



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**APROVEITAMENTO DO GLICEROL RESIDUÁRIO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL
EM FERMENTAÇÕES DESTINADAS A PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA E
BIOSSURFACTANTES**

TAIS MAGALHÃES ABRANTES PINHEIRO

UBERLÂNDIA – MG

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**APROVEITAMENTO DO GLICEROL RESIDUÁRIO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL
EM FERMENTAÇÕES DESTINADAS A PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA E
BIOSURFACTANTES**

Tais Magalhães Abrantes Pinheiro

Orientadores:

Dr. Ubirajara Coutinho Filho (UFU)

Dra. Vicelma Luiz Cardoso (UFU)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P654a
2013 Pinheiro, Tais Magalhães Abrantes, 1986-
 Aproveitamento do glicerol residuário da produção de biodiesel em
 fermentações destinadas a produção de goma xantana e biossurfactantes
 / Tais Magalhães Abrantes Pinheiro. - 2013.
 62 f. : il.

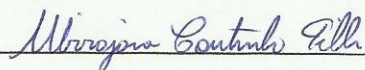
 Orientador: Ubirajara Coutinho Filho.
 Coorientadora: Vicelma Luiz Cardoso.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
 Inclui bibliografia.

 1. Engenharia química - Teses. 2. Biopolímeros - Teses. 3. Glicerina
 - Teses. I. Coutinho Filho, Ubirajara. II. Cardoso, Vicelma Luiz. III.
 Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em
 Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE TAIS MAGALHÃES ABRANTES PINHEIRO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE
DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
ENGENHARIA QUÍMICA, EM 22/07/2013.

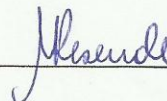
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
(Orientador - PPG-EQ/UFU)



Profa. Dra. Vicelma Luís Cardoso
(Co-Orientadora PPG-EQ/UFU)



Profa. Dra. Miriam Maria de Resende
(PPG-EQ/UFU)



Prof. Dr. Rafael Bruno Vieira
(EQ/UFPR)

AGRADECIMENTOS

Difícil começar os agradecimentos, pois este trabalho foi realizados por muitas cabeças e mãos.

Inicialmente, gostaria de agradecer às pessoas que me ajudaram de forma direta para a realização dessa dissertação.

Ao meu orientador Ubirajara, sem ele com certeza essa dissertação não seria possível. À minha co-orientadora Vicelma, que estava sempre pronta para me ajudar na produção desse trabalho. Agradeço aos alunos da graduação que iniciaram suas vidas científicas me ajudando: Aline, Isabela e Cássio. E por último, mas não menos importantes, aos colegas do núcleo de Bioquímica da FEQ, em especial a Betânia e Janaína que sempre me ajudaram prontamente.

Acredito que a ajuda indireta seja tão importante, às vezes até mais importante, do que a ajuda direta. Por isso, agradeço a todos os meus amigos que amo muito: Carol, Cláudio, Danilo, Fabio, Fernanda, Nayara, Paula, Taciana, Thaíssa e Verônica pelas conversas, risadas e muitas gargalhadas. Destes, agradeço especialmente a Carol e a Paula que me ajudaram e me apoiaram muito nesses últimos seis meses, são simplesmente especiais. Além disso, no início do mestrado conheci três pessoas nos corredores da faculdade que hoje são muito queridas Taciana, Fernanda e Verônica a elas agradeço pelas ajudas diretas, com as matérias, e pelas ajudas indiretas. Agradeço também, ao meu namorado Cassio, por todos os anos juntos e que divide comigo as alegrias e tristezas dessa vida.

Agradeço as minha queridas tias, Dalva, Dag e Ju. E como não falar da minha prima irmã, Isadora, obrigado por tudo.

Os mais importantes agradecimentos são para minha mãe Iara, meu pai Jorge, meus irmãos Cauê e Rafael e meu querido sobrinho Heitor, sei que posso contar com eles "pro que der e vier". Amo vocês.

E por fim, agradeço à toda Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia. FAPEMIG, CAPES, CNPQ e VALE pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS	2
CAPÍTULO 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1- Propriedades do Glicerol.....	3
3.2 - Produção de Glicerol.....	5
3.3- Microrganismos capazes de utilizar glicerol como fonte de carbono	7
3.4 - Biopolímeros	8
3.5- Hidrocolóides	8
3.6 - Gomas de origem microbiana	9
3.7- Goma Xantana.....	11
3.8 - Microrganismos Produtores de Goma Xantana	13
3.9 - Reologia	14
3.10- Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR).....	15
CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 - Microrganismos.....	16
4.2 - Meios de Manutenção de microrganismo.	16
4.3 - Matéria-Prima.....	17
4.4 - Composição dos Inóculos e dos Meios de Produção	17
4.5 - Produção de Goma Xantana.....	18
4.5.1 – Produção de Goma Xantana em reatores de bancada.....	18
4.5.2- Produção de Xantana em Batelada Alimentada	19
4.6- Análises de produção de xantana	19
4.6.1 – Determinação da Biomassa Através de Massa Secas.....	20
4.6.2 – Determinação do consumo de Glicerol	20
4.6.3– Recuperação e Purificação da Goma	20
4.6.4 – Espectroscopia de Infravermelho da Goma Produzida.....	21
4.6.5 – Determinação de Massa Molar pelo método da viscosidade capilar.....	21

4.6.6 – Avaliação do Comportamento Reológico da xantana	24
CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	25
5.1- Seleção dos microrganismos	25
5.1.1- Ensaio com <i>Lactobacillus casei shirota</i>	25
5.1.2- Ensaio com Microrganismo "x" -" Klebsiella"	26
5.1.3- Ensaio com Xanthomonas	28
5.1.4- Discussão dos ensaios e seleção dos microrganismos	29
5.2- Ensaio para produção de biopolímeros com glicerol e glicose.....	29
5.3- Ensaio para produção de biopolímeros com glicerol puro	30
5.3.1- Ensaio para determinação do tempo de fermentação	30
5.3.2- Ensaio para determinação dos meios de fermentação e inóculo	31
5.3.3- Ensaio para determinação da concentração de glicerol no meio fermentativo	33
5.3.4- Ensaio para determinação do tempo de preparo de inóculo.....	34
5.3.5- Batelada Alimentada	36
5.4- Espectroscopia na Região de Infravermelho da Goma Produzida e Goma comercial ..	37
5.4.1- Determinação da Massa Molar.....	39
5.5- Ensaio complementares	40
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES.....	41
CAPÍTULO 7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	42
CAPÍTULO 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1- Estrutura do Glicerol.....	3
Figura 3.2- Comprimentos de ligação selecionados em Å para o glicerol de seu confôrmero de menor energia na fase gasosa (A) e líquida (B), conforme determinado por métodos DFT.....	4
Figura 3.3- Esquema da produção de glicerol a partir da epiclodrina.....	5
Figura 3.4- Processo de produção do biodiesel por transesterificação.....	6
Figura 3.5- Estrutura do polissacarídeo extracelular formado pela <i>Xanthomonas campestris</i>	11
Figura 3.6- (a) Via Entner-Doudoroff; (b) Ciclo do ácido tricarboxílico.....	12
Figura 3.7- Micrografia eletrônica de transmissão de X. campestris (x12 000).	13
Figura 4.1- Processo em batelada alimentada	19
Figura 4.2: Fluxograma das análises de produção de goma Xantana.....	20
Figura 4.3- Viscosímetro de Oswald	23
Figura 5.1- Resultados dos testes exploratórios com <i>Lactobacillus</i> : a) Consumo de glicerol para os meios fermentativos A ₁ , A ₂ e A ₃ ; b) Concentração de células após a fermentação; c) Quantidade polímeros formado.	26
Figura 5.2- Resultados dos testes exploratórios com <i>Klebsiella sp.</i> : a) Consumo de glicerol para os meios fermentativos B ₁ , B ₂ e B ₃ ; b) Concentração de células após a fermentação; c) Quantidade polímeros formado.	27
Figura 5.3- Resultados dos testes exploratórios com <i>Xanthomonas</i> : a) Consumo de glicerol para os meios fermentativos C ₁ , C ₂ e C ₃ ; b) Concentração de células após a fermentação; c) Quantidade polímeros formado.	28
Figura 5.4- Síntese dos ensaios para seleção de microrganismo.....	29
Figura 5.5- Gráfico produção de polímero (Barras) e crescimento celular (○).....	30
Figura 5.6-Efeito do tempo de fermentação na produção de xantana (barras) e crescimento celular (○)	31
Figura 5.7-Efeito da composição do meio fermentativo e do inóculo na produção de xantana (♦), crescimento celular (○) e consumo de glicerol (barras).....	32

Figura 5.8- Efeito da concentração de glicerol na produção de xantana (♦), crescimento celular (○) e consumo de glicerol (barras)	33
Figura 5.9- Efeito do tempo de preparo do inóculo na produção de xantana (♦), crescimento celular (○) e consumo de glicerol (barras).....	35
Figura 5.10- Efeito da fermentação em batelada alimentada na produção de xantana (♦), crescimento celular (○) e consumo de glicerol (barras)	36
Figura 5.11- a) Comparação entre a gomas gerada pela fermentação de <i>X.campestris</i> e a goma comercial (Absorbância); b) goma gerada pela fermentação de <i>X.campestris</i> (Transmitância);	37
Figura 5.12- Associação entre a espectroscopia de infravermelho e a estrutura da goma xantana.....	38
Figura 5.13- Viscosidade inerente e específica reduzida em função da concentração de xantana produzida pela fermentação de <i>X.campestris</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Propriedades físico-químicas do glicerol puro à 20°C.....	4
Tabela 3.2- Gomas microbianas e suas aplicações industriais.....	10
Tabela 3.3- Composição média dos diferentes polissacarídeos produzidos por diferentes tipos de <i>Xanthomonas</i>	12
Tabela 4.1- Composição do Meio YMA com ágar	16
Tabela 4.2- Composição do Meio MRS líquido.....	17
Tabela 4.3- Componentes dos meios de produção de xantana e suas respectivas concentrações	18
Tabela 4.4- Equações das viscosidades utilizadas no cálculo da massa molar segundo a equação de Mark Houwink.....	22
Tabela 4.5- Concentrações das soluções utilizadas nas determinações das massas molares ...	23
Tabela 5.1- Composição dos meios utilizados nos testes com <i>Lactobacillus</i>	25
Tabela 5.2- Composição dos meios utilizados nos testes com <i>Klebsiella sp</i>	27
Tabela 5.3- Composição dos meios utilizados nos testes com <i>Xanthomonas</i>	28

RESUMO

O presente trabalho visou a utilização do glicerol como fonte de carbono na obtenção de goma a partir de fermentação com microrganismos. Foram utilizados sete diferentes microrganismos com o objetivo de converter glicerol em biopolímeros. Os microrganismos testados foram: *Lactobacillus casei shirota*, *Klebsiella sp.*, *Xanthomonas campestris*, e quatro leveduras provenientes do continente antártico de códigos L26, L32, L33, L35. Para cada microrganismo realizou-se ensaios exploratórios, afim de selecionar cepas capazes de converter glicerol no bioproduto de interesse. Cada ensaio foi realizado de acordo com as necessidades dos microrganismos. A máxima produção de xantana foi de 1,1 g/L de xantana. A avaliação da massa molar da goma se apresentou satisfatória e a espectrometria na região de infravermelho revelou similaridades entre a goma produzida e a goma comercial.

Palavras-chave: *Xanthomonas campestris*, goma xantana, biopolímero.

ABSTRACT

The present work used glycerol as a carbon source to obtain bio-based product from fermentation with microorganisms. It was used seven different microorganisms in order to convert glycerol into biopolymers. The microorganisms tested were *Lactobacillus casei shirota*, *Klebsiella sp.*, *Xanthomonas campestris*, and four yeasts from the Antarctic continent whose codes are L26, L32, L33, L35. For each microorganism exploratory tests were held in order to select strains capable of converting glycerol in bio-based product of interest. Each test was carried out according to the needs of microorganisms. The maximum production of xanthan was 1.1 g /L. The evaluation of the molar mass of the gum was satisfactory and spectrometry in the infrared region revealed similarities between the gum produced and the commercial ones.

Keywords: *Xanthomonas campestris*, xanthan, biopolymer.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

O glicerol é um subproduto gerado em grandes quantidades pelas indústrias de biodiesel. O excedente de glicerina gerado no ano de 2010 no Brasil foi de 240 mil toneladas (BIODIESELBR, 2010). Como o valor agregado deste subproduto é baixo, e o grande volume de material inviabiliza o descarte, devido aos danos ao meio ambiente, pesquisadores tentam desenvolver alternativas. Uma destas alternativas seria utilizar esse excedente de glicerol como fonte de carbono no processo de produção de biopolímeros e de biossurfactantes.

As gomas ou biopolímeros possuem a propriedade de formar soluções viscosas em meio aquoso ou géis e podem ser sintetizados por microorganismos, bactérias ou fungos. A goma mais comercializada no Brasil é a Xantana, produzida por bactérias do gênero *Xanthomonas*, que é usada nas indústrias de alimentos, medicamentos e cosméticos, entre outros.

Esta goma possui propriedades reológicas diferentes e estimadas, como:

- Alto grau de pseudoplasticidade,
- Elevada viscosidade mesmo em baixas concentrações,
- Compatibilidade e estabilidade com a maioria dos sais metálicos,
- Excelente solubilidade e estabilidade tanto em meio ácido quanto alcalino,
- Resistência à degradação em elevadas temperaturas,
- Resistência a oscilações de pH.

Tais propriedades das gomas são conferidas por sua estrutura ramificada, seu peso molecular, seu grau de substituintes (acetilação e piruvatação) e pelas condições de fermentação (composição do meio, rotação, temperatura) além de dependerem da linhagem genética das cepas utilizadas (MULCHANDANI *et al.*, 1988; ASHTAPUTRE e SHAH, 1995).

O Brasil não produz Xantana e todas as 3,5 mil toneladas que consome por ano tem que ser importadas a um custo de cerca de US\$ 18/kg. Se esta fosse produzida no Brasil, este custo diminuiria de 40% a 60% (UNESP, 2012).

A utilização do glicerol como uma fonte de carbono para a produção de biopolímero seria uma alternativa de menor custo para a produção da goma nacional. Além disso, evitaria que o grande volume de glicerol gerado pelas indústrias se tornasse um problema ambiental.

Por tudo que foi exposto acima, conclui-se que o glicerol é uma alternativa barata e ecológica para a produção de xantana.

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho é utilizar glicerol em fermentações como fonte alternativa de carbono para a produção de biopolímeros.

Além do objetivo geral, o trabalho aborda objetivos específicos de estudo, estes são:

- Investigar o consumo de glicerol, geração de biopolímeros por diferentes microrganismos em fermentações utilizando glicerol como fonte de carbono;
- Selecionar microrganismos com capacidade de consumir glicerol na produção de biopolímeros;
- Estudar o consumo de glicerol, crescimento celular e geração de produtos nas fermentações que utilizam os microrganismos selecionados;
- Caracterizar os produtos obtidos nas fermentações.

CAPÍTULO 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Propriedades do Glicerol

O glicerol (1,2,3-propanotriol), cuja estrutura molecular é representada pela Figura 3.1, é um líquido incolor com sabor adocicado, sem cheiro e muito viscoso, derivado de fontes naturais ou petroquímica (ZHOU *et al.*, 2008).

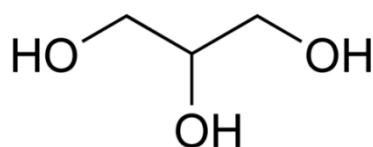


Figura 3.1- Estrutura do Glicerol

Fonte: ROSALAM e ENGLAND, 2006.

O glicerol teve seu nome derivado da palavra grega *glykys* (doce), mas é popularmente conhecido por “glicerina” e foi preparado pela primeira vez em 1779 pelo químico sueco Carl W. Scheele por meio do aquecimento de óleo de oliva com litargírio (PbO, usado no esmalte para cerâmicas). Na lavagem com água, obteve-se uma solução adocicada que formava, com a evaporação da água, um líquido pesado e viscoso ao qual seu descobridor chamou originalmente: "o princípio doce das gorduras".

O glicerol pode ser produzido por fermentação microbiana, por síntese química a partir de matérias-primas petroquímicas ou, mais tradicionalmente, subproduto da fabricação de sabão a partir de gorduras (AGARWAL, 1990).

Desde o final da década de 1940, o glicerol é produzido sinteticamente a partir de matérias-primas petroquímicas (LIDE, 2006). A Tabela 3.1 apresenta as propriedades físico-químicas do glicerol puro.

Tabela 3.1 - Propriedades físico-químicas do glicerol puro à 20°C.

Fórmula Química	C ₃ H ₈ O ₃
Massa Molecular	92,094 g.mol ⁻¹
Densidade	1,261 g.cm ⁻³
Viscosidade	1,5 Pa s
Ponto de Fusão	18,2 °C
Ponto de Ebulição	290 °C
Calorias	4,32 Kcal.g ⁻¹
Ponto de Fulgor	160 °C
Tensão superficial	64,00 mN m ⁻¹
Coefficiente de temperatura	-0,0598 mN (mK) ⁻¹

Fonte: LIDE, 2006.

O glicerol tem em sua estrutura três grupos hidroxila que possibilitam ligações de hidrogênio intra-moleculares e inter-moleculares, o que o torna higroscópico e solúvel em água. De acordo com estudos teóricos, em que se aplicam métodos de teoria de densidade funcional (DFT), existem 126 possíveis conformeros para o glicerol (CALLAM *et al.*, 2001).

Os métodos usados nesses estudos mostram que as contribuições entálpicas e entrópicas para a energia livre de Gibbs são importantes para determinar as preferências conformacionais e energéticas do glicerol de maneira precisa. Os grupos hidroxila formam uma estrutura cíclica com três ligações de hidrogênio internas no conformero de menor energia. Os comprimentos destas ligações são apresentados na Figura 3.2(A).

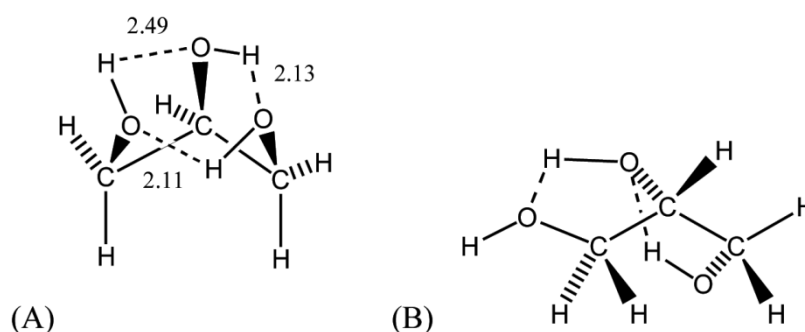


Figura 3.2- Comprimentos de ligação selecionados em Å para o glicerol de seu conformero de menor energia na fase gasosa (A) e líquida (B), conforme determinado por métodos DFT.

Fonte: CALLAM *et al.*, 2001.

A molécula da glicerina é estabilizada pela combinação das ligações de hidrogênio intra-moleculares e pela solvatação inter-molecular das hidroxilas. Considerando a solvatação,

o confôrmere com duas ligações de hidrogênio intra-moleculares, é o mais estável energeticamente, Figura 3.2(B) (CALLAM *et al.*, 2001).

Esta geometria permite diversos mecanismos de reações que têm aplicações práticas, como a produção de tintas, cosméticos, tabaco, alimentos, produtos farmacêuticos, papel, celulose, couro e tecido (BIEBL *et al.*, 1999).

3.2 - Produção de Glicerol

Durante a I Guerra Mundial, a demanda de glicerol para a fabricação de explosivos excedeu a oferta da indústria de sabão e, então, foi produzido pela primeira vez em escala industrial por fermentação, utilizando levedura sulfito-direcionais (PRESCOTT e DUNN, 1959).

O glicerol pode ser produzido, também, a partir de epiclodrina (Figura 3.3) obtida do propileno que é derivado de combustíveis fósseis. Além disso, pode ser produzido a partir do álcool alílico por via fermentativa (WANG *et al.*, 2001) e através de hidrogenação de carboidratos (ANDREWS e KLAEREN, 1991).

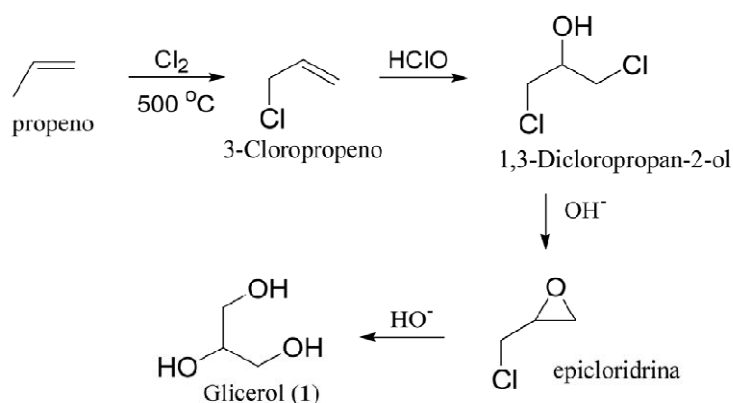


Figura 3.3- Esquema da produção de glicerol a partir da epiclodrina

Fonte: CALLAM *et al.*, 2001.

Cada vez mais, o glicerol é obtido a partir do excedente gerado na produção de biodiesel em vez de ser produzido diretamente pela indústria (PAGLIARO *et al.*, 2007).

Recentemente, houve um rápido crescimento na produção do biodiesel tanto em países desenvolvidos, como Alemanha, Itália, França, e os Estados Unidos, como em países em desenvolvimento, como Argentina, Brasil, Indonésia e Malásia (CARRIQUIRY, 2007).

O biodiesel é produzido por reação de transesterificação. Esta reação ocorre entre um triglicerídeos e um álcool, como o metanol e o etanol (MEHER *et al.*, 2006). Na Figura 3.4, é possível observar que o glicerol é um produto secundário do processo de produção de biodiesel.

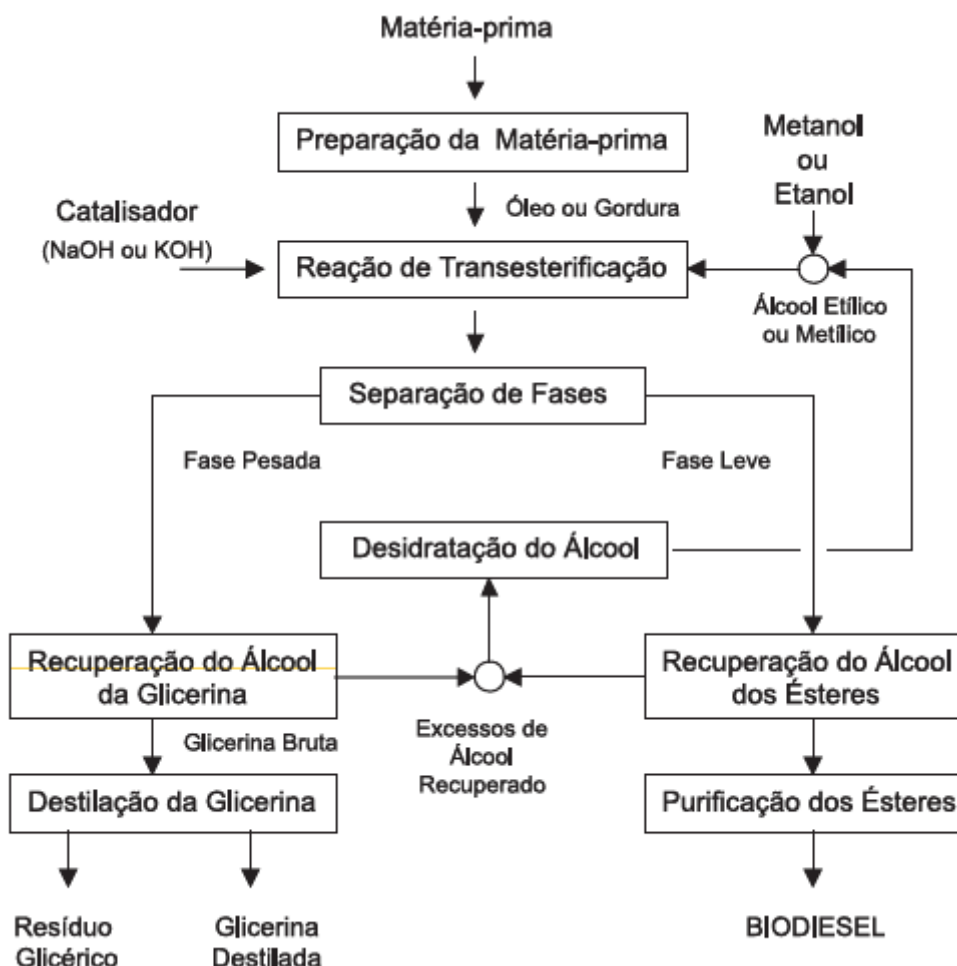


Figura 3.4- Processo de produção do biodiesel por transesterificação

Fonte: BRASIL, 2005.

Estudos indicam que a cada 90 m³ de biodiesel produzido pela reação de transesterificação são gerados 10 m³ de glicerina bruta (BRANDÃO *et al.*, 2010), que tem composição heterogênea, pois é constituída por graxas não convertidas pela reação de transesterificação, como ésteres, triglicerídeos, ácidos graxos e sabões. Além disso, é constituída por álcool, etanol ou metanol, e hidróxido (ASHBY *et al.*, 2006).

A proporção de impurezas presentes na glicerina bruta depende da origem do óleo, do tipo de leguminosa, do processo de transesterificação e da eficiência de separação (ASHBY *et al.*, 2006). O uso da glicerina purificada em processos farmacêuticos e químicos é limitado devido ao alto custo de purificação (MEHER *et al.*, 2006).

O montante anual de glicerol produzido durante a fabricação do biodiesel é de 1,9 Mil toneladas. Como o consumo é inferior à produção, o excedente de glicerol aumenta com o passar do tempo (HOOGENDOORN *et al.*, 2007).

3.3- Microrganismos capazes de utilizar glicerol como fonte de carbono

Muitos estudos sobre a metabolização do glicerol por diferentes bactérias têm sido realizados. As principais bactérias estudadas são: *Citobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Clostridium*. A assimilação do glicerol por estes microrganismos está relacionada à capacidade de sintetizar o 1,3-propanodiol (BOUVET *et al.*, 1995).

A conversão de glicerol realizada por *Acetobacter* e espécies de *Gluconobacter* (CLARET *et al.*, 1994) consiste na transformação deste substrato em di-hidroxiacetona (ITOH *et al.*, 1995).

Entretanto esta não é a única forma de se converter o glicerol. Em processos com *Propionibacterium* se produz o ácido propiônico (BORIES *et al.*, 2004) e com *Anaerobiospirillum* se chega ao ácido succínico (LEE *et al.*, 2001). Os produtos de interesse são obtidos de acordo com as modificações nas condições dos processos produtivos.

A fermentação da glicerina por *Klebsiella planticola*, isolada a partir do rúmen de veado, gera o etanol como o principal produto (JARVIS *et al.*, 1997). O butanal, por exemplo, é o principal produto da fermentação do glicerol pela bactéria *Clostridium pasteurianum* sob condições de cultura específicas (BIEBL, 2001).

A produção de hidrogênio a partir de etanol e glicerol pela mutação da bactéria *Enterobacter aerogenes* também foi descrita (ITO *et al.*, 2005). Além disso, outros estudos mostram que a fermentação do glicerol por *Escherichia coli* pode ser realizada anaerobicamente (DHARMADI *et al.*, 2006).

Estudos recentes têm usado glicerol como fonte de carbono para a produção de goma xantana (BRANDÃO *et al.*, 2010), além da produção de biossurfactantes a partir da fermentação do glicerol por *Pseudomonas* (DE SOUSA *et al.*, 2011).

3.4 - Biopolímeros

Polímeros são moléculas grandes caracterizadas pela repetição de unidades químicas denominadas de meros. Biopolímeros são uma classe de polímeros produzidos a partir de fontes renováveis, como o milho, celulose e cana-de-açúcar (SANTOS e FILHO, 2003).

O crescente interesse por biopolímeros é motivado pela escassez e alto preço do petróleo, além do impacto ambiental determinado pela sua extração e refino (BRITO *et al.*, 2011).

Os biopolímeros produzidos por microrganismos, geralmente, são compostos atóxicos, biodegradáveis, produzidos extracelularmente por microrganismos não patogênicos através de fermentações em batelada com eficiência aproximada de 50 % na conversão de substrato (KAY *et al.*, 1993).

Polímeros biodegradáveis são materiais de fácil degradação em compostos mais simples (com baixa massa molecular) por meio da ação de microrganismos (SANTOS e FILHO, 2003).

As gomas são substâncias poliméricas usualmente utilizadas em solventes e que, mesmo a baixas concentrações, são capazes de formar soluções altamente viscosas (FENTANES, 1985).

3.5- Hidrocolóides

Hidrocolóides são polímeros de cadeia longa e alto peso molecular, extraídas de algas marinhas, sementes, exsudados de árvores e de colágeno animal, ou ainda, obtidas por biotecnologia utilizando microrganismos. Algumas são produzidas por síntese microbiana e outras pela modificação de polissacarídeos naturais. Geralmente, os hidrocolóides são solúveis em água e têm propriedades espessantes e gelificantes dependendo das condições em que foram empregados (STAUFFER, 1985).

A goma guar, por exemplo, forma dispersões coloidais quando hidratada em água fria e é muito utilizada em produtos de panificação para aumento de viscosidade e de volume (GOLDSTEIN *et al.*, 1973)

As gomas ou hidrocolóides são amplamente utilizados como aditivos na tecnologia de alimentos, pois melhoram a textura, retardam a retrogradação do amido e aumentam a retenção de umidade (ROJAS *et al.*, 1998).

A incorporação de hidrocolóides, em soluções de amido, modifica as propriedades reológicas e aumenta a viscosidade das soluções. Por este motivo, as gomas são utilizadas para estabilizar produtos como pudins e sobremesas (SUDHAKAR *et al.*, 1996).

3.6 - Gomas de origem microbiana

Alguns microrganismos possuem a habilidade de sintetizar e secretar polissacarídeos (exopolissacarídeos). Exopolissacarídeos (EPS) sintetizados por células microbianas variam muito em sua composição e, conseqüentemente, em suas propriedades físicas e químicas (SUTHERLAND, 2001). Os principais EPS com aplicações industriais são: xantana, gelana, dextrana, alginato, Curdlana e pululana.

A dextrana, primeiro polissacarídeo produzido em escala industrial, tem cadeia ramificada e é sintetizada por *Leuconostoc mesenteroides* utilizando a sacarose como fonte de carbono. Além disso, a dextrana pode ser produzida por via enzimática usando enzimas purificadas em meio contendo substrato (PADILHA, 1997).

A goma gelana é um heteropolissacarídeo de alto peso molecular sintetizado pela bactéria *Sphingomonas elodea*, também conhecida como *Pseudomonas elodea*. A família das gelanas é constituída pelas gomas gelana, welana e ransana, S-198 e S-657. As três primeiras são produzidas comercialmente e possuem esqueletos poliméricos idênticos formados por unidades de glicose, ácido glucurônico e raminose. A gelana é um agente gelificante produzido e comercializado com o nome de Gelrite (LOPES e ANDRADE, 1995; NAKAMURA *et al.*, 1996).

Welana e Ransana são exopolissacarídeos ramificados que não formam géis e produzem soluções altamente viscosas e termoe estáveis. A primeira é comercializada pela Kelco sob a marca Biozan (LOPES e ANDRADE, 1995).

O termo "alginato" refere-se a um grupo de polissacarídeos sintetizados naturalmente na parede celular de algas marinhas marrons (*Phaeophyceae*), na qual existem como sal misto de cálcio-sódio-potássio do ácido algínico (CLEMENTI *et al.*, 1995; OAKENFULL, 1987). Alginatos são muito utilizados nas indústrias de alimentos como agentes estabilizantes, espessantes e gelificantes. Além disso, são utilizados pelas indústrias farmacêuticas e biotecnológicas na imobilização celular (ONSOYEN e CARBOHYDR, 1996; SMIDSROD e SKAJAK, 1990).

Os géis de alginato são capazes de formar micro-leitos e incorporar enzimas ou células vivas, o que tem despertado interesse na indústria de alimentos, na biotecnologia, e no setor biomédico (SMIDSROD e SKAJAK, 1990).

Atualmente, a produção de alginato depende do cultivo de algas marinhas marrons, mas várias bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e *Azotobacter* também produzem alginato (COTE *et al.*, 1988).

A goma curdlana é um polissacarídeo microbiano extracelular, produzida pela fermentação de cepas de *Alcaligenes faecalis* e por algumas espécies de *Agrobacterium* e *Rhizobium*, e é formada exclusivamente por unidades de β -D-glicose (CUNHA, 2002). Nas indústrias, este biopolímero pode ser utilizado como gelificante em ração animal, ligante para tabaco e como agente imobilizador de enzimas.

A pululana, produzida pelo fungo *Aureobasidium pullulans*, é uma goma muito utilizada em poços de petróleo por ser um fluido pseudoplástico. Outras aplicações se valem de seu comportamento como excelente adesivo, espessante, estabilizante e agente de revestimento. Quando incorporada à dieta humana promove o crescimento seletivo de *Bifidobacterium sp* nos intestinos (PICTON *et al.*, 1995).

A Tabela 3.2 apresenta as gomas de origem microbiana mais utilizadas nas áreas industriais (ASHTAPUTRE e SHAH, 1995; GLAZER e NIKAIDO, 1995).

Tabela 3.2- Gomas microbianas e suas aplicações industriais.

<u>Gomas</u>	<u>Microrganismo</u>	<u>Composição</u>	<u>Aplicações Industriais</u>
Xantana	<i>Xanthomonas campestris</i>	β -D-glicose, manose e ácido glucurônico	Espessante, emulsificante, estabilizante, agente de suspensão
Dextrana	<i>Acetobacter sp.</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Streptococcus mutans</i>	α -D-glicose	Expansor sanguíneo
Alginato	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Azotobacter vinelandii</i>	Ácidos D-manurônico e L-gulurônico	Agente gelificante
Curdlana	<i>Alcaligenes faecalis</i>	β -D-glicose	Agente gelificante
Gelana	<i>Sphingomonas elodea</i>	D-glicose, raminose e ácido glucurônico	Agente gelificante
Pululana	<i>Aureobasidium pullulans</i>	α -D-glicose e maltotriose	Material plástico

3.7- Goma Xantana

A xantana é um biopolímero de grande importância industrial. Foi descoberta em 1950 no Northern Regional Research Laboratories (NRRL), no departamento de Agricultura dos Estados Unidos (MARGARITIS e ZAJIC, 1978).

A goma produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, foi amplamente estudada. Tais estudos, realizados por diversos laboratórios durante a década de 1960, chegaram a um produto semi-comercial batizado com nome de Kelzan sob a responsabilidade da Kelco. No entanto, a produção em larga escala só teve início em 1964. Atualmente, os principais produtores da xantana são: Melrck e Pfizer (EUA), Rhône Poulenc (França) e Jungbunzlauer (Áustria) (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000). Este heteropolissacarídeo possui estrutura primária com repetidas unidades de pentassacarídeos, formados por duas unidades de glicose, duas unidades de manose e uma unidade de ácido glucurônico, como mostra a Figura 3.5.

A via de Entner-Doudoroff é a principal rota metabólica para a formação da goma xantana, pelas bactérias *Xanthomonas campestris*. Esta via metabólica cataboliza 80% da glicose, disponível no meio, em piruvato. Em seguida, o piruvato passa pelo ciclo tricarboxílico e pela via da pentase-fosfato que metaboliza a glicose remanescente (Figura 3.6) (ROSALAM e ENGLAND, 2006).

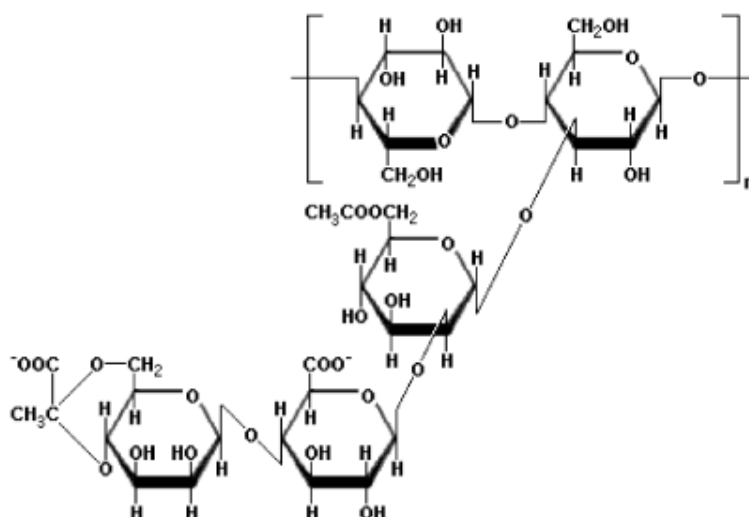


Figura 3.5- Estrutura do polissacarídeo extracelular formado pela *Xanthomonas campestris*

Fonte: COLEGROVE, 1983.

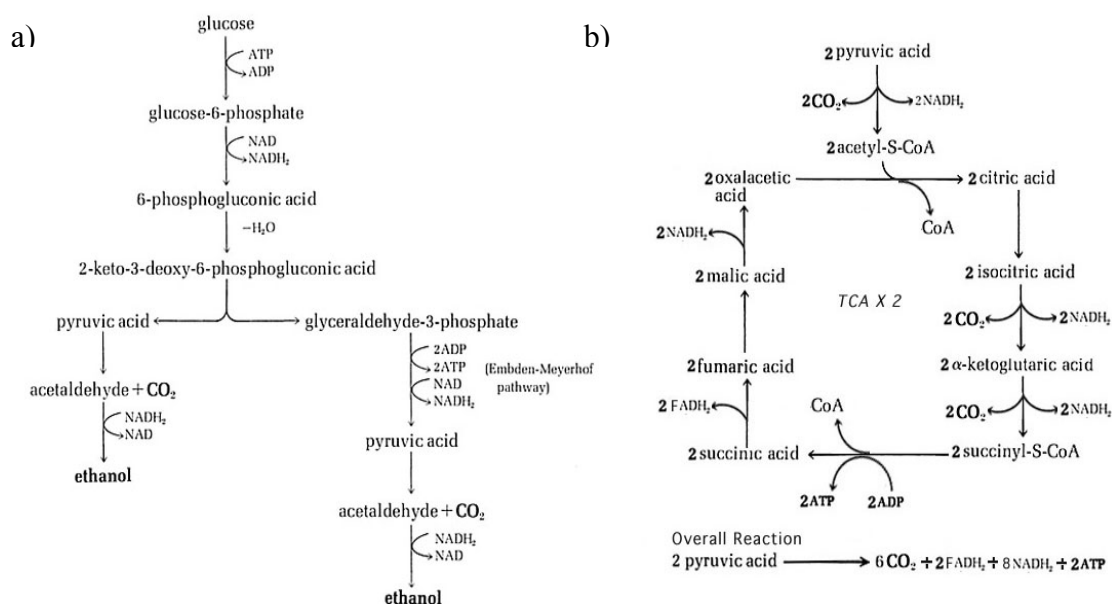


Figura 3.6- (a) Via Entner-Doudoroff; (b) Ciclo do ácido tricarboxílico.

Fonte: ROSALAM e ENGLAND, 2006

A Tabela 3.3 mostra a composição média dos diferentes polissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Xanthomonas* (KENNEDY e BRADSHAW, 1984).

Tabela 3.3- Composição média dos diferentes polissacarídeos produzidos por diferentes tipos de *Xanthomonas*

Bactéria	D-Glicose	D- Manose	Ácido D-Glicosídico	Piruvato	Acetato
X.campestris	30,1	27,3	14,9	7,1	6,5
X.fragaria 1822	24,6	26,1	14	4,9	5,5
X.gummisudans 2182	34,8	30,7	16,5	4,7	10
X.juglandis 411	33,2	30,2	16,8	6,9	6,4
X. phaseoli 1128	30,9	28,6	15,3	1,8	6,4
X. vasculorum 702	34,9	30,2	17,9	6,6	6,3

O peso molecular da goma xantana varia de 9×10^5 a $2,50 \times 10^6$ Daltons. O peso molecular é dependente da associação entre cadeias que formam agregados de cadeias individuais. A variação das condições de fermentação influencia o peso molecular da goma xantana (WHISTLER e BeMILLER, 1993; ZHANG e CHEN, 2010; WANG *et al.*, 1990).

Segundo Moreira e colaboradores (2003) o mecanismo de síntese da xantana é mais complexo que de outras gomas e percorre as seguintes etapas:

- 1) síntese de precursores UDP-glicose, UDP-ácido glicurônico e GDP-manose, a partir da conversão de açúcares simples,
- 2) transferência dos monossacarídeos a partir do nucleotídeo correspondente para o lipídeo carregador localizado na membrana da célula, formando a unidade pentassacarídica repetitiva,
- 3) adição de grupos acetil e piruvato, que são obtidos a partir de acetil-coA e fosfoenolpiruvato, respectivamente, e
- 4) polimerização e excreção do polissacarídeo.

Os estágios finais da secreção de EPS a partir da membrana citoplasmática que seguem desde a passagem através do periplasma até a excreção o ambiente extracelular ainda são pouco elucidados (SUTHERLAND, 1997; SUTHERLAND, 2001).

3.8 - Microrganismos Produtores de Goma Xantana

Os polissacarídeos do tipo muco, produzidos por microrganismos, são de grande interesse devido a fácil recuperação da goma, o que lhes confere maior potencial de comercialização (MARGARITIS e PACE, 1985).

A goma xantana é produzida por bactérias do gênero *Xanthomonas*. Este gênero é composto por um grupo diversificado e economicamente importante de fitopatógenos bacterianos. Embora esse gênero seja tão diversificado, a única espécie utilizada na produção de goma em escala comercial é a *Xanthomonas*. *Xanthomonas campestris* são bactérias patogênicas que podem infectar e provocar a decomposição de diversos tipos de plantas e ervas daninhas. As células das *Xanthomonas* são livres, gram-negativas, e possui um único flagelo polar (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000), como mostra a Figura 3.7.

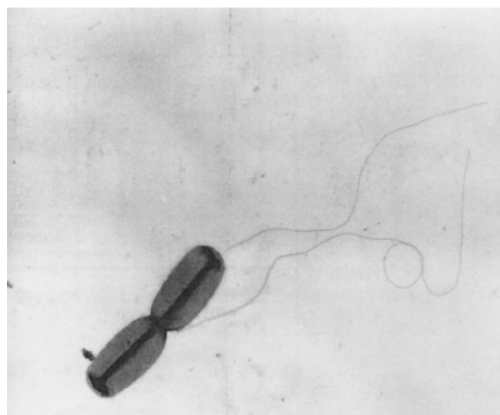


Figura 3.7- Micrografia eletrônica de transmissão de *X. campestris* (x12 000).

Fonte: GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000.

O microrganismo é estritamente aeróbico, pois necessita de oxigênio como terminal receptor de elétrons. As colônias, formadas pela *Xanthomonas campestris*, tem coloração amarelada e aspecto viscoso (BRADBURY, 1984). Entretanto, pigmentos amarelos podem não estar presentes em cepas degradadas de *Xanthomonas* (GARCIA-GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000)

3.9 - Reologia

Reologia é a ciência que estuda a maneira como os materiais se deformam, quando sofrem ação de determinada tensão. Esse conhecimento é fundamental para o controle de processos industriais, projetos de equipamentos, controle de qualidade e aceitação do produto (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE REOLOGIA, 2013).

Tipos de reômetros e viscosímetros, modelos matemáticos, medidas do comportamento viscoelásticos de fluidos, otimização de resultados dos ensaios reológicos e aplicações tecnológicas de diversos materiais compõe o objeto de estudo da reologia (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE REOLOGIA, 2013).

Os polímeros podem, então, ser avaliados de acordo com suas propriedades reológicas, viscosidade e viscoelasticidade, uma vez que estas propriedades determinam a qualidade do polímero (AMANULLAH *et al.*, 1996; MARCOTTE *et al.*, 2001).

As propriedades reológicas das soluções de xantana podem variar de acordo com a cepa e variação das colônias das quais se obtêm o biopolímero (MOREIRA *et al.*, 2001).

Uma das propriedades da xantana é formar soluções altamente viscosas quando dissolvida em água, mesmo em baixas concentrações (ROCKS, 1971; JEANES, 1974). Em soluções altamente concentradas, no entanto, apresenta propriedades de interações moleculares de fraca gelatinização (JEANES, 1974).

O biopolímero é amplamente utilizado como agente espessante, estabilizante e emulsificante, pois possui grande estabilidade, pseudoplasticidade e forma soluções aquosas de alta viscosidade (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

A viscosidade, das soluções de goma xantana, é estável, uma vez que não apresenta grandes variações com mudanças de pH, temperatura ou forças iônicas (ROCKS, 1971). Entretanto, a estabilidade das soluções, em relação ao pH, depende da concentração de goma

na solução. Por exemplo, em uma solução com concentração de 1% de goma, a viscosidade é estável quando o pH varia entre 1,5 e 11,0 enquanto em soluções de 0,25% a viscosidade é menos estável e alcança seu máximo valor quando o PH varia entre 6,0 e 8,0 (CHALLENGE, 1993).

A xantana, quando comparada com outras gomas, pode ser considerada resistente à degradação por calor, pois não sofre mudanças de viscosidade quando exposta a elevadas temperaturas por longos períodos. Além disso, soluções de xantana são estáveis sob condições de frio (ROCKS, 1971). No entanto, segundo Challen (1993), o efeito da temperatura sobre a viscosidade das soluções também é dependente da concentração de goma.

A presença de sais nas soluções de xantana melhora a resistência da goma à degradação pelo calor e pode causar alterações em seu comportamento reológico. Enquanto a adição de sais em baixas concentrações pode causar a uma leve queda de viscosidade, em altas concentrações pode levar ao aumento da viscosidade (ROCKS, 1971).

A viscosidade pode variar, ainda, de acordo com as proporções entre glicose, manose e ácido glicurônico presentes na molécula da goma. A diferença nas proporções destes compostos se deve às diferenças entre as espécies empregadas na obtenção da xantana (MOREIRA, 2002). Além disso, a viscosidade das soluções de xantana pode variar de acordo com o meio de cultura, aeração, agitação, pH, temperatura e tempo de fermentação (MOREIRA, 2001).

3.10- Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR)

A região espectral do Infravermelho Próximo (NIR) corresponde a região do espectro eletromagnético que vai de 750 nm a 2500 nm.

A absorção de radiação eletromagnética, nessa região, ocorre quando a energia da radiação tem o mesmo valor da diferença de energia entre dois estados vibracionais, logo o processo está relacionado à ressonância entre a diferença de níveis de energia da molécula e a radiação eletromagnética (PASQUINI, 2003).

A Espectroscopia no Infravermelho Próximo tem sido frequentemente utilizada como um método analítico que fornece resultados suficientes para determinação de grupos funcionais orgânicos (PASQUINI, 2003).

CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Microrganismos

No presente estudo foram testados oito diferentes microrganismos: *Lactobacillus casei shirota*, *Klebsiella.sp*, *Xanthomonas campestris*, e quatro levedura de código L26, L32, L33, L35.

A *X.campestris* utilizada foi fornecida pela Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello e trata-se da cultura *Xanthomonas campestris pv. campestris* NRRL B-1459.

O *Lactobacillus casei shirota* utilizado nos ensaios foi obtido por isolamento de produto comercial (Yakult).

A *Klebsiella. sp* foi isolada de soro de leite. Este microrganismo foi identificado em laboratório como uma *Klebsiella. sp*.

As leveduras *L26*, *L32*, *L33* e *L35* são originárias do continente antártico.

4.2 - Meios de Manutenção de microrganismo.

O microrganismo selecionado, *Xanthomonas campestris pv. campestris*, foi mantido em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio YMA com ágar (Tabela 4.1). O pH do meio foi ajustado para 6,0 e a esterilização realizada a 110 °C por 20 min. A manutenção da cultura foi feita a cada 15 dias e, após o crescimento dos microrganismos em estufa (30°C) por 48 horas, foi mantida sob refrigeração.

Tabela 4.1- Composição do Meio YMA com ágar

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	10,0
Extrato de Levedura	3,0
Extrato de Malte	3,0
Peptona	5,0
Ágar	15,0

O microrganismo *Lactobacillus casei shirota*, isolado do produto comercial, e a *Klebsiella. sp* foram mantidos em tubos de ensaio contendo 9 mL de meio MRS líquido, apresentado na Tabela 4.3, no entanto na manutenção da *Klebsiella. sp* a glicose foi

substituída por lactose na mesma concentração. O pH dos meios foi ajustado para 7,0 e a esterilização realizou-se a 110°C por 20 min. A manutenção das culturas foi feita a cada 20 dias e , após o crescimento dos microrganismo em temperatura ambiente por 48 horas, foram mantidas em refrigeração.

Tabela 4.2- Composição do Meio MRS líquido

Componentes	Concentração (g/L)
Peptona	10,0
Extrato de Carne	10,0
Extrato de Levedura	5,0
Glicose	20,0
Tween 80	1,0
Fosfato de Potássio	2,0
Acetato de Sódio	5,0
Citrato de Amônio	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05

4.3 - Matéria-Prima

Utilizou-se como principal matéria prima glicerol comercial (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) com pureza de 99,5%.

4.4 - Composição dos Inóculos e dos Meios de Produção

Os meios utilizados na preparação do inóculo e nas fermentações, para produção de xantana, foram compostos com os meios apresentados na Tabela 4.4. O meio de produção mais completo (Meio B) foi extraído de Lima (1999). As demais composições dos Meios C e D foram investigadas por exclusão de algumas substâncias. O inóculo era preparado com glicose e os meios para fermentação foram preparados utilizando variadas concentrações de glicerol.

Tabela 4.3- Componentes dos meios de produção de xantana e suas respectivas concentrações

Componentes dos meios de produção	10 componentes Meio B	6 componentes Meio C	4 componentes Meio D
Glicose	10	10	10
*Glicerol	-	-	-
Extrato de levedura	3,0 g	3,0 g	3,0 g
ácido cítrico	3,0 g	3,0 g	-
NH ₄ NO ₃	0,86 g	0,86 g	0,86 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g	-	-
Na ₂ HPO ₄	2,5 g	2,5 g	2,5 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g	2,5 g	2,5 g
Na ₂ SO ₄	1,13 g	1,13 g	-
MnCl ₂	0,03 g	-	-
Ca(OH) ₂	0,01 g	-	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g	-	-
água destilada	1000mL	1000mL	1000mL

*Foram realizados diferentes testes variando a concentração de glicerol : 2, 4, 6, 8, 10, 40, e 60 g/L

4.5 - Produção de Goma Xantana

4.5.1 – Produção de Goma Xantana em reatores de bancada

Os experimentos foram realizados em duas etapas: preparo do inóculo e produção de goma.

O inóculo foi preparado utilizando o meio descrito na Tabela 4.4 – meio D, 100ml de meio era transferido para erlenmeyers com capacidade de 500 mililitros e esterilizados a 110 °C por 20 minutos. Os inóculos foram preparados por fermentação em mesa giratória a 120 rpm, em temperatura ambiente, por 16 horas. Utilizou-se como inóculo 20% (v/v).

A produção da goma, também, foi realizada em erlenmeyers com capacidade de 500 mililitros, ao qual foi adicionado 60 mL do meio de produção (descrito na Tabela 4.4 – meio D com glicerol). A esterilização foi realizada a 110°C por 20 minutos. Então, acrescentou-se 10 ml do inóculo (20% v/v;) e retirou-se 10 mL do meio com auxílio de uma pipeta esterilizada para realização da dosagem de glicerol. As fermentações foram realizadas em mesa agitadora a 120 rpm, em temperatura ambiente, por 48 horas.

4.5.2- Produção de Xantana em Batelada Alimentada

A batelada alimentada processou-se em duas etapas: preparo do inóculo e produção de goma.

O inóculo foi preparado utilizando o Meio D, descrito na Tabela 4.4. Deste, 100 mL foi transferido para erlenmeyers com capacidade de 500 mililitros e esterilizados a 110°C por 20 minutos. Os inóculos foram preparados por fermentação em mesa giratória a 120 rpm, em temperatura ambiente, por 48 horas. Utilizou-se como inóculo 10% (v/v).

A produção de goma, em batelada alimentada, processou-se em erlenmeyers esterilizados com capacidade de 500 mililitros. Inicialmente o frasco recebeu 10 mL do inóculo e nas 48 horas subseqüentes adicionou-se 90 mL do meio de produção (Meio D) com o auxílio de uma bomba de baixa vazão (Figura 4.1). As concentrações de glicerol testadas foram: 8, 16 e 24 g/L. As fermentações foram realizadas a 120 rpm, em temperatura ambiente, por 48 horas.



Figura 4.1- Processo em batelada alimentada

4.6- Análises de produção de xantana

As análises realizadas para a produção de goma xantana seguiram o fluxograma descrito na Figura 4.2:

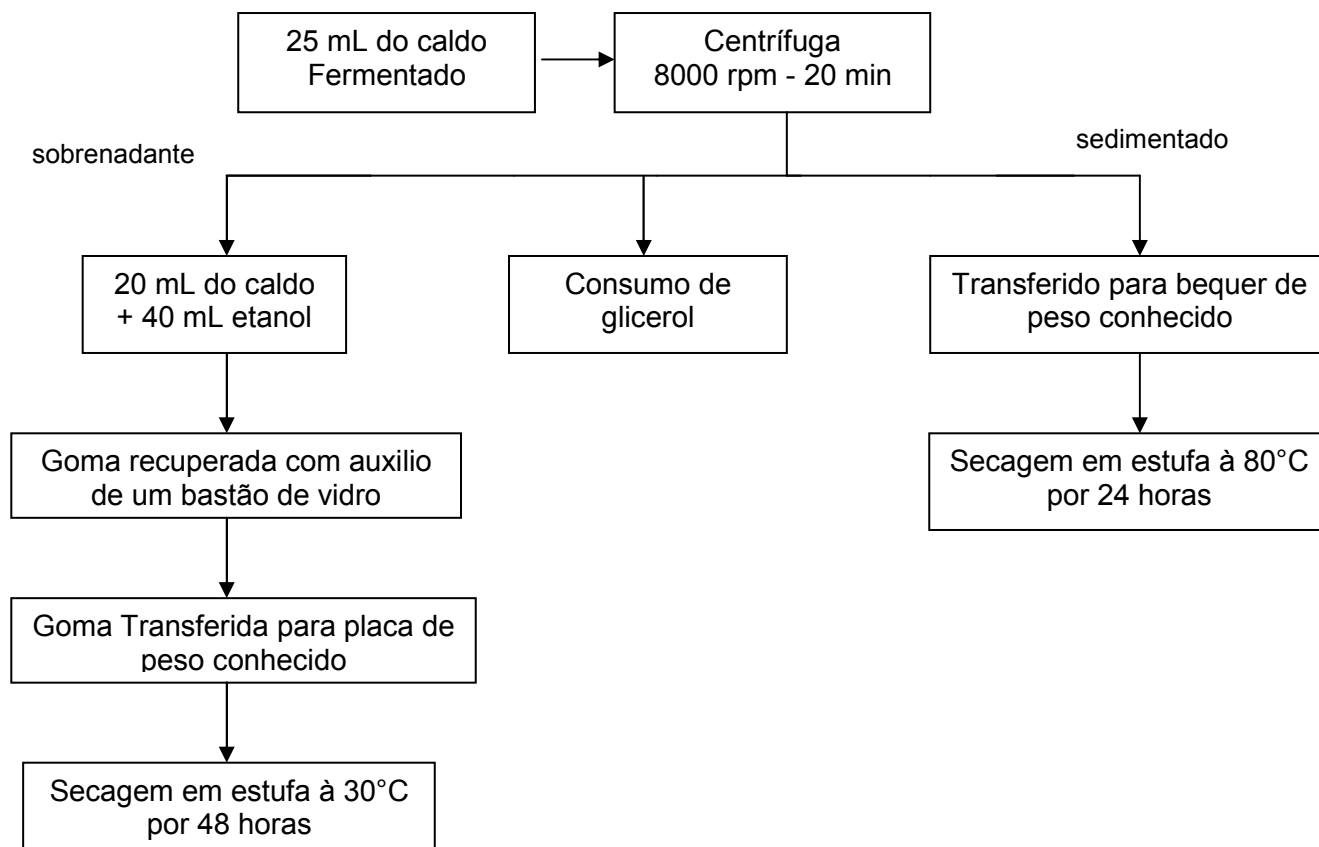


Figura 4.2: Fluxograma das análises de produção de goma Xantana

4.6.1 – Determinação da Biomassa Através de Massa Secas

O caldo foi centrifugação a 8000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi transferido para um béquer e o sedimentado (células) foi lavado com água destilada e transferido para um béquer de peso conhecido. Este béquer foi colocado em estufa à 80°C por 24 horas para secagem, pesado novamente para o cálculo a massa seca em g/L.

4.6.2 – Determinação do consumo de Glicerol

O consumo de glicerol foi calculado utilizando kits de detecção de triglicérides da marca DOLES, seguindo as orientações do fabricante. Antes de se proceder as análises foi feita a curva de calibração para o Kit (Apêndice 1).

4.6.3– Recuperação e Purificação da Goma

A recuperação da goma foi realizada com o sobrenadante separado no processo de centrifugação, descrito na seção 4.6.1. Para a precipitação da goma foi adicionado 40 mL de etanol em 20 mL de sobrenadante e com o auxílio de um bastão de vidro agitou-se levemente a solução para recuperação da goma.

A lavagem da goma foi obtida mantendo-a em contato com etanol 95,5% por 10 minutos. Tal procedimento foi repetido até total limpeza da xantana. O produto foi transferido para um placa de Petri, de peso conhecido, recoberta com filme plástico, com pequenos furos, e mantido em estufa à 30°C por 48 horas.

4.6.4 – Espectroscopia de Infravermelho da Goma Produzida

O espectro de infravermelho (IV) foi uma metodologia adotada para detectar similaridades ou diferenças entre as estruturas químicas da goma produzida e da goma comercial. Esta análise foi realizada com a amostra da goma produzida em laboratório e da goma comercial em Espectrômetro de infravermelho.

O método consiste na utilização de espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) gravadas com Bruker Equinox 55, equipado com um detector KBr DLATGS. Cada análise foi feita realizando 100 leituras no intervalo de comprimento de onda de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . O pó puro diluído, de cada uma das gomas, foi prensado em discos de KBr (cerca de 5% m/m) e utilizados para a análise de vibrações esqueléticas. O software (OPUS / IR) fornecido pela Bruker foi utilizado para as análises.

A espectroscopia de infravermelho fornece informações sobre as características estruturais das moléculas e grupos funcionais presentes nas amostras .

O espectrogramas da goma produzida e da xantana comercial serão úteis para a comparação dos picos presentes nos gráficos e, assim, obter uma prova de identificação das estruturas moleculares dos compostos.

4.6.5 – Determinação de Massa Molar pelo método da viscosidade capilar

O método da viscosidade capilar foi utilizado para determinar a massa molar do polímero xantana obtido por fermentação, com uso de glicerol como fonte de carbono, na condição de 8 g/L de glicerol, 48 horas de preparo do inóculo, 72 horas de fermentação e uso do microorganismo *X.campestris*.

Foi determinada a viscosidade intrínseca (η) das soluções poliméricas e, pela equação de Mark Houwink (Equação 4.1), esta viscosidade foi relacionada com a massa viscosimétrica média.

$$\eta = K(M)^a \quad (4.1)$$

Sendo que “K” e “a” são constantes de dependem do polímero, do solvente e da temperatura utilizada no ensaio da viscosimetria.

O ensaio de viscosimetria capilar foi realizado à 25 °C, utilizando-se água como solvente e as constantes “K” e “a” para a água a 25 °C são: $K \times 10^3 = 1,7$ mL/g e $a = 1,14$ (MILAS *et al.*, 1985, ZHANG e CHEN, 2009).

A viscosidade intrínseca (η) foi obtida pela extrapolação das viscosidades inerentes (η_{iner}) e específicas reduzidas (η_{espred}) de soluções diluídas para concentração zero. A partir da viscosidade intrínseca, e utilizando a equação de Mark Houwink (Equação 4.1), a massa molar pode ser calculada.

Os valores de viscosidade específica reduzida ($\eta_{\text{esp red}}$) e de viscosidade inerente (η_{iner}) foram gerados em um gráfico em função da concentração de xantana em água. Extrapolando-se a reta para uma concentração tendendo a zero, obteve-se, neste ponto, o valor da viscosidade intrínseca (η), conforme mostra a Equação 4.2.

$$\eta = \lim_{c \rightarrow 0}(\eta_{\text{iner}}) = \lim_{c \rightarrow 0}(\eta_{\text{esp-red}}) \quad (4.2)$$

Os valores das viscosidades relativas, específicas, específicas reduzidas e inerentes foram obtidos pelas equações descritas na Tabela 4.7:

Tabela 4.4- Equações das viscosidades utilizadas no cálculo da massa molar segundo a equação de Mark Houwink

Viscosidade	Equação	Variáveis
Viscosidade relativa	$\eta_{\text{rel}} = \frac{t}{t_0}$	t= tempo de escoamento da solução t ₀ = tempo de escoamento da água
Viscosidade específica	$\eta_{\text{esp}} = \eta_{\text{rel}} - 1 = \left(\frac{t - t_0}{t_0} \right)$	
Viscosidade específica reduzida	$\eta_{\text{esp-red}} = \frac{\eta_{\text{esp}}}{c}$	c= concentração da solução
Viscosidade inerente	$\eta_{\text{iner}} = \frac{\ln(\eta_{\text{red}})}{c}$	

As amostras utilizadas nas determinações das massa molares pelo método da viscosidade capilar foram preparadas utilizando solução polimérica a 1%. Esta solução foi preparada após a secagem da goma em estufa a 30 °C. Esta foi triturada e hidratada. O preparo da solução ocorreu sob agitação magnética durante, aproximadamente, 10 horas. Esta solução 1% foi, então, diluída para atingir as concentrações apresentadas na Tabela 4.8.

Tabela 4.5- Concentrações das soluções utilizadas nas determinações das massas molares

Concentrações das soluções preparadas pela fermentação de <i>X.campestris</i> (g/mL)
0,0030
0,0020
0,0013
0,0008

O ensaio foi realizado utilizando um viscosímetro de Oswald (Figura 4.3). A água e as soluções de xantana (Tabela 4.8) foram inseridas no tubo de Oswald ($n = 100$ e $K = 0,04$). O tempo que o solvente e as soluções levaram pra escoar do ponto A até o ponto B, foi cronometrado ($t =$ tempo de escoamento da água e $t_0 =$ tempo de escoamento das soluções).



Figura 4.3- Viscosímetro de Oswald

4.6.6 – Avaliação do Comportamento Reológico da xantana

A reologia da goma xantana foi obtida utilizando uma solução polimérica a 1%. Esta solução foi preparada após a secagem da goma em estufa a 30 °C. Esta foi triturada e hidratada. O preparo da solução ocorreu sob agitação magnética durante, aproximadamente, 10 horas.

A reologia foi determinada utilizando um reômetro Brookfield RVDVIII. Seguindo o modelo de Ostwald de Waele, ou *power-law*, foram utilizados os dados de tensão cisalhante, medidos a partir de taxas de deformação.

Com os valores de τ e γ , avaliados estatisticamente por uma estimativa não linear, obteve-se K (índice de consistência) e n (índice de comportamento) para as soluções de xantana na concentração de 1%. Assim, a viscosidade absoluta para um fluido “*power-law*” foi determinada a partir da Equação 4.3:

$$\mu_a = \frac{\tau}{\gamma} = K (\gamma)^{n-1} \quad (4.3)$$

CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1- Seleção dos microrganismos

Foram utilizados oito diferentes microrganismos com o objetivo de converter glicerol em biopolímeros. Os microrganismos testados foram: *Lactobacillus casei shirota*, *Klebsiella sp.*, *Xanthomonas campestris*, e quatro leveduras de códigos L26, L32, L33, L35.

As leveduras não foram promissoras no consumo de glicerol para a conversão em biopolímeros.

5.1.1- Ensaio com *Lactobacillus casei shirota*

Testes exploratórios foram realizados a fim de se obter os bioprodutos de interesse. Nestes ensaios utilizou-se três meios de fermentação diferentes entre si quanto as concentrações de fonte de carbono e de glicerol, como mostra a Tabela 5.1.

Tabela 5.1- Composição dos meios utilizados nos testes com *Lactobacillus*

Meios Fermentativos	Composição
A1	MRS* puro
A2	1/2 MRS + 1/2 Glicerol
A3	3/4 MRS + 1/4 Glicerol

*A glicose foi substituída por glicerol a 20 g/L

As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers com capacidade de 250 mL. A quantidade de meio fermentativo colocado em cada reator de bancada foi de 50 mL. Foi adicionado, então, o microrganismo e as fermentações ocorreram por 48 horas em mesa giratória à temperatura ambiente.

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.1:

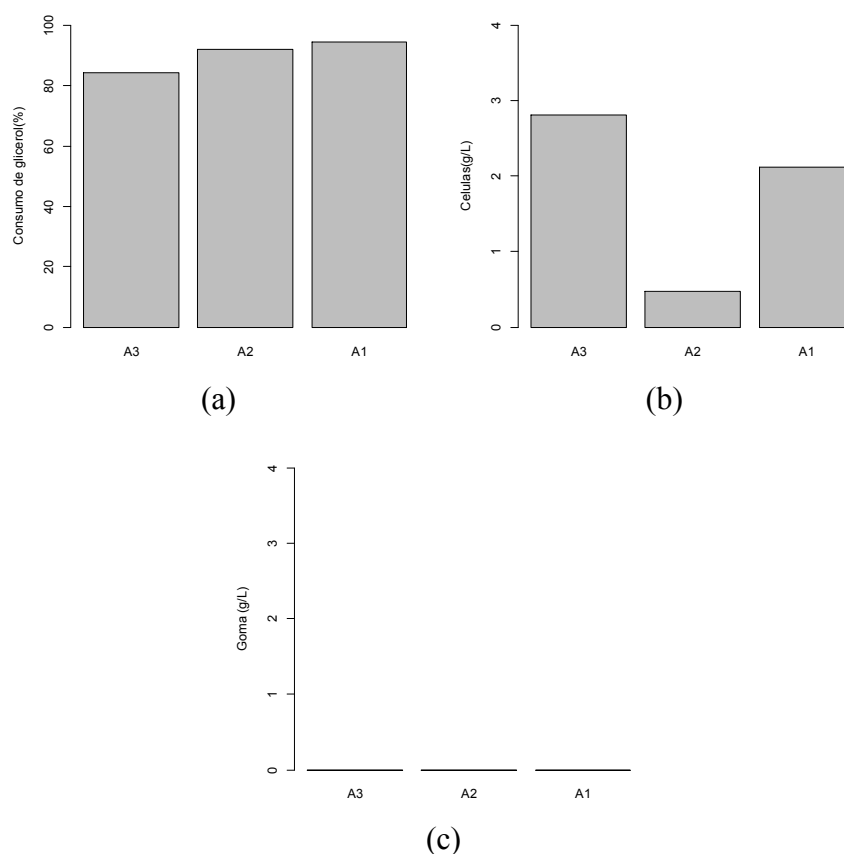


Figura 5.1- Resultados dos testes exploratórios com *Lactobacillus*: a) Consumo de glicerol para os meios fermentativos A₁, A₂ e A₃; b) Concentração de células após a fermentação; c) Quantidade polímeros formado.

O *Lactobacillus* consome glicerol, o que pode ser confirmado pela Figura 5.1.a, entretanto não é capaz de formar biopolímeros, Figura 5.1.c. Logo, esse microrganismo não foi considerado promissor para a bioconversão do glicerol no bioproduto desejado.

5.1.2- Ensaio com Microrganismo "x" - *Klebsiella*

Os testes exploratórios com *Klebsiella sp.* foram realizados em Erlenmeyer com capacidade de 250 mL. A quantidade de meio fermentativo em cada Erlenmeyer foi de 50 mL. Em cada um dos reatores foi colocado o microrganismo, e as fermentações ocorreram por 48 horas em mesa giratória à temperatura ambiente. Nestes testes foram utilizados três diferentes tipos de meio fermentativo, cada um contendo uma quantidade diferente de glicerol e lactose, conforme Tabela 5.2:

Tabela 5.2- Composição dos meios utilizados nos testes com *Klebisiella sp*

Meios Fermentativos	Composição
B1	Glicerol puro
B2	1/2 MRS + 1/2 Glicerol
B3	3/4 MRS + 1/4 Glicerol

Os resultados obtidos neste teste exploratório estão apresentados na Figura 5.2:

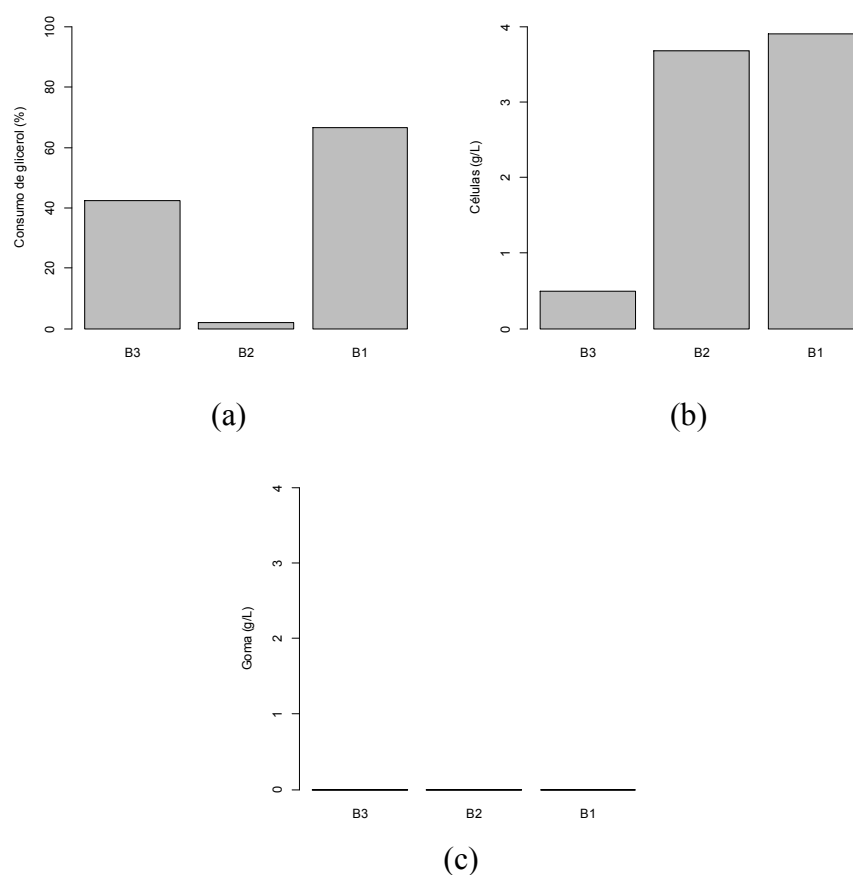


Figura 5.2- Resultados dos testes exploratórios com *Klebisiella sp.*: a) Consumo de glicerol para os meios fermentativos B₁, B₂ e B₃; b) Concentração de células após a fermentação; c) Quantidade polímeros formado.

A *Klebisiella sp.* consome glicerol, o que pode ser confirmado pela Figura 5.2 (a), no entanto, é incapaz formar biopolímero, Figura 5.2.c. Logo, esse microrganismo também não foi considerado promissor para a bioconversão do glicerol no bioproduto desejado.

5.1.3- Ensaios com *Xanthomonas*

Nestes testes foram utilizados três diferentes tipos de meio fermentativo, cada um contendo uma quantidade diferente de glicerol e glicose, conforme Tabela 5.3:

Tabela 5.3- Composição dos meios utilizados nos testes com *Xanthomonas*

Meios Fermentativos	Composição de glicerol (g/L)
C1	100
C2	300
C3	800

Os resultados obtidos neste teste exploratório estão apresentados na Figura 5.3:

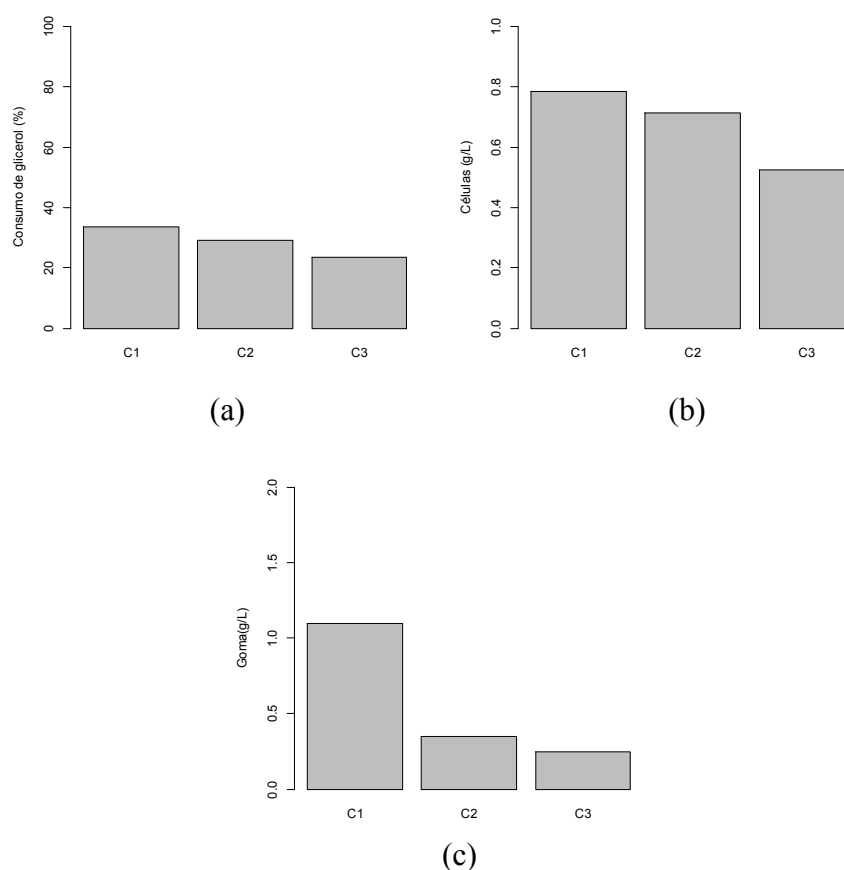


Figura 5.3- Resultados dos testes exploratórios com *Xanthomonas*: a) Consumo de glicerol para os meios fermentativos C₁, C₂ e C₃; b) Concentração de células após a fermentação; c) Quantidade polímeros formado.

A *Xanthomonas* se mostrou capaz de consumir glicerol e formar goma xantana, o que é evidente na Figura 5.3(c).

5.1.4- Discussão dos ensaios e seleção dos microrganismos

A Figura 5.5 sintetiza os resultados obtidos na seleção dos microrganismos aptos a consumir glicerol e produzir biopolímeros.. Observa-se que todos os microrganismos consumiram glicerol e apresentaram crescimento celular, no entanto apenas a *X. campestris* produziu biopolímeros.

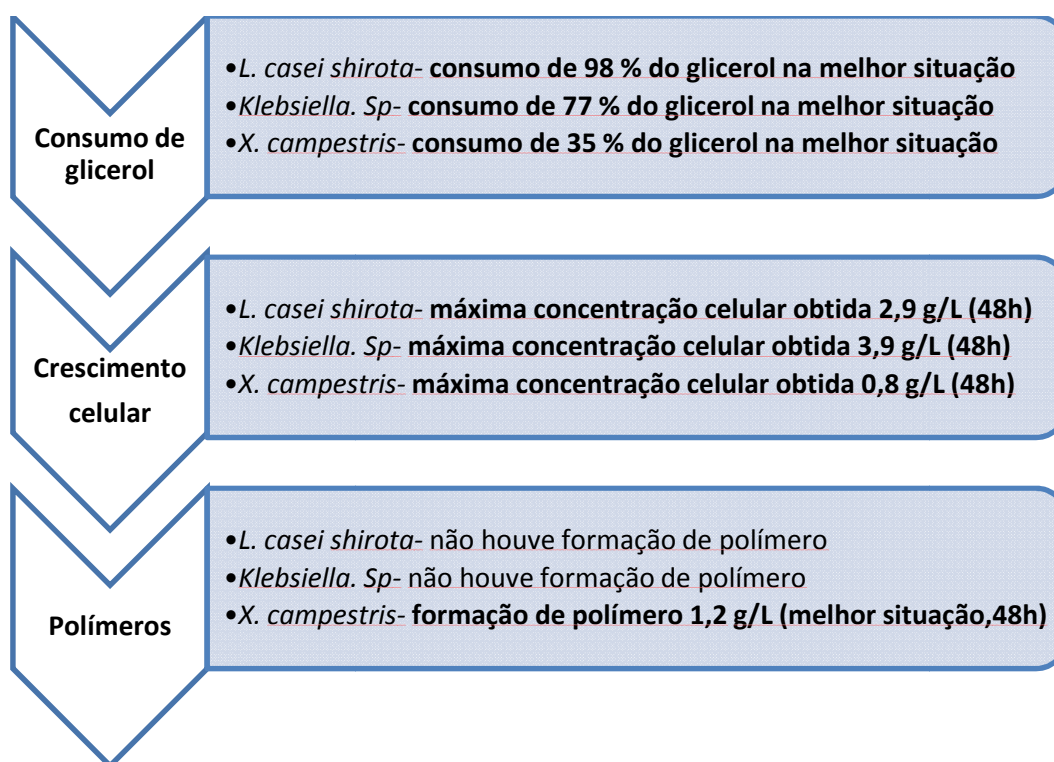


Figura 5.4- Síntese dos ensaios para seleção de microrganismo

Com base na Figura 5.4, optou-se em dar sequência aos experimentos utilizando os microrganismos: *X. campestris*, pois este microrganismo produziu, a partir do glicerol, o produto de interesse.

5.2- Ensaios para produção de biopolímeros com glicerol e glicose

O ensaio foi realizado utilizando o meio D, descrito na Tabela 4.3, e variando as concentrações de glicose e glicerol. As concentrações de glicose testadas foram 2, 8 e 13 g/L

e as de glicerol foram de 2, 10 e 40 g/L. Os dados obtidos no presente ensaio estão representados na Figura 5.5:

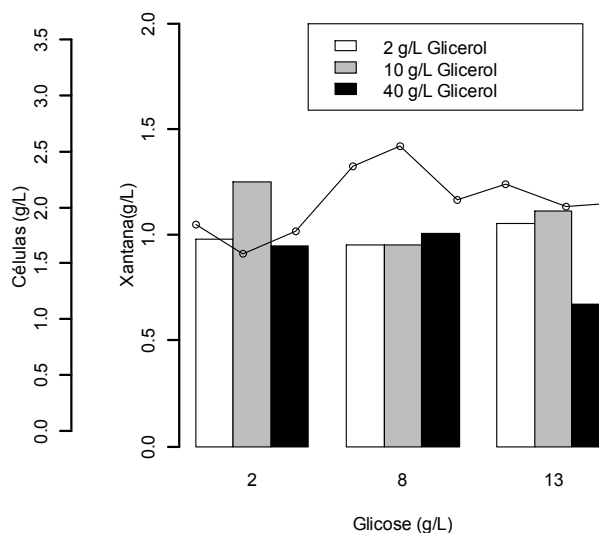


Figura 5.5- Gráfico produção de polímero (Barras) e crescimento celular (○)

Analizando a Figura 5.5, nota-se que o maior crescimento celular não ocorre em situações com maiores concentrações de glicose ou glicerol e, sim, nas situações em que há combinações destes dois substratos. Além disso, não observa-se uma relação direta entre crescimento celular e produção de polímero.

Ainda analisando a Figura 5.5, nota-se que menores concentrações de glicerol favorecem a formação de goma, no entanto o biopolímero também é gerado satisfatoriamente em maiores concentrações de glicerol, uma vez que na combinação de 40 g/L de glicerol e 8 g/L de glicose obteve-se 92% da concentração de polímero obtida na melhor situação.

A comparação entre a Figura 5.5 e a Figura 5.3(c) mostra que a adição de glicose não foi capaz de aumentar significativamente a produção do polímero.

Como a capacidade de produção do polímero é maior para menores concentrações de glicerol e adição de glicose não favoreceu a produção, logo justifica-se a continuidade do estudo utilizando glicerol na ausência de glicose.

5.3- Ensaios para produção de biopolímeros com glicerol puro

5.3.1- Ensaio para determinação do tempo de fermentação

Diversos ensaios utilizando o glicerol como fonte única de carbono foram realizados com o intuito de encontrar condições ideais de produção de xantana.

A Figura 5.7 apresenta os dados obtidos nos ensaios realizados variando os tempos das fermentações (48, 60 e 72 horas) e mantendo o tempo de fermentação do inóculo em 16 horas. O meio utilizado como inóculo e para a fermentação foi apresentado na Tabela 4.3 (Meio D), variando, porém as concentrações de glicerol (2, 10 e 40 g/L).

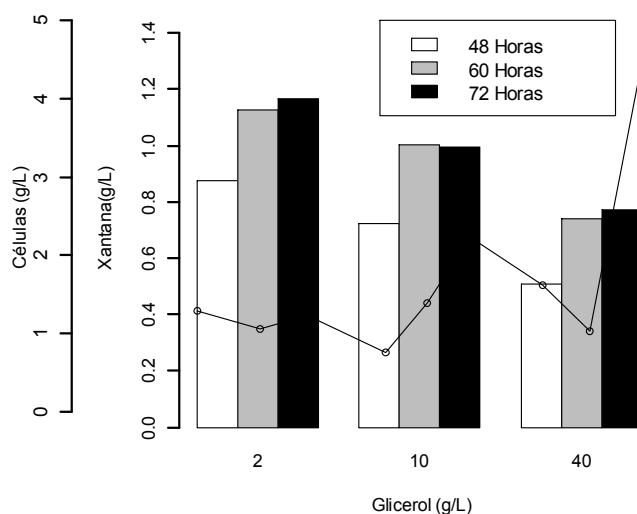


Figura 5.6-Efeito do tempo de fermentação na produção de xantana (barras) e crescimento celular (○)

Analisando a Figura 5.6, é possível concluir que nas fermentações de 72 horas ocorreu maior formação de Xantana que nas demais fermentações, o que justifica a continuidade do estudo utilizando 72 horas de fermentação.

5.3.2- Ensaio para determinação dos meios de fermentação e inóculo

Estabelecido o melhor tempo de fermentação, foram feitos ensaios para determinar qual o melhor meio para preparo do inóculo e o melhor meio para a fermentação, visando a maior produção de xantana. Para o preparo do inóculo utilizou-se dois diferentes meios, o YMA (Y), apresentado na Tabela 4.1 e o meio D (M), apresentado na Tabela 4.3. Para as fermentações foram testados os três meios (B, C e D) apresentados na Tabela 4.3. O tempo de fermentação do inóculo foi de 16 horas e o tempo de fermentação de 72 horas. A concentração de glicose no inóculo foi a mesma em todos os ensaios (10 g/L) e a concentração de glicerol nas fermentações foi de 8 g/L. A Figura 5.7 apresenta os dados obtidos no ensaio.

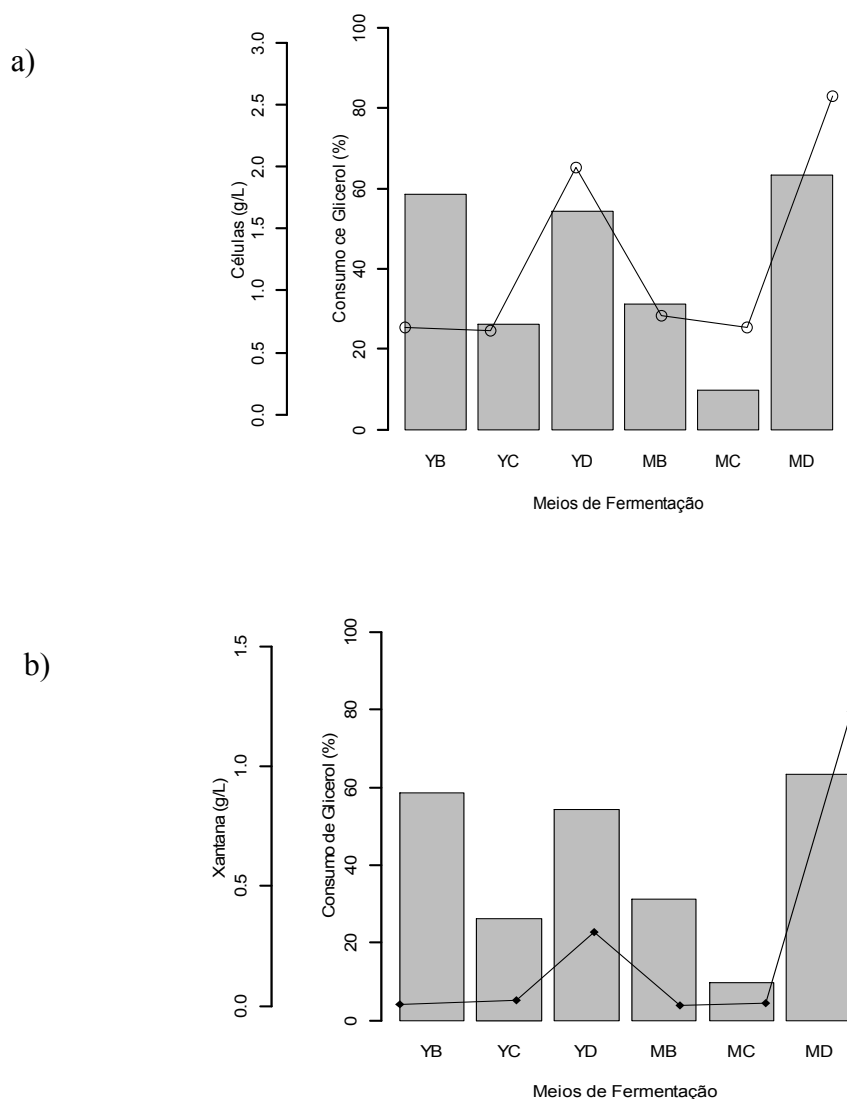


Figura 5.7-Efeito da composição do meio fermentativo e do inóculo na produção de xantana (♦), crescimento celular (○) e consumo de glicerol (barras)

A análise da Figura 5.7.a, revela que as fermentações, em que se utilizou o meio YMA (Y) para preparo do inóculo, produziram menor quantidade de xantana quando comparado à utilização do Meio D (M). Além disso, o meio de fermentação que gerou maior quantidade de goma, também, foi o Meio D (D) quando comparado aos meios B e C.

O crescimento celular (Figura 5.7.b) mostrou o mesmo comportamento da concentração de xantana. Portanto, elegeu-se o meio D pelo seu melhor desempenho tanto para o preparo do inóculo, quanto para fermentação.

5.3.3- Ensaio para determinação da concentração de glicerol no meio fermentativo

A Figura 5.8 representa os efeitos das concentrações de glicerol no crescimento celular e produção de xantana nas melhores condições de tempo de fermentação, composição do inóculo e meio fermentativo, determinados anteriormente. Nestes ensaios variou-se a concentração de glicerol com o intuito de determinar a concentração mais eficiente para a produção de xantana.

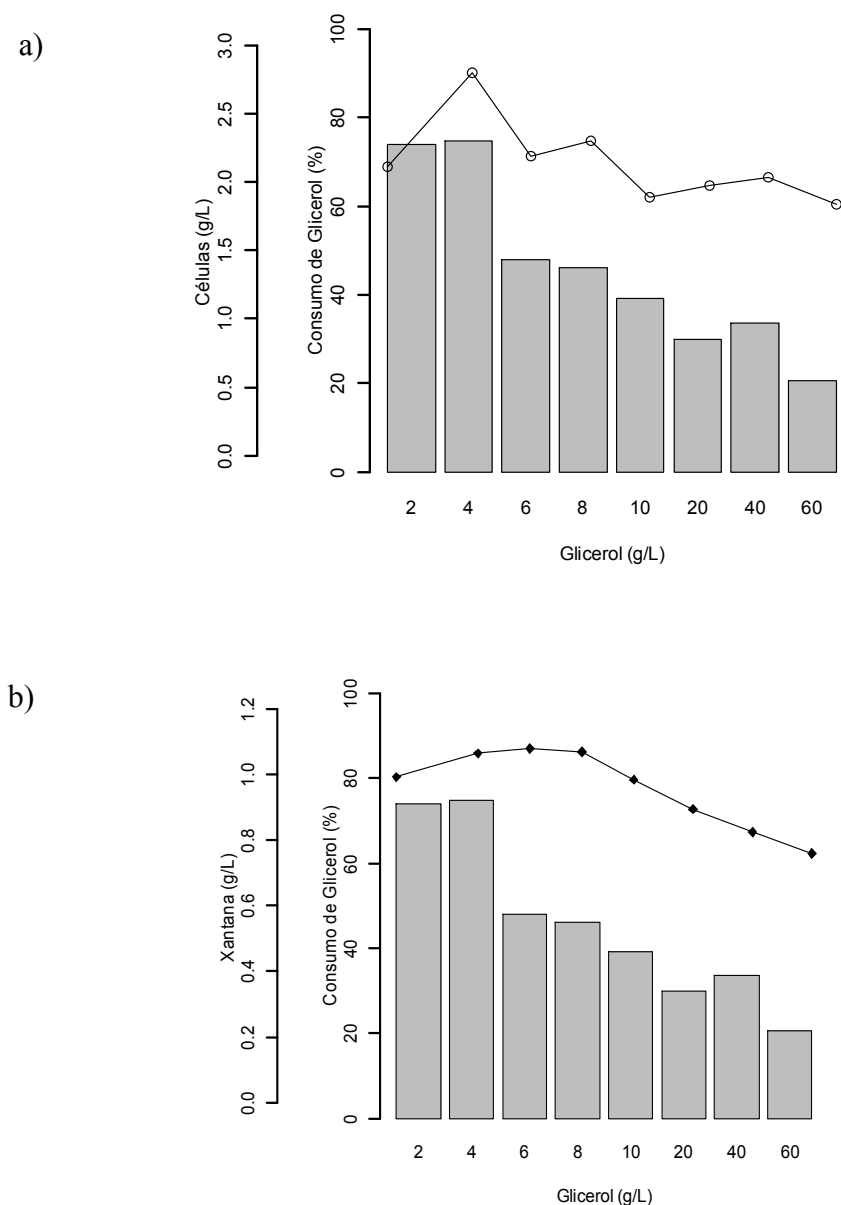


Figura 5.8- Efeito da concentração de glicerol na produção de xantana (♦), crescimento celular (○) e consumo de glicerol (barras)

Pode-se observar que a concentração de glicerol que mais favorece o crescimento celular não é a mesma que favorece a produção de xantana, uma vez que para as concentrações de glicerol de 2 g/L a 6 g/L foi observado o maior crescimento celular e para as concentrações de 2 g/L a 8 g/L a concentração de xantana foi praticamente a mesma.

Além disso, nota-se que o aumento da concentração de glicerol no meio reduz o crescimento celular e a produção de xantana, sendo que para concentrações de glicerol superiores a 8 g/L esta redução foi mais significativa. Logo, a concentração de 8 g/L de glicerol é a condição de maior interesse, por ser um produto residuário, reduz o descarte deste como efluente.

A maior concentração de xantana observada (1,1 g/L) é inferior a observada na literatura para o uso de caldo de cana e resíduos de mandioca como fontes de carbono. Segundo Araújo e colaboradores (2005), produz-se 7,48 g/L de xantana durante 48 horas de fermentação a 120 rpm e 28°C, usando caldo de cana como fonte alternativa de carbono e cepa *X. campestris* pv. *campestris* - NRRL B-1459. Usando resíduos de mandioca, Soccol e colaboradores (2002), obteve 14,8 g/L de xantana em 96 horas de fermentação, com rotação de 160 rpm a 25°C, utilizando a cepa *X. campestris* - LPB 01. No entanto, a produção de 1,1 g/L observado foi superior a encontrada na literatura para o uso do glicerol como fonte de carbono, segundo Brandão e colaboradores (2010), foi viável produzir 0,79 g/L de xantana utilizando glicerol como fonte de carbono e a cepa *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* - N° 1866; a fermentação foi realizada por 120 horas, 250 rpm e 28°C.

5.3.4- Ensaio para determinação do tempo de preparo de inóculo

Para determinação do melhor tempo de preparo de inóculo na produção de xantana foram realizados experimentos com concentração de glicerol de 8 g/L, tempo de fermentação de 72 horas e o meio utilizado tanto para o preparo do inóculo quanto para a fermentação foi o Meio D, apresentado na Tabela 4.3. Os tempos utilizados para o preparo do inóculo foram 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas. A Figura 5.9, indica os dados obtidos em tal ensaio.

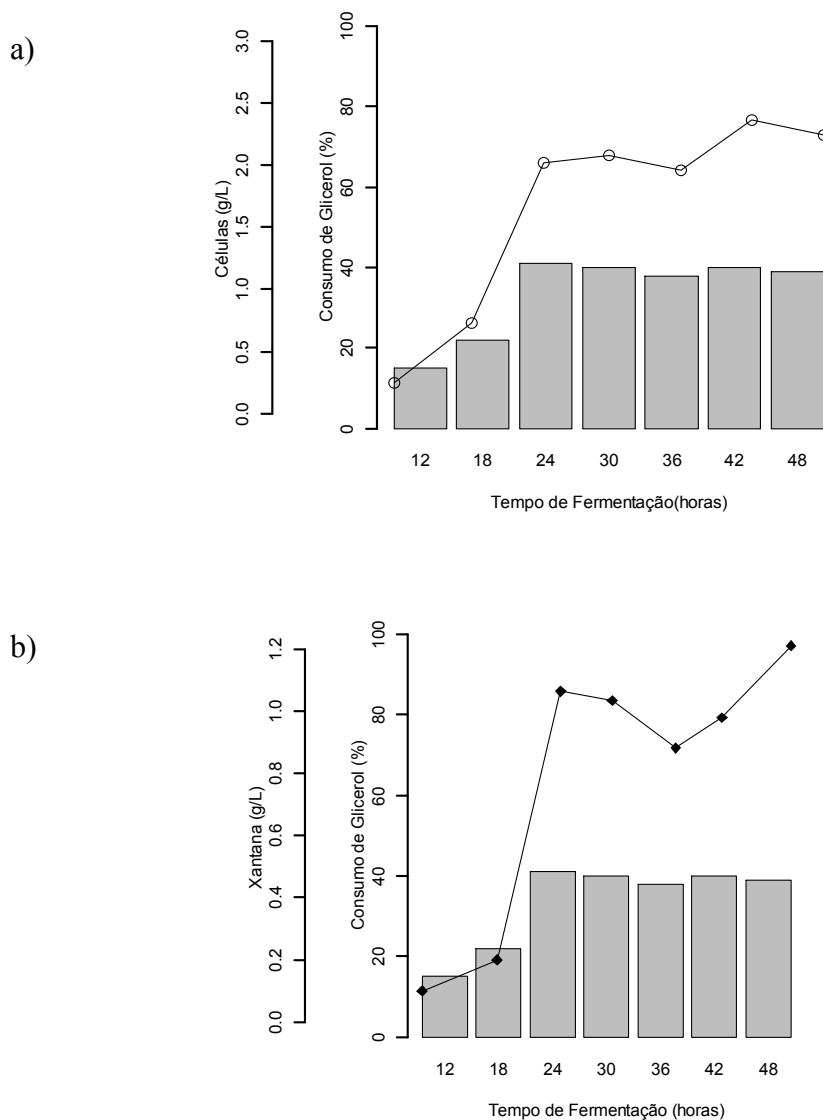


Figura 5.9- Efeito do tempo de preparo do inóculo na produção de xantana (♦), crescimento celular (○) e consumo de glicerol (barras)

Nota-se que antes das 24 horas de preparo do inóculo as células se encontram fora da fase exponencial de crescimento celular e, assim, a fermentação nestas condições não favoreceu a produção de goma.

Na produção de xantana, o tempo de 48 horas para preparo do inóculo foi o mais favorável à produção de goma, porém parte da goma presente neste ponto é advinda do próprio inóculo.

5.3.5- Batelada Alimentada

Afim de diminuir a possibilidade de inibição pelo substrato foi realizado um teste em batelada alimentada.

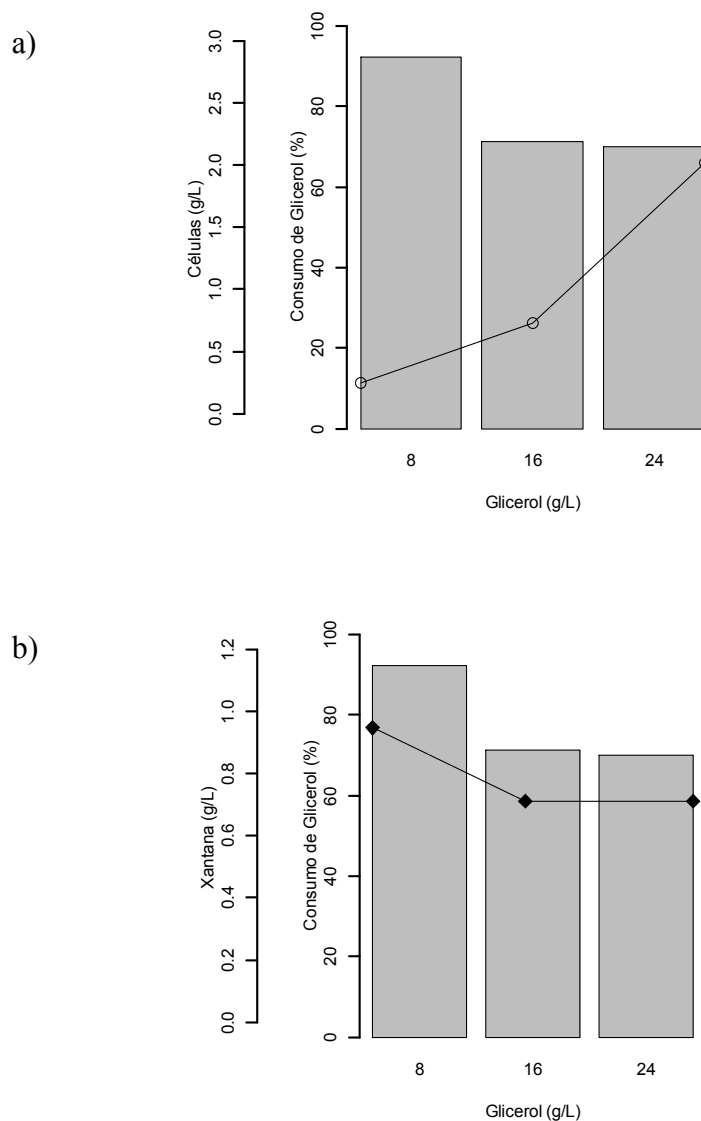


Figura 5.10- Efeito da fermentação em batelada alimentada na produção de xantana (◆), crescimento celular (○) e consumo de glicerol (barras)

Analisando a Figura 5.10, podemos dizer que a inibição devido ao glicerol não é o fator que restringe a fermentação, pois não houve aumento na produção do polímero associado ao uso da batelada alimentada.

5.4- Espectroscopia na Região de Infravermelho da Goma Produzida e Goma comercial

A Figura 5.11 apresenta a espectrometria de infravermelho afim de avaliar as similaridades ou as diferenças entre as estruturas químicas da goma produzida e da goma comercial.

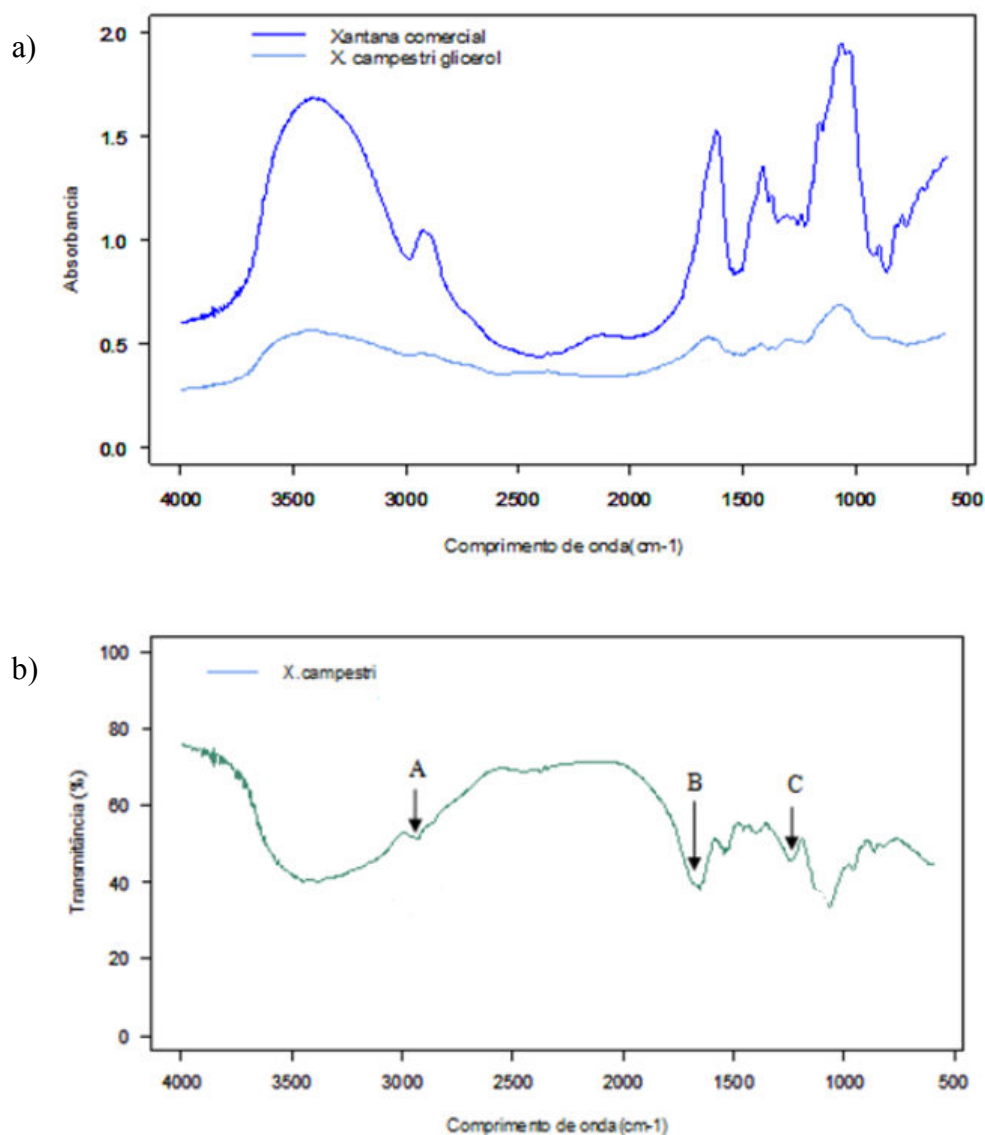


Figura 5.11- a) Comparação entre a gomas gerada pela fermentação de *X.campestris* e a goma comercial (Absorbância); b) goma gerada pela fermentação de *X.campestris* (Transmitância);

Observa-se que o polímero produzido nas condições testada é similar a goma comercial (Figura 5.11), embora existam diferenças entre as absorbâncias, o que está

associado aos grupos externos da molécula do polímero produzido que estão interagindo com os outros compostos do meio. Tal interação é resultado da purificação incompleta tanto da amostra produzida quanto da goma comercial.

Na Figura 5.11 estão destacados os pontos A, B e C. O ponto A representa bandas de *overlapping* de intensidade moderada que estão associadas às vibrações das ligações $C-H$, com banda de 2920 cm^{-1} . As bandas 1659 e 1250 cm^{-1} , pontos B e C, estão associadas a assimetria ($C=O$) e a simetria ($C-O$).

Estes pontos estão relacionadas à estrutura da goma como pode ser visto na Figura 5.12 que exemplifica as ligações dos grupos A, B e C já citadas.

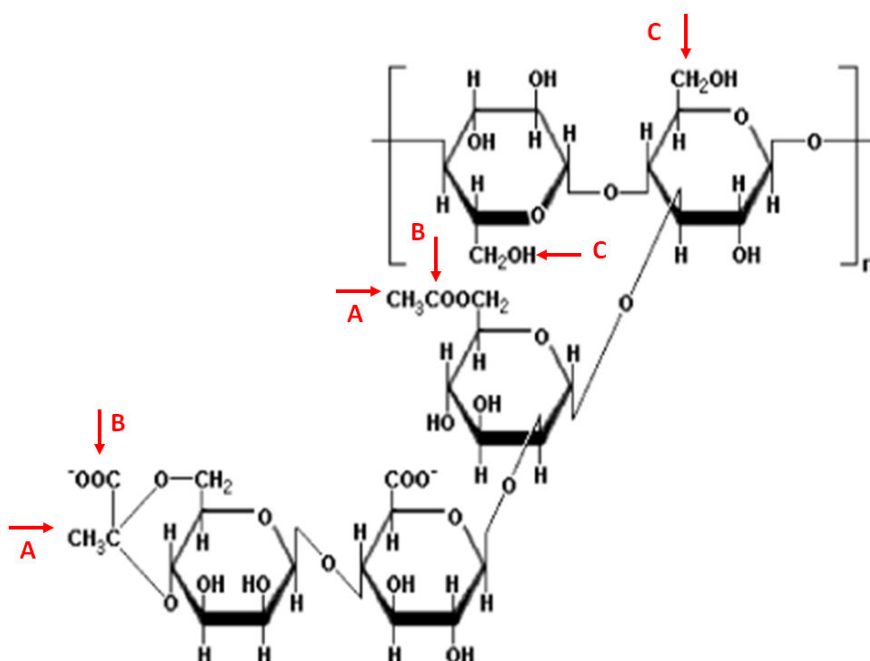


Figura 5.12- Associação entre a espectroscopia de infravermelho e a estrutura da goma xantana

Alguns pontos a serem considerados para a análise de espectro são apresentados abaixo. Estes pontos são dados pelas frequências de alguns grupos dos compostos acima referidos (ALINGER *et al.*, 1978, SOLOMOS, 1996; RAMASSAMY *et al.*, 2011):

- $\delta\ C-O$: álcool, éter e ácido carboxílico de 1300 a 1000 cm^{-1} ;
- $\nu\ C-H$: alcanos com $C\ sp^3$ de 3000 a 2850 cm^{-1} ;
- $\nu\ C=O$: éster de 1735 a 1750 cm^{-1} .

Sendo δ : dobramento

v: estiramento

5.4.1- Determinação da Massa Molar

A Figura 5.3, mostra os resultados de viscosidade inerente e específica reduzida obtidos nos testes com viscosímetro capilar realizados para a determinação da massa molar do polímero produzido.

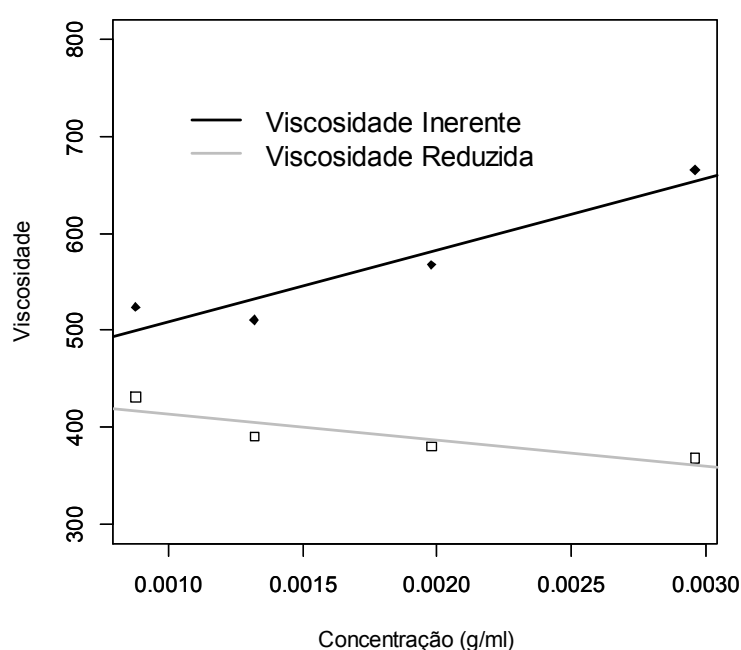


Figura 5.13- Viscosidade inerente e específica reduzida em função da concentração de xantana produzida pela fermentação de *X.campestris*

O valor da massa molar da xantana obtida na fermentação com *X.campestris* foi de 2250 KDa ($R=0,811$). Esses dados podem ser considerados satisfatórios se comparados com resultados encontrados na literatura. Zhang e Chen (2010) obtiveram, nas melhores condições, o valor de 900 KDa para a massa molar de xantana utilizando glicose e xilose. Wang e colaboradores (1990) encontraram o valor de 2500 KDa para a xantana produzida.

5.5- Ensaaios complementares

Parte dos resultados desta dissertação não foram apresentados neste documento, devido a processo de sigilo associado a possível patente.

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES

Diante das evidências encontradas no presente trabalho, é possível concluir que:

- o glicerol é uma fonte de carbono viável para produção de xantana;
- embora a produção de xantana em meio contendo glicose e glicerol seja maior que a produção desses compostos em meio contendo apenas glicerol, o uso das duas fontes de carbono em conjunto não é viável, pois a presença do glicerol na fermentação diminui a produção de xantana;
- concentrações de glicerol superiores a 10 g/L inibem a produção de polímero e o uso de batelada alimentada não é capaz de reduzir os efeitos desta inibição;

CAPÍTULO 7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliar os estudos utilizando outras cepas e culturas mistas;
- Otimizar as condições de produção;
- Ampliar os estudos, caracterizar e purificar a xantana gerada.

CAPÍTULO 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL GP. Glycerol. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology** 1990;41:95–128.
- ALLINGER, Norman et al. **Química Orgânica**. Tradução da 2 ed americana. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Dois S. A, 1978. 961p.
- AMANULLAH, A.; SERRANO, L. C.; GALINDO, E.; NIENOW, A. W. Reproducibility of pilot scale xanthan fermentations. **Biotechnology Progress**, New York, v. 12, n. 4, p. 466-473, Jul./Aug. 1996.
- ANDREWS, M. A.; KLAEREN, S. A. Hydrocracking of carbohydrates making glycerol, glycols and other polyols. **US Patent 5,026,927**, 1991
- ARAÚJO, T. A.; FARIA, S.; FRANÇA, F. P.; CARDOSO, V. L. Avaliação do comportamento reológico dos diferentes meios de produção de goma xantana a partir do caldo de cana. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química , 6 , 2005, Campinas. **Anais**, 2005.
- ASHBY RD, SOLAIMAN DKY, FOGLIA TA. **Biotechnology Letters**. 28:253, 2006.
- ASHTAPUTRE, A. A.; SHAH, A. K. Evaluation of rheological properties of the exopolysaccharide of *Sphingomonas*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 1995, 11, 219-222.
- Associação Brasileira de Reologia. Disponível em:
<<http://www.reologiadobrasil.com.br/reologia.html>> . Acesso em: 26 mar. 2013.
- BIEBL H, MENZEL K, ZENG A-P, DECKWER W-D. Microbial production of 1,3-propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52. 289–96, 1999.

- BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* batch and continuous culture studies. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.27. p. 18–26, 2001.
- BIODIESEL BR. Ministério da Agricultura apóia cadeia produtiva para atender demanda crescente. 2010. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/em-foco/mapa-cadeia-produtiva-demanda-crescente-170310.htm>>. Acesso em: novembro. 2011.
- BORIES, A., HIMMI, E., JAUREGUI, J.J.A., PELAYO-ORTIZ, C., GONZALES, V.A. Glycerol fermentation with *Propionibacteria* and optimization of the production of propionic acid. **Sciences des Aliments**, v. 24. p. 121–135, 2004.
- BOUVET, O.M., LENORMAND, P., AGERON, E. AND GRIMONT, P.A. Taxonomic diversity of anaerobic glycerol assimilation in the *Enterobacteriaceae*. **Research in Microbiology**, v. 146. p. 279–290, 1995.
- BRADBURY JF. Manual of systematic bacteriology. Baltimore. **Genus II: Xanthomonas**. 1984. p. 199±210.
- BRANDÃO, L. V; DRUZIAN, J. I.; SANTANA E. G. C. M.; ECHEVARRIA E. M. Estudo Da Goma Xantana Oriunda Da Fermentação Da Glicerina Residual Do Biodiesel Para Aplicação Em Fluidos De Perfuração Em Poços De Petróleo. In: CONGRESSO NACIONAL BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 18, 2010, Bahia. **Anais**. Bahia universidade Federal da Bahia, 2010.
- BRASIL. **Ministério da ciência e tecnologia** (2005). Plano Nacional de Agroenergia. Brasília, 120 p.
- BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes; Departamento de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de Campina Grande; **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.6.2 , p. 127-139, ISSN 1809-8797, 2011.

- CALLAM, C. S.; SINGER, S. J.; LOWARY, T. L.; HADAD, C. M. "Computational Analysis of the Potential Energy Surfaces of Glycerol in the Gas and Aqueous Phases. Effects of Level of Theory, Basis Set, and Solvation on Strongly Intramolecularly Hydrogen-Bonded Systems." **Journal of the American Chemical Society**. 2001, 123, 11743-11754.
- CARRIQUIRY, M.A. A comparative analysis of the development of the United States and European union biodiesel industries, **Briefing Paper**, 2007.
- CHALLENG, I. A. Xanthan gum: a multifunctional stabiliser for food products. In: **FOOD HYDROCOLLOIDS: STRUCTURES, PROPERTIES, AND FUNCTIONS**. New York, **Plenum Press**, 1993. p. 135-140.
- CLARET, C., SALMON, J.M., ROMIEU, C. AND BORIES, A. Physiology of *Gluconobacteroxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1994.
- CLEMENTI, F.; FANTOZZI, P.; MANCINI, F.; MORESI, M. Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p. 983-988, 1995.
- COLEGROVE, G.T. Agricultural Applications of Microbial Polysaccharides. **Product Research & Development**, v.22, p. 456-460, 1983.
- COOPER, D .G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 224-229, 1987.
- COTE, G. L.; KRULL, L. H.; CARBOHYDR. Characterization of the exocellular polysaccharides from *Azotobacter chroococcum*. *Carbohydr*. p.181-143, 1988.
- CUNHA,M.A.A.. **Produção de goma curdlana pela *Agrobacterium radiobacter* variedade radiobacter k84**. 2002. 76f. Dissertação de Mestrado (Ciência de Alimento). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.

- DE SOUSA, J. RA; CORREIA, J. A. C; ALMEIDA, J. G. L.; RODRIGUES, S.; PESSOA, O. D. L.; MELO, V. M. M; GONÇALVES, L. R. R.B. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P.aeruginosa* MSIC02, **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1831–1839, 2011.
- DHARMADI, Y., MURARKA, A. AND GONZALEZ, R., 2006, Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, p. 821–829.
- FENTANES, E. G; RODRIGUES, S. H. B. G; FERREIRA, M. M. C. Prospectiva de la Biotecnología en México. México: Fundación Javier Barros Sierra, p. 73-92, 1985.
- GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASA, A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**, New York, v.18, 2000.
- GOLDSTEIN, A.M.; ALTER, E.N.; SEAMAN, J.KK. GUAR GUM: In: WHISTLER, Industrial Gums, New York: **Associated Press**, 1973. p. 315.
- HOOGENDOORN, A., ADRIAANS, T., VAN KASTEREN, J.M.N. AND JAYARAJ, K.M. **Purification via bio-catalysis and column adsorption for high quality applications**, 2007.
- ITO, T., NAKASHIMADA, Y., SENBA, K., MATSUI, T. AND NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 260–265, 2005.
- ITOH, N., TUIJIBATA, Y. AND LIU, J.Q. Cloning and overexpression in *Escherichia coli* of the gene encoding dihydroxyacetone kinase isoenzyme I from *Schizosaccharomyces pombe* and its application to dihydroxyacetone phosphate production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 193, p.200, 1995.

- JARVIS, G.N., MOORE, E.R.B. AND THIELE, J.H. Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 166–174, 1997.
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – new hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, Chicago, v. 28, n. 5, p. 34-40, 1974.
- KAY, A., ISHINO, T., ARASHIDA. Biosynthesis of curdlan from culture media containing ¹³C-labeled glucose as carbon source. **Carbohydrate Research**, v. 240, p. 153 – 159, 1993.
- KENNEDY JF, BRADSHAW IJ. Production, properties and applications of xanthan. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 19, 1984.
- LEE, P.C., LEE, W.G., LEE, S.Y. AND CHANG, H.N. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succinici* producens using glycerol as a carbon source *Biotechnology and Bioengineering*, v. 72. p. 41–48, 2001.
- LIDE, D. R., **Handbook of Chemistry and Physics**, 87 ed., 2006.
- LIMA, M.A.G.A. ***Obtenção e Caracterização de Xantanas Produzidas por Diferentes Linhagens de Xanthomonas campestris spv. campestris***. 1999. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.
- LOPES, L., ANDRADE, C. T. Polímeros de origem microbiana: polissacarídeos. **Revista de Química Industrial**, Rio de janeiro, v.703, p.19-23, out./dez 1995.
- MARCOTTE, M.; HOSHAHILI, A. R. T.; RAMASWAMY, H. S. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. **Food Research International**, Barking, v. 34, n. 8, p. 695-703, 2001.

- MARGARITIS A, ZAJIC JE. Biotechnology review: mixing mass transfer and scale-up of polysaccharide fermentations. **Biotechnology and Bioengineering** v. 20, p. 939±1001, 1987.
- MARGARITIS, A.; PACE, G.W. - Microbial Polysaccharides In : Comprehensive Biotechnology,. **Pergamon Press**, New York, v. 3, p. 1005 – 1044, 1985.
- MEHER, L.C., SAGAR, D.V. AND NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification a review. **Renew Sustain Energy**, v. 10, p. 248–268, 2006.
- MILAS, M.; RINAUDO, M.; TINLAND, B. The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. **Polymer Bulletin**, v. 14, p. 157-164, 1985.
- MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris pv pruni***. 1998. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Pelotas, 2002.
- MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; GILTURNES, C.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris pv pruni*. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.15, n.4-6, p.469-474, jul./ nov 2001.
- MULCHANDANI A.; LUONG J. H. T.; LEDUY A. Batch kinetics of microbial polysaccharide biosynthesis. **Biotechnology and Bioengineering**. v.32, p.639-646, 1988.
- OAKENFULL, D. Gelling Agents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.1, p.26, 1987,
- PADILHA, F. F. Estudo da compartimentalização das enzimas para produção de biopolímeros por *Beijerinckia sp.* 1997. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, 1997.

- PAGLIARO, M.; CIRIMINNA, R.; KIMURA, H.; ROSSI, M.; PINA, C. D.; **Angewandte Chemie**, Int. Ed. 2007, 46, 4434.
- PASQUINI C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications, **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, 198–219, 2003.
- PICTON, L. MOCANU, G., MIHAI, D. Chemically modified exopolysaccharide pullulans: physico-chemical characteristics of ionic derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p. 131 – 136, 1995.
- PRESCOTT SC, DUNN CG. **Industrial microbiology**. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1959. 208–17 p.
- RAHMAN, K. S. M., BANAT, I. M., THAHIRA, J, THAYUMANAVAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY. P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended whit poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Tecnology**, v.81, p. 25-32, 2002.
- ROCKS, J. K. Unusual rheological properties and heat, acid, and salt stabilities make glucose-derived hydrocolloid a versatile food additive. **Food Technology**, Chicago, v.25, p.476-484, 1971.
- ROJAS, J.A.; ROSELL, C.M.; DE BARBER, C.B. Pasting properties of different wheat flour-hydrocolloid systems. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 13, p. 27-33, 1998.
- ROSALAM, S., ENGLAND, R. **Review of xanthan gum production from unmodified starches by Xanthomonas campestris sp.** **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p. 197 – 207, 2006.
- SANTOS,D.R; FILHO,P.R. **Biodegradação – um ensaio com polímeros**. Bragança Paulista, 2003. 112 p.
- SMIDSROD, O.; SKAJAK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**. v. 8, p.71-78,1990

- SOCOL, C. R.; WOICIENCHOWSKY, A. L.; PANDEY, A. **Produção de goma xantana por fermentação a partir de mandioca, batata e resíduos das agroindústrias cafeeira, de batata e de mandioca**. INPI: PI 0007342-3 A, 2002.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C.B.. **Química orgânica**. Tradução de Robson Mendes Matos. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. v.2.
- STAUFFER, C.E. **Functional Additives for Bakery Foods**, p. 164-177, 1985.
- SUDHAKAR, V.; SINGHAL, R.S.; KULKARNI, P.R. Starch- Galactomannan interactions: functionality and rheological aspects. **Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 259-264, 1996.
- SUTHERLAND, I. W. Microbial Biopolymers from Agricultural Products: Production and Potencial. **International Biodeterioration& Biodegradation**, p. 249 – 261, 1997.
- SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal, Kidlington**, v.11, p.663-674, 2001.
- UNESP. Pesquisadores da UNESP criam técnica para produzir a xantana, goma importada que é utilizada em larga escala pela indústria. 2011. Disponível em: <<http://www.unesp.br/cpa/noticia.php?artigo=146>>. Acesso em: novembro 2011.
- WANG, Z. X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A.; **Biotechnology Advances** 2001, 19, 201.
- WHISTLER, R. L., BeMILLER, J. N. **Industrial gums**, 3. ed. San Diego. 1993. 642 p.
- ZHANG, X. Y.; WANG, W. Q. **Wind farm and wake effect modeling for simulation of a studied power system**. In:IEEE/PES power systems conference and exposition, 2009.
- ZHOU, C. H.; BELTRAMINI, J. N.; FAN, Y. X.; LU, G. Q.; **Chemical Society Reviews**. 2008, 37, 527.

APÊNDICE 1: MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE GLICEROL

O método para determinação do consumo de glicerol foi realizado de acordo com o procedimento citado abaixo:

- Diluir as amostras adequadamente;
- Adicionar à um tubo de ensaio 1 mL da amostra previamente diluída e 1 mL do Reagente Cor (Kit de Detecção de Triglicérides);
- Esperar por 15 minutos, até a completa estabilização da cor;
- Fazer a leitura da absorbância com comprimento de onda de 510 nm no espectrofotômetro;
- Converter o valor da leitura em concentração g/L de glicerol através de uma curva-padrão previamente construída.

Para a determinação da concentração de glicerol, foi construída previamente uma curva de calibração ($C_{\text{glicerol}} = 0,027896 \text{ Abs} - 0.004695$, $r^2 = 0.98$), os dados desta curva estão apresentados abaixo.

Concentração de Glicerol (g/L)	Leitura ABS. (510 nm)
0,005	0,327
0,01	0,553
0,015	0,700
0,02	0,922
0,025	1.028