtida da fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 foi influenciada significativamente pela velocidade de agitação, apresentando maiores massas

Capítulo 6 – Conclusões

com baixas agitações. Além disso, o aumento da taxa de aeração contribui para o aumento da massa molecular da goma xantana.

- Incrementos na aeração ou na velocidade de agitação induz a produção de goma xantana obtida da fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 com indicativo de alta termorresistência.
- Os fatores de conversão mostraram que a *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 apresentou excelente capacidade de utilizar GRB para síntese de xantana nas condições do ponto ótimo, além disso, o comportamento das velocidades específicas (μ) ao longo do tempo indicou que a produção da goma xantana está parcialmente associada ao crescimento celular.
- A adição de sais mono e bivalentes contribuíram, respectivamente, para a redução de até 19,65 e 12,26% na viscosidade das soluções de gomas xantana; por outro lado, a adição de sal trivalente conferiu aumento de até 10,76% na viscosidade aparente da goma xantana obtida na condição ótima.

Portanto, as variações de aeração e agitação na fermentação de GRB por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, exerce grande influência na produção e propriedades das gomas xantana resultantes como: Viscosidade aparente, composição química, massa molecular e estabilidade térmica.

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ALBARELLI, J. Q.; SANTOS, D. T.; HOLANDA, M. R. Energetic and economic evaluation of waste glycerol cogeneration in Brazil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 04, p. 691-698, 2011.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis of AOAC International**. 16th ed., Horwitz, W., Maryland: Gaithersburg, 1997.
- ARAÚJO, L.; ALVES, F.; Aditivos e ingredientes: ao gosto do consumidor. **Brasil Alimentos**, São Paulo, n. 19, p. 18-24, 2003.
- AYOUB, M.; ABDULLAH, A. Z. Critical review on the current scenario and significance crude glycerol resulting of biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. **Renewable and Sustainable Energy Review**, v. 16, p. 2671 – 2686, 2012.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, p.414, 2010.
- BEMILLER, J. N.; WHISTLER, R. L. Carbohydrates. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 3ed, p.81-156, 1996.
- BORGES, C. D.; MOREIRA, A. DA S.; VENDRUSCOLO, C. T.; AYUB, M. A. Z. Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv *pruni* strain 101. **Revista argentina de microbiologia**, v. 40, p. 81-85, 2008.
- BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T.; MATINS, 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**, v.19, n. 2, p. 160-165, 2009.
- BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthan. In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. Biopolymers - biology, chemistry, biotechnology and applications. **Weinheim: Wiley-VCH**, p. 259-291. 2002.
- BOZA, Y. E. A. G. **Encapsulamento de *beijerinckia* sp utilizando spray-drier**. Departamento de ciências de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2002.
- BOZA, Y. E. A. G.; NETO, L. P.; COSTA, F. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Exopolysaccharideproduction by encapsulated *Beijerinckia* cultures. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1201-1209, 2004.

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

BRADSHAW, I. J.; NISBET, B. A.; KERR, M. H.; SUTHERLAND, I. W. Modified xanthan its preparation and viscosity. **Carbohydrate Polymers**, v. 3, n. 1, p. 23-38, 1983.

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

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.; 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.

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**, New York, v. 20, n. 7, p. 1003 –1014, 1978.

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.

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.

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

CANILHA, L.; SILVA, D. D. V.; CARVALHO, W.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte 3: polissacarídeos e enzimas. **Revista Analytica**, São Paulo, v. 20, p. 32-41, 2006.

CARDONA, C.; POSADA, J.; MONTOYA, M. Use of Glycerol from Biodiesel Production: Conversion to Added Value Products. In: **Proceedings of European Congress of Chemical Engineering**. P.16-20, 2007.

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

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

CASTELLÓ, M. L. **Estudo da glicerina por análises térmicas**. Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

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 Engineering**, v. 66, p. 301-305, 2005.

ÇELIK E, OZBAY N, OKTAR N, ÇALIK P. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. *Ind Eng Chem Res*, v. 4, p. 2985-2990, 2008.

CELULOSE ONLINE. **Brasil é o 3º maior produtor de biodiesel do mundo**. Disponível em: www.celuloseonline.com.br/aulas. Acesso em: 22 de julho de 2013.

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

CHEREMISINOFF, N. P. Na introduction to polymer rheology and processing. USA: C press, 1992. 280 p.

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

CHOWSHURY, T. A.; LINDBERG, B.; LINDQUIST, U. Structural studies of an extracellular polysaccharide, S-657, elaborated by *Xanthomonas* ATCC 53159. **Carbohydrate Research**, v. 164, p. 117-122, 1987.

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, 1995, p.13.

COSTA, L. A. S; GOMES, G. V. P.; PADILHA, F. F.; DRUZIAN, J. I. **Produção do polissacarídeos tipo goma xantana por fermentação de resíduos de crustáceos e bivalves**. INPI, Patente: Privilegio de Inovação, PI011100001119, 2010.

CRESCENZI, V. Microbial polysaccharides of applied interest: on going research activities in Europe. **Biotechnology Progress**, v. 11, p. 251-259, 1995.

CROSSMAN, L.; DOW, J. M. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. **Microbes infection**, v. 6, p. 623-629, 2004.

CUNHA, M. A. A.; SANTOS, J. C.; GÓMEZ, R. J. H. C.; SILVA, S. S. Goma curdlana: Propriedades e aplicações. **Biociência**, Brasília, v. 33, p. 55-61. 2004.

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

- DA SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30-39, 2009.
- DÁRIO, A. F.; HORTÊNCIO, L. M. A.; SIERAKOWSKI, M. R.; NETO, J. C. Q.; PETRI, D. F. S. The effect of calcium salt on the viscosity and adsorption behavior of xanthan. **Carbohydrate Polymers**, n. 84, p. 669-676, 2011.
- DE VUYST, L.; VAN-LOO, J.; VANDAMME, E.J. Two-step fermentation process for improving xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1549. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 263-273, 1987.
- DE VUYST, L.; VERMEIRE, A. Use of industrial medium components for xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 2-3, p. 187-191, 1994.
- DIAZ, P. S. **Influência de parâmetros físicos e químicos e da adição de íons no comportamento reológico de gomas xantana**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2002.
- 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. **Semina: ciências exatas e tecnológicas**, Londrina, v. 25, n.1, p. 15-28, 2004.
- DILTZ, S.; ZELLER, S. D. Location of O-acetyl group 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**, 22: 278-281, 2012.
- 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, 2000.
- DRUZIAN, J. I.; PAGLIARINI, A. P. Produção de goma xantana por fermentação do resíduo do Suco de Maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p. 26-31, 2007.
- DUTA, F.P.; FRANÇA, F.P.; LOPES, L.M.A. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. **Electronic Journal Biotechnol**, v. 9, p. 393-399, 2006.
- 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.
- ESGALHADO, M. E., ROSEIRO, J. C., AMARAL-COLLAÇO, M. T. Interactive effects of pH and temperature on cell growth and polymer production by *Xanthomonas campestris*. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 7, p. 667 – 671, 1994.

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

FARIA, L. H. G. B. **Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias isoladas de amostras de solo.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

FARIA,S.; PETKOWICZ, C. L. O.; MORAES, S. L.; TERRONE, M. G. H.; RESENDE, M. M.; FRANÇA,F. P.; CARDOSO, V. L. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 469-476, 2011.

FARIA, S.; VIEIRA, P. A.; RESENDE, M. M.; FRANÇA, F. P.; CARDOSO, V. L. A comparasion between shaker and bioreactor performances basead on the kinetec parameters of xanthan gum production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 156, p. 475-488, 2009.

FENTANES, E. G. **Polisacarídeos microbianos.** In: **RAMIREZ, R. Q. Prospectiva de la biotecnología em México.** México: Fundación Javier Barros Sierra, p.73-92, 1985.

FIGUEREDO, T. V. B.; ASSIS, D. J.; CAMPOS, M. I.; COSTA, L. A. S.; DRUZIAN, J. I. Produção e viscosidade de goma xantana obtida a partir da fermentação de glicerina residual do biodiesel. In: **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Caxias do sul, 2011.

FILHO, M. A. Sequenciamento genético de duas bactérias amplia frentes de combate ao cancro cítrico. **Jornal da Unicamp**, edição 297, p.3, 2005.

FOOD INGREDIENTS BRASIL Nº 17 – 2011. Disponível em: www.revista-fi.com. Acesso em 11.12.2012.

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, p.79, 2006.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; PAIS, J.; COSTA, N.; OLIVEIRA, C.; MAFRA,L.; HILLIOU, L.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Characterization of an extracelular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. **Bioresource Technology**, v. 100, p.859-865, 2009.

FUKUI, R.; ARIAS, R. ALVAREZ, R. Efficacy of four semi-selective media for recovery *Xanthomonas campestris pv. campestris* from tropical soil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 37, p. 534-540, 1994.

GADEN, E. L. Jr. Fermentation kinetics and productivity. **Chemistry and Industry**, p. 154-159, 1955. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial.** Ed. 1, v. 2, São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, p. 5 -18, 2001.

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

- GALINDO, E.; SALCEDO, G.; RAMIREZ, M. E. Preservation of *Xanthomonas campestris* on agar slopes: Effects on xanthan Production. *Appl. Microbiology Biotechnology*, 40: 634-637, 1994.
- GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCON, A. Chemical Structured Kinetic Model for Xanthan Production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p.284-292, 2004.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCON, A. Metabolic structured kinetic model for xanthan production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, p. 75-82, 1998.
- GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCON, A. Xanthan gum production: an unstructured kinetic model. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 206-217, 1995.
- GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GOMEZ, E. Xanthan gum: Production, Recovery, and Properties. *Biotechnology Advanced*, 18:549-579, 2000.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GOMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and propertie. *Biotechnology Advance*, v. 18, p. 549-579, 1995.
- GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Gellan gum. *Critical Reviews Biotechnology*. V. 20, n. 3, p. 177-211, 2000.
- GLICKSMAN, M. Gelling hydrocolloids in food product applications. In: BLANSHANRD, J. M. V.; MITCHELL, J. R. *Polysaccharides in food*. London: Butterworths, p. 185-204, 1979.
- GODET, P. Fermentation of polysaccharide gums. *Process Biochemistry*, v. 8, n. 1, p. 33-34, 1973.
- GÓMEZ, M.; RONDA, F.; CABALLERO, P. A.; BLANCO, C. A.; ROSELL, C. M. Functionality of different hydrocolloids on the quality and shelf-life of yellow layer cakes. *Food Hydrocolloids*, Oxford, v. 21, n.2, p. 167-173, 2007.
- GUEVARA, Y. M.; DEBROT, C. E. Tizon bacteriano de la cala (*Anthurium andreanum Lind*) em Venezuela. *Agronomía Tropical*, v. 34, p. 153-160, 1984.
- HARDING, N. E., CLEARY, J. M., IELPI, L. Genetic and Biochemistry of Xanthan Gum Production by *Xanthomonas campestris*, L. In: HUI, Y. H., KHACHATOURIANS, G. G. *Food Biotechnology Microorganisms*. USA: VCH, p. 495-514, 1995.
- HARMELIN, M. *La Thermo-Analyse*. Presses Universitaires de France. Paris, France, 1968.
- HAYWARD, A. C. *The hosts of Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. London: Chapman ; Hall, 1993.

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

HEAL, G. R. Thermogravimetry and Derivative Thermogravimetry. In: Haines, P. J. **Principles of Thermal Analysis and Calorimetry**. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK, 2002.

HISS, H. cinética de Processos Fermentativos. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**, v.2, São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA., 2001.

HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATHM, P. H. A., STALEY, J. T. - Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Philadelphia (USA): **Lippinott Williams and Wilkins**. 9 ed., p. 100-174, 1994.

HUBLIK, G. Xanthan. In: **Polymer Science: A comprehensive Reference**. Elsevier, Amsterdam, v. 10, p. 221-229, 2012.

HUNT, G. R.; STIEBER, R. W. Inoculum Development. In: Demain, A. L.; SOLOMON, N. A., ed. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, American Society of Microbiolog, Washington, 32-40, 1986.

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.

JANSSON, P. E., KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v. 45, p. 275–282, 1975.

JOHNSON, D. T.; TACONI, K. A. The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. **Environment Progress**, v. 26, p.338–48, 2007.

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

KENNEDY, J. F.; BRADSHAW, I. J. Production, properties and applications of xantana. **Progress Industrial Microbiology**, v.1(19), p.319-371, 1984.

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, 129-138, 2006.

KONICEK, J.; LASÍK, J.; WURST, M. Production and characteristics of the exocellular polysaccharide in mutant strains of *Xanthomonas fuscans*. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 22, p. 12-18, 1977.

KÖPLIN, R.; ARNOLD, W.; HÖTTE, B.; SIMON, R.; WANG, G. E.; PÜHLER, A. Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the xanA and xanB genes

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v.174, n. 1, p. 191-199, 1992.

KUMAR, A.S.; MODY, K.; JHA, B. Review article: Bacterial exopolysaccharides – a perception. **Journal of Basic Microbiology**. Wheinhein, v.47, p. 103-107, 2007.

LAWS, A., GU, Y., MARSHALL, V. Biosynthesis, characterization and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 597-625, 2001.

LECHNER, M. D.; GEHRKE, K.; NORDMEIER, E. **Makromolekulare chemie**. Berlin: Birkhäuser, p. 532,1996.

LE DUY, A.; ZAJIC, J. E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n. 4, p. 805-810, 1973.

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.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI,W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., V.3, p. 125-154, 2001.

LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica agroindustrial – Revalorización alimentaria de la produccion agricola**. Zaragoza: Acríbia, 428p., 1996.

LIU, W.; NORISUYE, T. Order-disorder conformation change of xanthan in 0.01M aqueous sodium chloride: dimensional behavior. **Biopolymers**, New York, v.27, p.1641-1654, 1988.

LIU, Y.; KUERSTEN, S.; HUANG, T.; LARSEN, A.; MACMORRIS, M.; BLUMENTHAL, T. **An uncapped RNA suggests a model for *Caenorhabditis elegans* polycistronic premRNA processing**. Rna 9, P. 677–687, 2003.

LOOIJESTEIJIN, P. J.; TRAPET, L.; VRIES, E.; ABEE, T. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 71-80, 2001.

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

- LOPES, L. M. A. Caracterização viscosimétrica de misturas das gomas xantana e guar. Dissertação de Mestrado – Instituto de Macromoléculas – Universidade Federal do rio de Janeiro (IMA / UFRJ), 1989.
- LUPORINI, S.; BRETAS, R. E. S. Caracterização reológica da goma xantana: Influência de íons metálicos univalente e trivalente e temperatura em experimentos dinâmicos. **Polímeros**, v. 21, n. 3, p. 188-194, 2011.
- MACHADO, J. C. V. Reologia e Escoamento de fluídos – ênfase na indústria do petróleo. Rio de Janeiro: Interciência, 2002.
- MAIA, L. H.; PORTE, A.; SOUZA, V. F. Filmes comestíveis: aspectos gerais, propriedades de barreira a umidade e oxigênio. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 18, p. 105-128, 2000.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; OLIVEIRA, L. S.; PEIXOTO, A. R. Diagnose e manejo de fitobacterioses de importância no nordeste brasileiro. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Desafios da proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife, UFRPE, p. 141-169, 2001.
- MAUGERI, F. Produção de polissacarídeos. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Sao Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda. v. 3, 2001.
- MELERO, J.A.; VICENTE, G.; PANIAGUA, M.; MORALES, G.; MUNOZ. P. Etherification of biodiesel derived glycerol with ethanol for fuel formulation over sulfonic modified catalysts. **Bioresour Technol**, v. 103(1), p.142–51, 2012.
- MELO, C. P. B.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; YOUSSEF, E. Y.; DALL’ANTÔNIA, L. H.; MALIS, S. Effect of manufacturing process and xanthan gum addition on the properties of cassava starch films. **Journal of Polymer and Environment**, v. 9, p. 739–749, 2011.
- MESOMO, M. C. Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio á base de soro de queijo. 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, 2007.
- MILAS, M.; RINAUDO, M. Properties of xanthan gum in aqueous solutions: Role of the conformational transation. **Carbohydrate Recheach**, v. 158, p. 191, 1986.
- MISAKI, A. Stuctural aspects of some functional polysaccharides. In: NISHIARI, K.; DOI, E. (ed.) **Food Hydrocolloids**. New York, Plenum Press, p. 147-150, 1993.
- MONSAN, P., BOZONNET, S., ALBENNE, C., JOUELA, G., WILLEMOT, R. M.; REMAUD-SIMÉON, M. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 673-683, 2001.
- MONTEIRO, V. A. R.; MARTINS, A. L.; BRANDÃO, E. M.; MELLO, E. M. C. - “Estudo das propriedades reológicas de fluidos de perfuração de poços em águas

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

profundas”, in: Proceedings of the II Brazilian Conference on Rheology, Rio de Janeiro – RJ, 2004.

MOOSAVI-NASAB, M.; SHEKARIPOUR, F.; ALIPOOR, M. Use of date syrup as agricultural waste for xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Iran agricultural Research**, v. 27, n. 1-2, 2009.

MORAINE, R. A., ROGOVIN, P. Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH control. **Biotechnol Bioeng**, v. 13, p. 381–91, 1971.

MOREIRA, A. N.; PINO, F. A. B. del; 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, n. 2, p. 300-305, 2003.

MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímeros sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni***. Tese. (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de biotecnologia, Universidade federal de Pelotas, 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.; LOPEZ, M. J.; VARGAS-GARCIA, C.; VAZQUEZ, R. Use of Agricultural Wastes for Xanthan Production by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotchnology**, v. 21, 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.57-58, 1984.

MORRIS, E. R. Rheology of xanthan: suspension of particles and stabilization of emulsion. **Food ; Ingredients Journal of Japan**, v. 167, p. 31-36, 1996.

MOSHAF, S.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; AZIZI, M. H. Optimization of conditions of xanthan gum production fro waste date in submerged fermentation. **World academy of Science, Engineering and Technology**, v. 57, p. 521-524, 2011.

MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C. Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Using Designed Experiments, 2nd ed., John Wiley and Sons Inc., 2002.

NAMPOOTHIRI K. M.; SINGHANIA, R. R.; SABARINATH, C.; PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, (30)1513-1519 (7), 2003.

NAVARRO, R. F. Fundamentos de reologia de polímeros. Ed. 1, EDUCS, 265 p., 1997.

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

- 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**, 39: 1937-1941, 2008.
- NICOLAUS B, KAMBOUROVA M, ONER ET. Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamental to biotechnology. **Environmental Technology**, v. 31(10), p. 1145–1158, 2010.
- NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de 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, p. 82-85, 2001.
- 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.; RIGHELATO, R. C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical engineering**, v. 15, p. 41-70, 1981.
- PACE, G. Polímeros microbianos. In: BU'LOOCK, J.; KRISTIANSEN, B. **Biotechnology Básica**. Zaragoza: Acríbia, p. 449-462, 1991.
- PADILHA, F.F. **Produção de Biopolímeros por Microorganismos Modificados Geneticamente**. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2003.
- PALANIRAJ, A.; JAYARAMAN, V. Review - **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.
- PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S.K.; BATSILAS, L.; PARAS, S.V.; KYRIAKIDIS, D.A.; LIAKOPOULOUKYRIAKIDES, M. Xanthan production by *X. campestris* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 37(1), 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.**, 92, p.737–44, 2002.

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

- PASQUEL, A. **Gomas: utilização e aspectos reológicos**. Bol. SBCTA, v. 33(1), p. 86-97, 1999.
- PELLETIER, E.; VIEBKE, C.; MEADOWS, J.; WILLIAMS, P. A. Archeological study of the orderdisorder conformational transition of xanthan gum. **Biopolymers**, New York, v.59, p.339-346, 2001.
- 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*. **Biotechnology and Bioengineering**. n. 34, p. 1393-1397, 1989.
- PIERMARIA, J.A.; CANAL, M.L.; ABRAHAM, A.G. Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. **Food Hydrocolloids**, Oxford. v. 22, n. 8, p.1520-1527,2008.
- PINCHES, A.; PALLENT, L. J. Rate and yield relationship in the production of xanthan gum by batch frematation using complex and chemically defined media. **Biotechnology 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**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos. Universidade de São Paulo - USP, 1999.
- PINTO, E. P.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; MACHADO, M. I.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; BORGES, C. D. **Influencia da adição de sais na viscosidade de biopolímero de *Beijerinckia sp* 7070 e T32A**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17. Livro de Resumos, Fortaleza, p. 9-31, 2000.
- PINTO, Ellen P. **Desacetilação de xantana: influência no comportamento reológico**. 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, 1990.
- 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.

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

PSOMAS, S.K; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D.A.. Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**. v. 35 p. 273–280, 2007.

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, 2011.

RAO, M. A.; STEFFE, J. F. Viscoelastic properties of foods. New York: Elsevier **Applied Science**, 1992. 441p.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. v.3. Pelotas: Gráfica Universitária, 218p, 2000.

REIS, E. C.; ALMEIDA, M.; CARDOSO, J. C.; PEREIRA, M. A.; OLIVEIRA, C. B. Z.; VENCESLAU, E. M.; DRUZIAN, J. I.; MARIANO, R.; PADILHA, F. F. Biopolymer Synthesized by Strains of *Xanthomonas* Sp Isolate from Brazil Using Biodiesel-Waste. **Macromolecular Symp.**, 296, 347–353, 2010.

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.

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

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

ROSEIRO, J. C.; GIRIO, F. M.; KARÁ,A. Kinetic and metabolic effects of nitrogen, magnesium and sulphur restriction in *Xanthomonas campestris* batch cultures. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 381-386, 1993.

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.

RYWIŃSKA, A.; RYMOWICZ, W. Continuous production of citric acid from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* in cell recycle cultivation. **Chemical Papers**, v. 65, n.2, p. 119-123, 2011.

SALAMATINIA, B.; MOOTABADI, H.; BHATIA, S.; ABDULLAH, A. Z. Optimization of ultrasonicassisted heterogeneous biodiesel production from palm oil: a response surface methodology approach. **Fuel Process Technol**, v.91(5), p.441–448, 2010.

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:

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

- SANDFORD, P.A.; LASKIN, A. Extracellular microbial polysaccharides. Washington: American Chemical Society, p. 192-210, 1977.
- SANFORD, P. A. Exocellular microbial polysaccharide. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**, v. 36, p. 292-296, 1979.
- SATO, J. C. M. C. S. **Fermentação Descontínua**. In: SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. DE L.; AQUARONE, E.; BORZANI, E. Biotecnologia industrial. 1ed. V.2, São Paulo: Editora EdgardBlucher LTDA, 2001, p. 193-216.
- SCHERZ, H.; BONN, G. K. **Analytical Chemistry of Carbohydrates**. Theieme Stuttgart, New York, USA, 1998.
- SERRANO-CARREÓN, L.; CORONA, R. M.; SANCHEZ, A.; GALINDO, E. Prediction of xanthan fermentation development by a model linking kinetics, power draw and mixing. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 133-146, 1998.
- 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.
- SHAW, D. J. **Introdução a química dos colóides e de superfícies**. São Paulo: Edgard Blucher, p. 180, 1975.
- 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.
- SILVA F. R.; VETTORE, A. L.; KEMPER, E. L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidious gum: The *Xilella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, n. 203, p. 165-171, 2001.
- SILVEIRA, C. F.; PREICHARDT, L. D.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. **Modificações químicas em xantana produzida por *Xanthomonas arborícola* pv *pruni* Promovidas por tratamento térmico**. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. v. 02, n. 02: p. 32-41, 2008.
- SINGH, R.S.; SAINI, G.K.; KENNEDY, J.F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, Nova Iorque, v.73, p.515–531, 2008.
- SLONEKER, J. H.; ORENTAS, D. G.; JEANES, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Part III. Structure. **Canadian Journal of chemistry**. V. 42, 1963.
- 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**, v. 3, n. 2, p. 129-134, 1981.

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

- SOUW, P.; DEMAIN, A. L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1186-1192, 1979.
- 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.
- SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 331-340, out./dez., 2004.
- SUTHERLAND, I. A Sticky Business. Microbial Polysaccharides: Current Products and future Trends. *Microbiol. Today*, 29: 70-71, 2002.
- SUTHERLAND, I. W. **Biosynthesis of microbial exopolysaccharides.** *Advances in Microbial Physiology*. v. 23, p. 80-142, 1982.
- SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. Publisher: **Chapman ; Hall**, p. 363-388, 1993.
- SUTHERLAND, I.W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p. 663-674, 2001.
- SUTHERLAND, I. W. **Extracellular polysaccharides.** *Biotechnology*, v. 6, p. 613-657, 1996.
- 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. D-Mannose-specific interaction between xanthan and D-galacto-D-mannan. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 204, n. 1, p. 33-36, 1986.
- TANYILDIZI, M. S.; OZER, D.; ELIBOL, M. Optimization of α -amylase production by *Bacillus sp.* using response surface methodology. **Process Biochemistry**, 40(7), p. 2291-2296, 2005.
- 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 PD em Petróleo e Gás, 2005.
- TEODORO, J. C.; BAPTISTA-NETO, A.; ARAUJO, M. L. G. C.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Influence of glycerol and ornithine feeding on clavuronic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Brazil Journal of Chemical Engineering*, 27, n. 4, p. 499-506, 2010.

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feed stocks. **Applied Engineering Agricultural**, v. 22(2), p. 261–5, 2006.

TONELI, J. T.C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.7, p.181-204, 2005.

TORRES, L.G.; BRITO, E.; GALINDO, E.; CHOPLIN, L. Viscous behavior of xanthan solutions from a variant strain of *Xanthomonas campestris*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 1, p. 58-64, 1993.

UMA SHANKAR, K. S. M; UMA SHAANKER, R.; GANESHAIAH, K. N.; BAWA, K. S. Extraction of non timber forest products in the forest of Biligiri Rangan Hills, India. 3. Productivity, extraction and prospects of sustainable harvest of Amla (*Phyllanthus emblica*). **Economic Botany**, v. 50, p. 270–279, 1996.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). EPA finalizes regulations for a renewable fuel standard (RFS) program for 2007 and beyond, EPA420-F-07-019. Ann Arbor, MI: Office of Transportation and Air Quality; 2007.

VASHITZ, O.; SHEINTUCH, M. Analysis of polymer synthesis rates during steady-state growth of *X. campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 4, p. 383-385, 1991.

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

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; ZAMBIAZI, R.; SCAMPARINI, A. R. P. Heteropolysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv pruni C24. In: NISHINARI, K. **Hydrocolloids**. Amsterdam: Elsevier, v. 1, p. 187-191, 2000.

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.

WEISS, R. M.; OLLIS, D. F. Extra cellular microbial polysaccharides: substrate, biomass and product kinetics equation from xanthan gum fermentation. **Biotechnology Bioengineering**, v. 22, p. 859-873, 1980.

WOICIECHOWSKY, A. L. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de goma xantana a partir de resíduos agroindustriais de café e de mandioca**, Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

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.

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

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, 2004.

ZHU, Y.; Li, J.; TAN, M.; LIU, L.; JIANG, L.; SUN, J.; LEE, P.; DU, G. ; CHEN. J. Optimization and scale up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. **Bioresource Technology**, v.101, n.22, p. 8902-8906, 2010.

Capítulo 6 – conclusões