UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Produção de Goma Xantana empregando Caldo de Cana por *Xanthomonas campestris pv. campestris* NRRL B-1459

Autora: Sandra Faria

Orientadoras: Profª. Drª. Vicelma Luiz Cardoso (UFU)

Profª. Drª. Francisca Pessoa de França (UFRJ)

Uberlândia, 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Produção de Goma Xantana empregando Caldo de Cana por *Xanthomonas campestris pv. campestris* NRRL B-1459

Autora: Sandra Faria

Engenheira Química

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.

Uberlândia, 2005

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO 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 29 / 08 / 2005.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^{a}. Dr^{a}. Vicelma Luiz Cardoso
Orientadora (PPG-EQ/UFU)

Prof^{a}. Dr^{a}. Francisca Pessoa de França
Co-orientadora (EQ/UFRJ)

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
(PPG-EQ/UFU)

Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
(FEQUI/UFU)

Dedico este trabalho aos meus pais: Walter José de Faria (*in memorian*) e Margarida Faria, que fizeram da arte de educar suas profissões e entre o sim e o não buscaram o equilíbrio necessário para serem verdadeiros pais.

Muito obrigada.

“O que de mais belo podemos experimentar é o mistério. O mistério é a fonte de toda arte e ciência verdadeira. Aquele a quem essa emoção é estranha, que não consegue deter-se para se maravilhar e ficar perplexo, pouco mais é que um morto. Tem os olhos fechados.”

Albert Einstein, *What I believe*

Agradecimentos

A realização de conquistar o título de Mestre em Engenharia vem acompanhada de sentimentos bastante distintos e comuns, próprios àqueles que percorrem tal trajetória. Portanto, para vencer essa jornada, é importante o reconhecimento sincero a quem contribuiu solidariamente na execução e elaboração deste trabalho.

Primeiramente agradeço a Deus por conceder-me a vida e a oportunidade de desenvolvimento intelectual e pessoal. Aos meus pais, pela compreensão e afeto dedicados incondicionalmente. À minha irmã Beatriz, pelo apoio e incentivo. Aos meus tios Berenice e João Rogério por acolher-me tão prontamente durante muitos anos. Aos meus avos Francelino José de Faria (*in memorian*) e Eurípedes Faria, pelo incentivo permanente à minha carreira.

À Prof[a] Vicelma Luiz Cardoso, pela orientação incomum, típica do seu profissionalismo e pelo comprometimento com cada etapa desenvolvida nesta dissertação.

À Prof[a] Francisca Pessoa de França, pelas diretrizes necessárias e fundamentais à condução experimental.

Aos professores Eloízio Júlio Ribeiro e Márcia Gonçalves Coelho, pelo crédito e incentivo essenciais no dia-a-dia.

Ao Prof. Ubirajara, pelas valiosas correções e sugestões.

Ao Prof. Euclides, pelas sugestões ponderadas nas bancas de seminário e qualificação.

Ao Engenheiro Édio José Alves pelas contribuições preciosas no formato do texto.

Aos professores Daniel, Carlos e Marcos Barrozo, pela ajuda indispensável em diferentes momentos da realização desta pesquisa.

A todos os professores da FEQUI que muito contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos funcionários da FEQUI: Zuleide, Roberta, Anísio, Silvino e José Henrique, sempre dispostos a ajudar de forma cordial.

Ao Engenheiro Civil Édio Rosa de Andrade, por não subjugar minha capacidade quando eu era apenas uma engenheira recém-formada.

Ao Sr. Artur Lourenço Borges, pela gentileza da doação da matéria-prima utilizada nesta pesquisa.

Ao Sr. Osvaldo Ferreira de Assis (*in memorian*), por permitir o uso da moenda na extração do caldo de cana.

Aos professores do Instituto de Química Guimes Rodrigues Filho e Rosana Maria Nascimento Assunção, pela realização de análises químicas importantes para este trabalho.

Aos colaboradores Patrícia Vieira, Cláudio, Fabiana, Cristiane, Leila, Fábio Arouca, Fábio Ressel, Rafael, Gisele e Talita, pelo suporte e auxílio em etapas distintas do trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À CAPES, pelo apoio financeiro através do Projeto Procad.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

Ao meu namorado, Marcelo Oliveira Araújo, pela dedicação e compreensão nos momentos difíceis.

Índice

LISTA DE FIGURAS.....i
LISTA DE TABELAS.....iii
RESUMO.....v
ABSTRACT.....vi
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....1
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....4
2.1 – Materiais Poliméricos.....4
2.2 – Cana-de-açúcar.....7
Fonte: Site Orplana, Informativo Nº: 4, Abril 2001.....8
2.3 – Gomas oriundas de algas.....8
2.4 – Gomas de origem microbiana.....9
2.5 – Goma Xantana.....12
2.6 – Microrganismos Produtores de Goma Xantana.....13
2.7 – Classificação e características dos mostos.....16
2.8 – Processo Fermentativo.....17
2.8.1 – Recuperação e Purificação da Goma Xantana.....22
2.9 – Reologia.....23
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....27
3.1 – Microrganismo.....27
3.2 – Meios de Manutenção.....27
3.3 – Matéria-Prima.....28
3.4 – Composição dos Meios de Produção.....28
3.5 – Planejamento Experimental.....29
3.6 – Determinação Quantitativa de Nitrogênio e Fósforo no Caldo de Cana Bruto.....31
3.7 – Produção de Goma Xantana.....31
3.7.1 – Produção de Goma Xantana em Frascos Erlenmeyers Agitados.....31
3.7.2 – Produção de Goma Xantana em Fermentador.....31
3.8 – Determinação da Biomassa Através de Massa Seca.....33
3.9 – Determinação Quantitativa da Sacarose.....33
3.9.1 – Condições de Hidrólise da Sacarose.....34
3.10 – Recuperação e Purificação da Goma.....34
3.11 – Avaliação do Comportamento Reológico.....35

3.11.1 – Preparo das Amostras do Mosto Fermentado para Análise Reológica 35
3.11.2 – Preparo da Solução 1% de Goma Xantana para Análise Reológica..... 35
3.12 – Espectroscopia na Região do Infravermelho das Gomas Produzidas 36
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 37
4.1 – Caldo de Cana..... 37
4.2 – Análise dos Testes Preliminares..... 37
4.3 – Análise do Primeiro Planejamento Experimental 2^3 40
4.4 – Análise do Segundo Planejamento Experimental 2^3 45
4.5 – Análise do Terceiro Planejamento Experimental 3^2..... 51
4.6 – Análise do Quarto Planejamento Experimental 3^2 em Reator..... 59
4.7 – Espectroscopia na Região do Infravermelho..... 73
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES..... 77
5.1 – Conclusões..... 77
5.2 – Sugestões 78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Unidade estrutural repetitiva da goma xantana.....2
Figura 2.1 - Aspecto da cultura de *Xanthomonas campestris pv. campestris* 14
Figura 2.2 - Lesão causada por *Xanthomonas campestris pv. campestris* em folhas de couve. 15
Figura 2.3 - Podridão negra causada por *Xanthomonas campestris pv. campestris* em repolho. 15
Figura 2.4 - Classificação dos fluidos de acordo com o seu comportamento reológico 24
Figura 3.1 - Xanthomonas campestris pv. campestris NRRL B-1459. 27
Figura 3.2 - Vista do local onde a cana SP 791011 foi coletada. 28
Figura 3.3 - Foto do fermentador Biostat-B utilizado para realizar os ensaios. 32
Figura 3.4 - Forma apresentada pela lâmina quando visualizada por meio de observação microscópica. 32
Figura 3.5 - Esquema do procedimento analítico percorrido pelas amostras após retiradas do fermentador. 33
Figura 3.6 - Formato apresentado pela goma momentos após sua precipitação. 34
Figura 4.1 - Viscosidade absoluta do mosto fermentado em função da taxa de deformação para diferentes meios de produção quando se utilizou caldo de cana proveniente da variedade RB 835486. 39
Figura 4.2 - Viscosidade absoluta do mosto fermentado em função da taxa de deformação para diferentes meios de produção quando se utilizou caldo de cana proveniente da variedade SP 791011. 39
Figura 4.3 - Diagrama de Pareto para a concentração de sacarose residual quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6. 42
Figura 4.4 - Diagrama de Pareto para a viscosidade do meio fermentado quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6. 43
Figura 4.5 - Diagrama de Pareto para a conversão de substrato a produto quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6. 43
Figura 4.6 - Diagrama de Pareto para a concentração da goma quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6. 44
Figura 4.7 - Diagrama de Pareto para a viscosidade da solução 1% da goma quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6. 45
Figura 4.8 - Diagrama de Pareto para a concentração de sacarose residual quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0. 48
Figura 4.9 - Diagrama de Pareto para a viscosidade do meio fermentado quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0. 48
Figura 4.10 - Diagrama de Pareto para a conversão de substrato a produto quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0. 49
Figura 4.11 - Diagrama de Pareto para a concentração da goma quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0. 50
Figura 4.12 - Diagrama de Pareto para a viscosidade da solução 1% da goma quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0. 50
Figura 4.13 - Superfície de resposta para a concentração de sacarose residual quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h. 53
Figura 4.14 - Superfície de resposta para a viscosidade do meio fermentado quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h. 54
Figura 4.15 - Superfície de resposta para a conversão de substrato a produto quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h. 56

Figura 4.16 - Superfície de resposta para a concentração da goma quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h. 57
Figura 4.17 - Superfície de resposta para a viscosidade da solução 1% da goma quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h. 58
Figura 4.18 - Cinética da produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris* em meio de cultura a base de caldo de cana e 15g/L de sacarose inicial. 60
Figura 4.19 - Cinética da produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris* em meio de cultura a base de caldo de cana e 25g/L de sacarose inicial. 61
Figura 4.20 - Cinética da produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris* em meio de cultura a base de caldo de cana e 35g/L de sacarose inicial. 61
Figura 4.21 - Superfície de resposta para a viscosidade do meio fermentado quando o processo foi avaliado no reator. 65
Figura 4.22 - Superfície de resposta para a conversão de substrato a produto quando o processo foi avaliado no reator. 66
Figura 4.23 - Superfície de resposta para a concentração da goma quando o processo foi avaliado no reator. 68
Figura 4.24 - Superfície de resposta para a viscosidade da solução 1% da goma quando o processo foi avaliado no reator. 69
Figura 4.25 - Superfície de resposta para a produtividade quando o processo foi avaliado no reator. 71
Figura 4.26 - Representa a viscosidade absoluta da solução 1% das amostras de xantana em função da taxa de deformação comparada à xantana comercial. 72
Figura 4.27 - Espectro na região do infravermelho da amostra de xantana produzida quando a concentração de sacarose é igual a 15 g/L. 74
Figura 4.28 - Espectro na região do infravermelho da amostra de xantana produzida quando a concentração de sacarose é igual a 25 g/L. 75
Figura 4.29 - Espectro na região do infravermelho da amostra de xantana produzida quando a concentração de sacarose é igual a 35 g/L. 75
Figura 4.30 - Espectro na região do infravermelho de uma amostra de xantana comercial. 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Classificação das gomas industriais em função da origem. 7
Tabela 2.2 - Produção nacional de cana-de-açúcar nas Safras 98/99 à 2003/04. 8
Tabela 2.3 - Composição Química da Cana-de-açúcar. 8
Tabela 2.4 - Gomas microbianas e suas aplicações industriais. 12
Tabela 2.5 - Funções da goma xantana e aplicações típicas em alimentos. 13
Tabela 2.6 - Composição percentual média de polissacarídeos produzidos pela bactéria *Xanthomonas* (adaptado de Kennedy & Bradshaw, 1984). 21
Tabela 2.7 - Características químicas das amostras[a] de xantana. 21
Tabela 3.1 - Componentes dos meios de produção e suas respectivas concentrações em g/L. 29
Tabela 3.2 - Variáveis estudadas e seus níveis no primeiro planejamento. 29
Tabela 3.3 - Variáveis estudadas e seus níveis no segundo planejamento. 30
Tabela 3.4 - Variáveis estudadas e seus níveis no terceiro planejamento. 30
Tabela 3.5 - Variáveis estudadas e seus níveis no quarto planejamento. 30
Tabela 4.1 - Resultados obtidos das fermentações usando caldo de cana da variedade de cana de açúcar RB 835486, em diferentes meios de produção. 37
Tabela 4.2 - Resultados obtidos das fermentações usando caldo de cana da variedade de cana de açúcar SP 791011, em diferentes meios de produção. 38
Tabela 4.3 - Valores obtidos para as respostas relativas ao 1º planejamento experimental 2^3. 40
Tabela 4.4 - Regressão múltipla para a C_{SR} quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6. 42
Tabela 4.5 - Regressão múltipla para a μ_{MF} quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6. 42
Tabela 4.6 - Regressão múltipla para $Y_{P/S}$ quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6. 43
Tabela 4.7 - Regressão múltipla para C_G quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6. 44
Tabela 4.8 - Regressão múltipla para $\mu_{G1\%}$ quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6. 44
Tabela 4.9 - Valores obtidos para as respostas relativas ao 2º planejamento experimental 2^3. 46
Tabela 4.10 - Regressão múltipla para a C_{SR} quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0. 47
Tabela 4.11 - Regressão múltipla para a μ_{MF} quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0. 48
Tabela 4.12 - Regressão múltipla para $Y_{P/S}$ quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0. 49
Tabela 4.13 - Regressão múltipla para C_G quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0. 49
Tabela 4.14 - Regressão múltipla para $\mu_{G1\%}$ quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0. 50
Tabela 4.15 - Valores obtidos para as respostas relativas ao 3º planejamento experimental 3^2. 51
Tabela 4.16 – Regressão múltipla para a C_{SR} quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h. 52
Tabela 4.17 - Regressão múltipla para a μ_{MF} quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h. 53
Tabela 4.18 - Regressão múltipla para $Y_{P/S}$ quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h. 55

Tabela 4.19 - Regressão múltipla para C_G quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h. 56
Tabela 4.20 - Regressão múltipla para $\mu_{G1\%}$ quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h. 57
Tabela 4.21 - Pontos de otimização para a concentração de sacarose e o tempo de processo em erlenmeyer. 59
Tabela 4.22 - Valores obtidos para as respostas relativas ao 4° planejamento experimental 3^2. 63
Tabela 4.23 - Regressão múltipla para a μ_{MF} quando o processo foi avaliado no reator nos tempos iguais a 18, 24 e 30 h. 64
Tabela 4.24 - Regressão múltipla para $Y_{P/S}$ quando o processo foi avaliado no reator nos tempos iguais a 18, 24 e 30 h. 65
Tabela 4.25 - Regressão múltipla para C_G quando o processo foi avaliado no reator nos tempos iguais a 18, 24 e 30 h. 67
Tabela 4.26 - Regressão múltipla para $\mu_{G1\%}$ quando o processo foi avaliado no reator nos tempos iguais a 18, 24 e 30 h. 68
Tabela 4.27 - Regressão múltipla para a produtividade quando o processo foi avaliado no reator nos tempos iguais a 18, 24 e 30 h. 70
Tabela 4.28 - Pontos de otimização para a concentração de sacarose e o tempo de processo em reator. 71
Tabela 4.29 - Valores de K e n para xantana produzida a partir de caldo de cana e para xantana comercial. 73

RESUMO

O desenvolvimento do plano de trabalho proposto para esta dissertação refere-se à produção de goma xantana a partir de caldo de cana utilizando a bactéria *Xanthomonas campestris pv. campestris* NRRL B-1459. Os ensaios foram conduzidos em erlenmeyers de 500 mL e em reator de 2,0 L, numa faixa de concentração de sacarose de 15 a 40 g/L, seguindo criteriosamente planejamentos experimentais pré-estabelecidos, uma vez definidas as variáveis de processo e seus níveis. Primeiramente, duas variedades de cana-de-açúcar, RB 835486 e SP 791011, foram testadas em diferentes meios de produção visando selecionar a variedade e os meios fermentativos cujos valores de K (índice de consistência) e n (índice de comportamento) para o mosto fermentado representaram melhor a condição de fluido pseudoplástico. Na seqüência, dois planejamentos fatoriais a dois níveis e três variáveis definiram a composição adequada do meio para posteriores investigações relacionadas à biossíntese da goma. Contudo, surge o 3º planejamento com duas variáveis a três níveis, propiciando uma avaliação do ponto ótimo através das superfícies geradas para cada resposta analisada. Sobretudo, um aumento na escala pesquisada até então direcionou a execução dos ensaios em reator para verificar, sob condições controladas, o crescimento de microrganismos, o decréscimo da concentração de sacarose, a formação de produto, a viscosidade do mosto fermentado e a da solução 1% da goma após recuperação e purificação. Os testes em erlenmeyers foram realizados em mesa agitadora a 120 rpm e a 28º C enquanto no reator a agitação, a aeração e o pH mantiveram seus valores em 800 rpm, 0,5 vvm e 7,3 respectivamente. Dessa forma, os resultados encontrados nesse estudo apontam a variedade de cana SP 791011 com potencialidade notável para a produção de goma xantana e definiu-se também após execução de dois planejamentos o meio de produção constituído por caldo de cana diluído fortificado com quatro componentes para efetuar o 3º e 4º planejamentos. Logo, a viabilidade do processo de produção da goma xantana foi atestada em reator, atingindo 15,1 g/L de concentração de goma, 0,629 g/Lh de produtividade, 0,579 $g.g^{-1}$ de conversão de substrato a produto, 21509,9 cP de viscosidade a 0,75 s^{-1} para solução 1% de goma. As gomas produzidas foram comparadas a uma amostra comercial e apresentaram espectroscopia na região do infravermelho similares.

Palavras-chave: *Xanthomonas campestris pv. campestris* NRRL B-1459, goma xantana, caldo de cana, biopolímero.

ABSTRACT

The development of the work plan proposed for this dissertation refers to the production of xanthan gum from sugarcane juice using the bacterium *Xanthomonas campestris pv. campestris* NRRL B-1459. Tests were conducted in 500 mL erlenmeyers flasks and in a 2.0-L reactor, in sucrose concentration range from 15 to 40 g/L, judiciously following the pre-established experimental designs, when the process variables and its levels were defined. Firstly, two varieties of sugarcane, RB 835486 and SP 791011 were tested in different production media, aiming at selecting the variety and the fermentative media whose K values (rate of consistence) and *n* (behavior rate) for the fermented must represented in a better way the condition of pseudoplastic fluid. In the sequence, two factorial designs in two levels and three variables defined the appropriate composition of the medium for later investigations related to the gum biosynthesis. However, the third design appears with two variables and three levels, rendering favorable an evaluation of the optimum point through surfaces generated for each response analyzed. Above all, an increase in the scale researched until then guided the execution of tests in reactor for checking, under controlled conditions, the growth of microorganisms, decrease of sucrose concentration and the product formation, the viscosity of fermented must, and the 1% solution of gum after recovery and purification. Tests in erlenmeyer flasks were carried out in stirring table at 120 rpm and 28ºC while in the reactor, the agitation, aeration, and pH maintained their values in 800 rpm, 0.5 vvm and 7.3, respectively. In that way, results found in this study indicate that the variety of sugarcane SP 791011 has remarkable potential for the production of xanthan gum and after execution of two designs was defined too the medium of production constituted by dilute sugarcane, fortified with four components for effecting the 3rd and 4th designs. Then, the feasibility of the production process of xanthan gum was attested in reactor, reaching 15.1 g/L of gum concentration, 0.629 g/Lh of productivity, 0.579 g.g^{-1} of conversion from substrate to product, 21509.9 cP of viscosity at 0.75 s^{-1} for 1% solution of xanthan gum. Gums produced were compared to a commercial sample and presented a similar spectroscopy near infrared region.

Keywords: *Xanthomonas campestris pv. campestris* NRRL B-1459, xanthan gum, sugarcane, biopolymer.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

As gomas introduzidas mais recentemente no mercado são as produzidas por microrganismos. Compreendem a classe dos polissacarídeos de grande interesse industrial e possuem propriedades que em alguns casos, superam em características funcionais as gomas de origem vegetal, de algas e sintéticas.

Os exopolissacarídeos microbianos de importância econômica, comumente encontrados, são dextrana, xantana e gelana embora outras gomas possam apresentar também um grande impacto em áreas industriais (ASHTAPUTRE & SHAH, 1995; GLAZER & NIKAIDO, 1995). A principal característica exibida por estes polissacarídeos é a capacidade para modificar de maneira específica a reologia das soluções.

A goma xantana é um biopolímero classificado como hetero-exopolissacarídeo ramificado, aniônico, produzido por fermentação, empregando a bactéria *Xanthomonas campestris pv. campestris*. As bactérias do gênero *Xanthomonas* pertencem à família *Pseudomonodaceae*, reproduzindo-se por divisão binária, apresentam células em forma de bastonetes, gram-negativas tendo em média de 0,4 a 0,7 μm de largura por 0,7 a 1,8 μm de comprimento e ocorrem, predominantemente, isoladas. As colônias são geralmente lisas, viscosas e amarelas, resultantes da produção de um pigmento insolúvel em água conhecido como xantomonadinas (BRADBURY, 1984). Esse pesquisador revela ainda que tais microrganismos possuem metabolismo energético aeróbio, são quimiorganotróficos, sendo capazes de utilizar como fonte de carbono diversos carboidratos e sais de ácidos orgânicos.

Dentre as gomas microbianas, a xantana ocupa lugar de destaque no mercado por apresentar propriedades reológicas bastante distintas e incomuns, tais como: alto grau de pseudoplasticidade, elevada viscosidade mesmo a baixas concentrações, compatibilidade e estabilidade com a maioria dos sais metálicos, excelente solubilidade e estabilidade tanto em meio ácido quanto alcalino, resistência à degradação a elevadas temperaturas, assim como, a oscilações de pH. A goma exibe inúmeras vantagens como espessante, estabilizante, gelificante, agente de suspensão e de floculação nas indústrias alimentícia, petrolífera, farmacêutica, cosmética, de tintas, têxtil e de produtos agrícolas (MULCHANDANI *et al*., 1988; ASHTAPUTRE & SHAH, 1995).

Os estudos relacionados com a goma xantana tiveram início em 1955, nos Estados Unidos, em um Centro de Pesquisas ligado ao Departamento Americano de Agricultura, o Northern Regional Research Center (SANDFORD, 1979; SLODKI & CADMUS, 1978).

Publicações iniciais sobre o polissacarídeo xantana, de *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, surgiram em 1961 (ROGOVIN et al., 1961), e neste mesmo ano, a goma foi pela primeira vez isolada e caracterizada por JEANES *et al*. (1961).

A produção de xantana no mercado americano iniciou-se por volta de 1967 e mais tarde na Europa, sendo então considerada como modelo para a fabricação de outros biopolímeros (COLEGROVE, 1983; GODET, 1973; SANDFORD, 1979; SLODKI & CADMUS, 1978). Nos Estados Unidos, a goma xantana foi aprovada para utilização em alimento humano em 1969 (KENNEDY & BRADSHAW, 1984). Dois anos depois, o Canadá permitiu o seu uso, sendo seguido pela Comunidade Européia em 1974.

Sua estrutura primária foi estabelecida no ano de 1975, por Jansson *et al*. (1975) e a unidade repetitiva do polímero é mostrada na Figura 1.1.

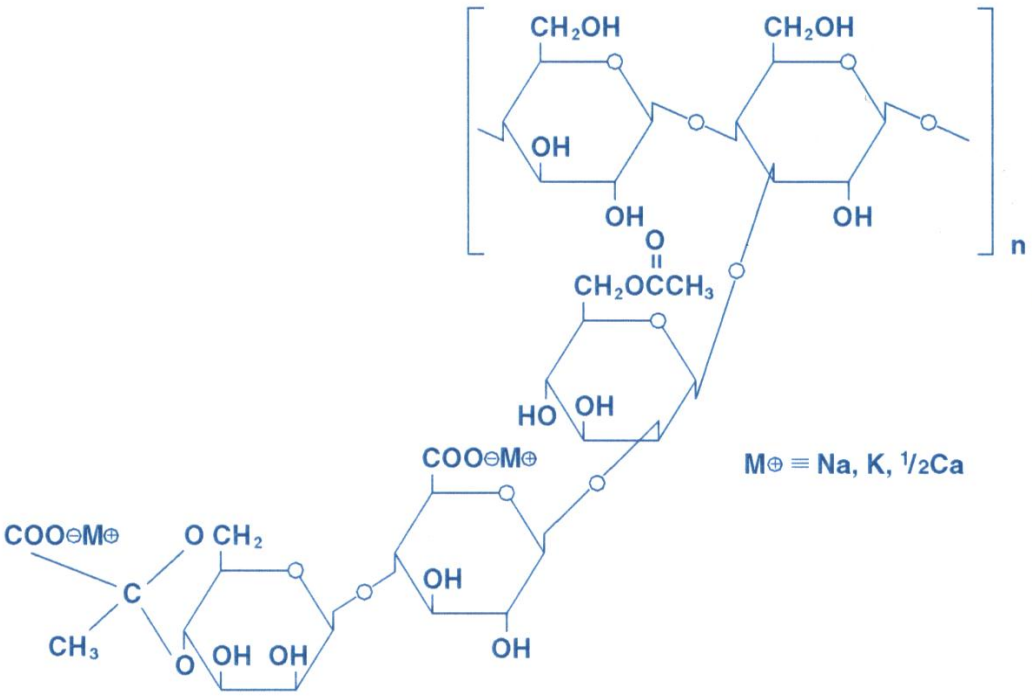


Figura 1.1 - Unidade estrutural repetitiva da goma xantana.

Como pode ser observado na Figura 1.1, a xantana é constituída por uma unidade pentassacarídica composta por glicose, manose e ácido glucurônico na proporção de 2:2:1, além dos grupamentos substituintes acetila e piruvato. A cadeia principal desta goma é formada por unidades de β-D-glicose, ligadas através das posições 1 e 4. A estrutura química do esqueleto polimérico é, portanto, idêntica à da celulose (JANSSON *et al*., 1975; MARZOCCA *et al*., 1991; MORRIS *et al*., 1993).

Atualmente, os maiores produtores de xantana são Merck e Pfizer nos Estados Unidos, Rhône Poulenc e Sanofi-Elf na França, e Jungbunzlauer na Áustria (GARCÍA-OCHOA *et al*., 2000). Estima-se uma produção mundial de 30000 toneladas (SKARACIS *et al*., 2003). O consumo de goma xantana nos Estados Unidos tem uma taxa de crescimento anual estimada entre 5 e 10% (HARCUM & YOO, 1999).

As fontes de carbono mais comumente empregadas na síntese da goma xantana são os carboidratos como amido, hidrolisado de amido, xarope de milho, glicose e sacarose. Apesar do Brasil ser um grande produtor da matéria prima para a fabricação deste biopolímero, toda goma xantana utilizada no país é importada, contribuindo negativamente para a balança comercial.

Logo, baseando-se nas considerações expostas, os objetivos desse estudo foram: testar caldo de cana como matéria-prima para produção de goma xantana, avaliar o desempenho de duas variedades de cana e de diferentes composições dos meios de produção empregando planejamentos experimentais e identificar dentro da faixa pesquisada os valores de concentração de sacarose e tempo de fermentação para um sistema batelada que maximizem as seguintes respostas: viscosidade do meio fermentado, concentração de goma, conversão de substrato a produto, produtividade e viscosidade da solução polimérica a 1%.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Materiais Poliméricos

Substâncias elásticas extraídas de resinas naturais, como a da seringueira, já eram conhecidas em certas regiões da América, Oceania e Ásia em épocas primitivas. Das crônicas de viajantes europeus medievais, como Marco Polo, constam relatos sobre a existência dessas substâncias, que foram introduzidas na Europa durante o Renascimento. Até o século XIX o aproveitamento desses materiais foi muito pequeno, mas o desenvolvimento da química permitiu seu aperfeiçoamento e o melhor aproveitamento de suas propriedades. Em 1862 o inglês Alexander Parkes criou a parquesina, o primeiro plástico propriamente dito. Sete anos mais tarde John Wesley Hyatt descobriu um elemento de capital importância para o desenvolvimento da indústria dos plásticos: a celulóide. Tratava-se de um material fabricado a partir da celulose natural, tratada com ácido nítrico e cânfora, substância cujos efeitos de plastificação foi muito usada em épocas posteriores (história do plástico – www.cafebandeira.com.br/histplast).

O termo polímero foi criado por Berzelius no século XIX. Polímeros são substâncias macromoleculares sintéticas ou naturais formadas pela união de monômeros que apresentam características físico-químicas adequadas, podendo atingir alto peso molecular (ODIAN, 1981; RUDIN, 1982).

O americano de origem belga Leo Hendrik Baekeland produziu em 1909, a primeira substância plástica sintética, a baquelita. Foi o início da indústria dos plásticos, que revolucionou a vida cotidiana e criou um dos maiores problemas ambientais do fim do século XX: a eliminação do lixo plástico (história do plástico – www.cafebandeira.com.br/histplast).

Os plásticos em seu estado final são sólidos, mas em determinada fase da fabricação pode comportar-se como fluido e adquirir outra forma. Em geral, os plásticos são materiais sintéticos obtidos por meio de fenômenos de polimerização ou multiplicação artificial dos átomos de carbono nas grandes correntes moleculares dos compostos orgânicos, derivados do petróleo ou de outras substâncias naturais. O nome plástico vem do grego, *plastikos*, "maleável". Os polímeros, moléculas básicas dos plásticos, estão presentes em estado natural em algumas substâncias vegetais e animais como a borracha, a madeira e o couro. Há

substâncias, como a celulose, que apesar de terem propriedades plásticas não se enquadram nessa categoria (história do plástico – www.cafebandeira.com.br/histplast).

Os plásticos são cada vez mais empregados na indústria automobilística e a empresa alemã BMW foi a pioneira na criação de automóveis com toda a carroçeria feita de um monobloco de plástico. A elaboração dos diversos processos de gravação e reprodução de imagem e som só se tornou possível graças ao uso de plásticos. As fitas de gravação em áudio e vídeo são feitas de polietileno. Há discos feitos de vinil e os filmes fotográficos e cinematográficos são fabricados em celulóide (história do plástico – www.cafebandeira.com.br/histplast).

Os polímeros se classificam como homopolímero, quando as unidades monoméricas são idênticas, ou heteropolímero, quando são constituídas por duas ou mais espécies de monômeros (WALTON & BACKWELL, 1973; TAGER, 1978; MANO, 1985).

Como espécies de macromoléculas sintéticas orgânicas destaca-se poliestireno, nylon, poli (cloreto de vinila), TEFLON, entre outros, e, como macromoléculas sintéticas inorgânicas citam-se os ácidos polifosfóricos e poli (cloreto de fosfonitrila). Os polissacarídeos, as proteínas, e os ácidos nucléicos se enquadram como macromoléculas orgânicas naturais e como exemplo de macromoléculas naturais inorgânicas merece destaque, o diamante, a grafite e a sílica (MANO, 1985).

Segundo Walton & Blackwell (1973), a produção de biopolímeros através da síntese biológica *in vivo* envolve macromoléculas como proteínas, ácidos nucléicos e polissacarídeos.

Os polissacarídeos ocorrem em quase todos os seres vivos e desempenham várias funções, muitas das quais ainda não esclarecidas. Estas macromoléculas são formadas pela união de várias unidades monossacarídicas ou de seus derivados, como os açúcares aminados, ácidos urônicos e outros, através de ligações glicosídicas. A maioria dos polissacarídeos naturais contém de 80 a 1000 unidades monossacarídicas, podendo ainda exceder 3000 unidades por cadeia polimérica (BOBBIO & BOBBIO, 1989; BROCK & MADIGAN, 1991; GLAZER & NIKAIDO, 1995). A dissolução destas moléculas em água ocorre por um processo contínuo de hidratação, com substituição das ligações polímero-polímero, por ligações polímero-solvente.

Com relação à classificação, os polissacarídeos denominam homopolissacarídeo e heteropolissacarídeo e quanto à sua estrutura podem ser lineares ou ramificados (GARRET & GRISHAM, 1997).

Uma característica importante dos polissacarídeos é a sua carga iônica. São classificados como aniônicos, neutros ou catiônicos. Exemplos de polissacarídeos

microbianos aniônicos incluem xantana, fosfomanana e alginato, enquanto levana, escleroglucana, pululana, dextrana e curdlana são caracterizados como neutros.

Fentanes (1985) especifica que os polissacarídeos microbianos extracelulares podem ser encontrados sob duas formas diferentes: ligados à parede celular, denominados de capsulares, ou como mucos solúveis aumentando substancialmente a viscosidade do caldo em fermentação. Estes são os mais produzidos industrialmente.

Os exopolissacarídeos são produzidos largamente por bactérias e microalgas e, menos freqüentemente, por leveduras e fungos filamentosos (ROLLER & DEA, 1992). Em decorrência da grande diversidade bacteriana, do rápido crescimento, e da versatilidade nutricional, estes microrganismos se destacam como fonte promissora na produção de biopolímeros. Segundo Sutherland (1990), os polímeros microbianos apresentam alto grau de regularidade, uma vez que estão isentos de flutuações de ordem climática ou sazonais, fato raro de ocorrer nos polissacarídeos obtidos a partir de outras fontes.

Kay *et al*. (1993) enfatizam que os biopolímeros são, na sua maioria, compostos atóxicos, biodegradáveis, produzidos extracelularmente por microrganismos não patogênicos a partir de fermentações em batelada com eficiência próxima a 50% na conversão do substrato.

As gomas são substâncias poliméricas que, usualmente em solventes, mesmo a baixas concentrações, são capazes de formar soluções altamente viscosas. Industrialmente classificam-se em três grandes grupos: naturais, modificadas ou semi-sintéticas e sintéticas (GLICKSMAN, 1979; FENTANES, 1985). As naturais podem ser obtidas de exsudatos de árvores, sementes, algas ou por fermentação, enquanto as modificadas são derivadas de polissacarídeo, como a celulose. A Tabela 2.1 mostra os tipos e origens destes polissacarídeos.

Tabela 2.1 - Classificação das gomas industriais em função da origem.

Tipo	Origem	Gomas
Naturais	Exsudatos de plantas terrestres	arábica, alcatira, caraia, etc
	Extratos de plantas terrestres	pectina
	Sementes	guar, alfarroba, tamarindo
	Algas marinhas	ágar, alginatos, carragenana
	Amido de tubérculos	tapioca
	Gomas microbianas ou biossintéticas	dextrana, xantana, gelana, pululana, dentre outras
Modificadas ou Semi-sintéticas	Celulose	Carboximetilcelulose, metilcelulose, hidroxietilcelulose
	Amido	Dextrina, xantato de amilose, hidroxietilamido
	Extrato de origem animal	Derivados hidrossolúveis da quitina
Sintéticas	Derivadas da petroquímica	Álcool polivinílico, sais do ácido poliacrílico, polivinilpirrolidona, policarboxivinil, polímeros de óxido de etileno.

Fonte: (GLICKSMAN, 1979; FENTANES, 1985)

2.2 – Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é originária da Nova Guiné. Foi introduzida na América por Cristóvão Colombo e no Brasil por Martin Afonso de Souza no ano de 1532. A história deste setor se confunde com a História do Brasil.

A cana-de-açúcar é uma cultura que se estabeleceu no Brasil para contar sua própria história e testemunhou impassível nestes quase cinco séculos de existência em solo brasileiro, a resistência indígena, a luta dos negros africanos e brasileiros por liberdade nas senzalas, a opulência dos senhores de engenho nas casas-grandes, o período colonial, o Império, a República, o Estado Novo, as tentativas de democratização, o golpe militar de 64, a redemocratização e a Constituição de 1988 (informações extraídas: www.seag.es.gov.br/cana).

De acordo com a Monsanto, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, responsável por 25% da produção mundial, sendo que 60% saem do estado de São Paulo (Fonte: Site Monsanto 06/06/02).

A Tabela 2.2 consta no site www.orplana.com.br/estatisticas e refere-se a dados nacionais da produção de cana-de-açúcar nas últimas safras.

Tabela 2.2 - Produção nacional de cana-de-açúcar nas Safras 98/99 à 2003/04.

Região Canavieira	**SAFRAS**					
	98/99	99/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04
Centro/Sul	269.522.995	263.969.616	207.099.057	244.219.523	268.547.942	298.597.318
São Paulo	199.313.949	194.234.474	148.256.436	176.574.250	190.627.892	207.572.535
Demais do CS	70.209.046	69.735.142	58.842.621	67.645.273	77.920.050	91.024.783
Norte/Nordeste	45.141.192	36.444.343	49.291.326	47.704.407	50.463.092	60.194.968
BRASIL	314.664.187	300.413.959	256.390.383	291.923.930	319.011.034	358.792.286

Diante de um cenário nacional totalmente favorável à produção de cana-de-açúcar e conhecendo sua riqueza nutricional em termos de composição dada pela Tabela 2.3, a decorrência de tais considerações é a exploração racional desta fonte de carbono em processos fermentativos que agregam valor ao produto. Sendo assim, a produção de goma xantana proposta neste estudo foi realizada utilizando caldo de cana como matéria-prima.

Tabela 2.3 - Composição Química da Cana-de-açúcar.

Componentes	**Variação %**	**Componentes**	**Variação %**
Água	65 - 75	Pentosana	1,75 - 2,25
Açúcares	12 - 18	Matérias minerais Si, K, Ca, Mg, Na, etc.	0,10 - 0,80
Sacarose	11 - 18	Matérias nitrogenadas Aminoácidos, amidas albuminóides, nitratos	0,20 - 0,60
Glicose	0,20 - 1,00	Gorduras e Cêras	0,15 - 0,25
Frutose	0,00 - 0,60	Ácidos combinados	0,10 - 0,15
Fibra	8 - 16	Ácidos livres	0,10 - 0,15
Celulose	5,00 - 6,50	Pento-hexosanas	0,25 - 0,75
Lignina	1,50 - 2,50	Vitaminas	Não dosadas

Fonte: Site Orplana, Informativo Nº: 4, Abril 2001

2.3 – Gomas oriundas de algas

A carragena foi descoberta em 1785 na cidade de Carragena, norte da Irlanda, onde as algas eram utilizadas para aumentar a viscosidade do leite consumido pela população.

Hoje existem muitas regiões produtoras de algas espalhadas pelo mundo, tais como Costa do Marrocos, França, Irlanda, Brasil (Costa do Rio Grande do Norte), Chile, Ásia (Indonésia e Filipinas) e outras. As carragenas são um grupo de polissacarídeos naturais que

estão presentes na estrutura celular de algas do tipo *Rodophyceae*. Têm a particularidade de formar colóides e géis em meios aquosos a concentrações muito baixas. Esses géis são transparentes e termorreversíveis, conseguindo uma ampla variedade de texturas desde muito elásticas e coesas, até géis firmes e quebradiços, dependendo da combinação das frações que se utiliza. O poder de gelificação da carragena é muito maior em leite devido a sua interação com a caseína (CREDIDIO, 2003 - www.corpoclinico.com. br).

Devido a estas propriedades funcionais são amplamente utilizadas com diversas aplicações na indústria alimentícia, além da indústria farmacêutica e cosmética.

A carragena está catalogada pela Administração de Medicamentos e Alimentos dos EUA (FDA - Foods and Drugs Administration) como não tóxica e segura para uso humano. No final de 1976, o grau alimentício da carragena (definida como tendo uma viscosidade na água de não menos que 5 cp numa concentração de 1,5% e 75ºC, que corresponde a um peso molecular de 100.000) demonstrou que o produto é seguro (SOLER, 1993 - www.corpoclinico.com. br).

2.4 – Gomas de origem microbiana

O primeiro polissacarídeo microbiano produzido em escala industrial foi a dextrana, sendo constituída por unidades de α-D-glicose unidas predominantemente por ligações do tipo α 1-6 glicosídicas (MURPHY & WHISTLER, 1973). A dextrana é um polissacarídeo extracelular ramificado, sintetizado principalmente por *Leuconostoc mesenteroides* em processo descontínuo tendo a sacarose como substrato. Outro tipo de processo para a produção da dextrana em meio líquido é por via enzimática, ou seja, utilizando enzimas purificadas (sem a ação da bactéria). As enzimas são primeiramente produzidas e purificadas e depois, utilizadas para a síntese do polímero em meio contendo substrato (PADILHA, 1997).

A dextrana é produzida pela enzima dextranassacarase, uma glicosiltransferase extracelular que catalisa a clivagem da sacarose, a transferência de resíduos glicosil a partir dessa clivagem para a cadeia de crescimento da dextrana, a formação de ligações glicosídicas usando um açúcar difosfo nucleotídeo como o açúcar doador e a liberação de frutose (ARGUELLO-MORALES *et al*., 1999; DOLS *et al*., 1998; GEREMIA *et al*., 1996).

O estudo da produção de biopolímeros via enzimática é de grande importância, pois além de diminuir os riscos de contaminação, reduz os custos industriais do processo e

possibilita a obtenção de produtos com melhores características (VENDRUSCOLO *et al*., 2003).

A família gelana é constituída pelas gomas gelana, welana e ransana, S-198 e S-657. Os três primeiros produtos são produzidos comercialmente e possuem esqueletos poliméricos idênticos, formados por unidades de glicose, ácido glucurônico e ramnose. A gelana é um agente gelificante, produzido e comercializado com o nome de Gelrite (LOPES & ANDRADE, 1995; NAKAMURA *et al*., 1996).

Com relação à welana e ransana, sabe-se que estes exopolissacarídeos ramificados não formam gel, produzindo soluções altamente viscosas e termoestáveis. A welana é comercializada pela Kelco sob a marca Biozan (LOPES & ANDRADE, 1995).

Os alginatos são obtidos comercialmente por extração em algas *Macrocystis*, *Laminaria*, *Ecklonia*, *Lessonia* e *Ascophyllum*, sendo utilizados industrialmente como agentes gelificantes. Os alginatos também podem ser produzidos pelas bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Azobacter vinelandii* (WHISTLER & BeMILLER, 1993).

A curdlana, sintetizada por *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* e algumas espécies de *Agrobacterium* e *Rhizobium* é formada exclusivamente por unidades de β-D-glicose (SUTHERLAND, 1990; WHISTLER & BeMILLER, 1993). Nas indústrias este biopolímero pode ser utilizado como gelificante em ração animal, ligante para tabaco e como agente imobilizador de enzimas.

Dentre os polissacarídeos hidrossolúveis sintetizados por fungos, chamamos atenção para as gomas pululana e escleroglucana. As propriedades da pululana fazem deste biopolímero um excelente adesivo, espessante, estabilizante e agente de revestimento para várias aplicações. É usada para a fabricação de filmes de resistência mecânica adequados para embalagens de produtos alimentícios e fármacos (PICTON *et al*., 1995).

Escleroglucana é um polissacarídeo neutro capsular secretado por certos fungos (GRASS *et al*., 1996). Foi desenvolvida e patenteada, em 1967, pela empresa americana Pillsburry Company, sendo atualmente produzida e comercializada pela indústria francesa Sanofi Bio-Industries (YALPANI & SANDFORD, 1987; LOPES & ANDRADE, 1995).

Pode-se ainda citar outros polissacarídeos microbianos que vêm sendo estudados neste momento: as gomas acetana e succinoglicanas. As gomas acetana e xantana são idênticas em relação ao esqueleto polimérico, as unidades monossacarídicas da ramificação, e ao tipo de ligação glicosídica entre a cadeia principal e lateral (COUSO *et al*., 1987).

Succinoglicanas é o nome genérico de um grupo de polissacarídeos aniônicos ramificados, formados por unidades de D-glicose e D-galactose, sendo sintetizada por

Alcaligenes faecalis var. *myxogenes*, *Pseudomonas sp*., *Agrobacterium sp*. e *Rhizobium meliloti* (HARADA *et al*., 1965). Além da analogia estrutural, as propriedades físico-químicas e reológicas das succinoglucanas são bastante semelhantes àquelas descritas para a xantana. Esta goma é produzida industrialmente pela Shell Co. inglesa. Os estudos mais promissores sobre a sua utilização são na recuperação do petróleo (LOPES & ANDRADE, 1995).

O biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. 7070 é denominado clairana. Pode ser utilizado como agente de suspensão, gelificante, emulsificante e em produtos da linha *diet* e *light*, como substituto de gorduras ou como estruturante ou espessante (VENDRUSCOLO *et al*. 2003). Além disso, pode substituir as gomas comumente usadas na indústria de alimentos, como o amido e outros. *Beijerinckia* sp. 7070 é uma bactéria gram-negativa, e a sua via biossintética ainda não é conhecida.

Na produção de exopolissacarídeos (EPS), por bactérias gram-positivas, enzimas lipoprotéicas extracelulares estão envolvidas e são secretadas na superfície da célula. Já a síntese de EPS (hetero e homopolissacarídeos) por bactérias gram-negativas é intracelular (SUTHERLAND, 2001) e instável em diferentes espécies bacterianas, como *Xanthomonas campestris* (MARTINS & SÁ-CORREIA, 1994). Estudos bioquímicos e fisiológicos demonstraram que a síntese de xantana é similar a biossíntese de EPS de outras bactérias gram-negativas (KÖPLIN *et al*., 1992; SUTHERLAND, 1988).

O polihidroxibutirato (PHB) é um poliéster termoplástico acumulado intracelularmente em alguns tipos de bactérias (*Bacillus subtilis, Pseudomonas oleovorans, Alcaligenes eutrophus*, entre outras) até um nível de 80% da massa seca celular, sua produção permite a fabricação de plásticos biodegradáveis (VICENZI, sd).

Outros microrganismos como *Escherichia coli* S61 (ROSS-MURPHY *et al*., 2003) e *Pseudomonas caryophylli* CFR 1705 (THARANATHAN *et al*., 2004) também produzem exopolissacarídeos. O polissacarídeo produzido por *Escherichia coli* S61 foi denominado *colanic acid* e a análise química revelou a presença de glicose, galactose, ácido glucurônico, acetato e piruvato na sua estrutura. Já o polissacarídeo extracelular isolado de *Pseudomonas caryophylli* CFR 1705 num meio a base de lactose foi caracterizado por cromatografia apresentando na sua estrutura ramnose, manose e glicose, respectivamente, na razão de 1: 3,26: 4,97. O peso molecular encontrado para este biopolímero foi na ordem de $1{,}1 \times 10^3$ KDa.

A Tabela 2.4 apresenta resumidamente gomas de origem microbiana de grande impacto nas áreas industriais (ASHTAPUTRE & SHAH, 1995; GLAZER & NIKAIDO, 1995).

Tabela 2.4 - Gomas microbianas e suas aplicações industriais.

Gomas	**Microrganismo**	**Composição**	**Aplicações Industriais**
Xantana	*Xanthomonas campestris*	β-D-glicose, manose e ácido glucurônico	Espessante, emulsificante, estabilizante, agente de suspensão
Dextrana	*Acetobacter sp.* *Leuconostoc mesenteroides* *Streptococcus mutans*	α-D-glicose	Expansor sangüíneo
Alginato	*Pseudomonas aeruginosa* *Azotobacter vinelandii*	Ácidos D-manurônico e L-gulurônico	Agente gelificante
Curdlana	*Alcaligenes faecalis*	β-D-glicose	Agente gelificante
Gelana	*Sphingomonas elodea*	D-glicose, ramnose e ácido glucurônico	Agente gelificante
Escleroglucana	*Sclerotium glutanicum*	β-D-glicose	Recuperação de petróleo
Pululana	*Aureobasidium pullulans*	α-D-glicose e maltotriose	Material plástico

2.5 – Goma Xantana

A goma xantana é um heteropolissacarídeo ramificado, aniônico, extracelular, produzido em meio adequado por bactérias fitopatógenas do gênero *Xanthomonas* (HASSLER & DOFERTY, 1990; VOJNOV *et al*., 1998). A xantana apresenta peso molecular na faixa de 1,5-5,0*10^4 KDa e polidispersão entre 1,2 e 2 (KENNEDY & BRADSHAW, 1984; WHISTLER & BeMILLER, 1993).

As principais rotas metabólicas envolvidas para formação de xantana por *Xanthomonas campestris* envolvem a via de Entner-Doudoroff, que cataboliza cerca de 80% da glicose disponível até piruvato, o qual segue para o ciclo do ácido tricarboxílico e a via da pentose-fosfato que metaboliza a glicose remanescente (ZAGALLO & WANG, 1967; ROSEIRO *et al*., 1993).

Quando comparada a outros biopolímeros, seu mecanismo segundo Vendruscolo *et al*. (2003) é mais complexo e segue os seguintes passos: (1) síntese de precursores UDP-glicose, UDP-ácido glicurônico e GDP-manose a partir da conversão de açúcares simples, (2) transferência de monossacarídeos, a partir do nucleotídeo correspondente para o lipídeo carregador localizado na membrana da célula, para formar 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. O local preciso do processo de polimerização e o estágio final da secreção do EPS a partir da

membrana citoplasmática, envolvendo a passagem através do periplasma e membrana exterior e a excreção para o ambiente extracelular, ainda são pouco elucidados (HARDING *et al*., 1994; SUTHERLAND, 1997; SUTHERLAND, 2001). Alguns autores consideram que primeiro ocorre a polimerização das unidades pentassacarídicas no interior da célula, e após a excreção do polissacarídeo para o exterior (COPLIN & COOK, 1990; HARDING *et al*., 1994; HARDING *et al*., 1993; KATSEN *et al*., 1998; SUTHERLAND, 2001). Já segundo Köplin *et al*. (1992), as unidades pentassacarídicas são secretadas e após polimerizadas.

Estudos recentes mostram que a biossíntese da xantana em *Xanthomonas campestris pv. campestris* é controlada por um cluster de doze genes (VOJNOV *et al*., 1998).

A Tabela 2.5 mostra as funções da goma xantana e sua aplicação na área de alimentos (SUTHERLAND, 1990).

Tabela 2.5 - Funções da goma xantana e aplicações típicas em alimentos.

Função	Aplicação típica
Adesivo	Panificação (confeitarias)
Agente de inchamento	Alimentos dietéticos
Inibidora de cristalização	Xaropes, alimentos congelados
Agente de suspensão	Suco de frutas, leite achocolatado
Emulsificante	Molho para salada
Estabilizador de espuma	Cerveja
Agente gelificante	Pudins, sobremesas
Estabilizador	Maionese, sorvete, molhos para saladas
Inibidor de sineresis	Queijo, alimentos congelados
Agente espessante	Geléias, molhos

2.6 – Microrganismos Produtores de Goma Xantana

Os microrganismos capazes de produzir polissacarídeos do tipo muco são alvo de maior interesse, uma vez que estes polissacarídeos, sendo mais facilmente recuperados do meio de fermentação, apresentam conseqüentemente maior potencial de comercialização (MARGARITIS & PACE, 1985).

A goma xantana comercial é produzida por linhagens de *Xanthomonas campestris pv. campestris* (RAMIREZ *et al*., 1988; BECKER *et al*., 1998) conforme Figura 2.1.

Figura 2.1 - Aspecto da cultura de *Xanthomonas campestris pv. campestris*
Fonte: google / imagens / *Xanthomonas campestris* (01/07/2005).

Embora a presença do pigmento seja um parâmetro usado para a identificação, a sua ausência não exclui o gênero *Xanthomonas*, tendo em vista que *Xanthomonas campestris pv. manihotis* e algumas linhagens de *Xanthomonas campestris pv. ricini* ocorrem naturalmente como organismos não pigmentados (BRADBURY, 1984).

As bactérias *Xanthomonas campestris pv. campestris* produzem um grande número de enzimas extracelulares, tais como glicanases, celulases, poligalacturonato liases, amilases e proteases, com diferenças significativas entre os vários "pathovares". Alguns trabalhos têm demonstrado que a síntese e excreção destas enzimas são essenciais ao processo de fitopatogenicidade (GOUGH *et al*., 1988).

Pierce & Pallent (1990) sugeriram um teste diagnóstico para a diferenciação de *Xanthomonas* de outros gêneros que formam também colônias amarelas, baseado na viscosidade de suspensões bacterianas. Estes autores concluíram que o método é eficaz: todos os isolados que apresentaram as maiores viscosidades foram posteriormente identificados como *Xanthomonas*.

Quando *Xanthomonas fragariae* e *Xanthomonas campestris* crescem em meio contendo carboidratos, são observadas colônias mucosas resultantes da produção de polissacarídeo extracelular (goma xantana).

O gênero *Xanthomonas* compreende um grupo de bactérias fitopatógenas que causam necrose, murchamento e apodrecimento de diversas plantas. A única exceção é a *Xanthomonas maltophilia* que se trata de um patógeno oportunista de humanos. As lesões nos vegetais são freqüentemente de cor amarelo forte e de consistência viscosa (HOLT *et al*.,

1995). A Figura 2.2 mostra a lesão causada por *Xanthomonas campestris pv. campestris* em folhas de couve.

Figura 2.2 - Lesão causada por *Xanthomonas campestris pv. campestris* em folhas de couve.
Fonte: google / imagens / *Xanthomonas campestris* (01/07/2005).

Xanthomonas campestris é o agente causal da podridão negra e, dentro da família das crucíferas, praticamente todas as espécies do gênero *Brassica* a ele são suscetíveis em maior ou menor grau: *Brassica chinensis* L. (couve chinesa), *B. napus* L. (colza), *B. nigra* koch (mostarda), *B. oleraceae* L. var. *caulo-rapa* Pask (couve-nabo), *B. oleraceae* L. var. *geminifera* Zenker (couve de Bruxelas), *B. napa* L. (nabo), *Mathiola incana* B. R. (goivo) e *Raphanus sativus* L. (rabanete) (RAMIREZ *et al*., 1988; GLAZER & NIKAIDO, 1995). A Figura 2.3 mostra a lesão causada por *Xanthomonas campestris pv. campestris* em repolho.

Figura 2.3 - Podridão negra causada por *Xanthomonas campestris pv. campestris* em repolho.
Fonte: google / imagens / *Xanthomonas campestris* (01/07/2005).

A infecção é difundida pelas sementes contaminadas com a bactéria. Como a planta emerge e cresce, a bactéria coloniza a sua superfície e bactérias epifíticas, como *Xanthomonas campestris pv. campestris*, penetram nos tecidos internos das folhas dos hidantódios, que são estruturas da margem da folha que permitem à planta excretar água. Elas, então, migram através do sistema vascular e, progressivamente, causam clorose, deposição de melanina e, por último, apodrecimento. Ao todo, trinta genes contribuem para a fitopatogenicidade de *Xanthomonas campestris* (GLAZER & NIKAIDO, 1995).

Em 1994, Galindo sugere o isolamento e a seleção de linhagens de *Xanthomonas campestris* provenientes de habitats naturais como uma importante ferramenta que conduz à escolha de linhagens com melhor capacidade produtiva e/ou novas propriedades reológicas.

O uso de uma linhagem microbiana particular, juntamente com as condições do processo como meio de cultivo, agitação e teor de oxigênio dissolvido, são fatores que podem determinar a produtividade do processo e a qualidade da goma (ROSEIRO *et al*., 1992; FLORES *et al*., 1994).

Becker *et al*. (1998) relatam que muitos outros pathovares, além do *campestris*, produzem eficientemente exopolissacarídeos, como: *phaseoli*, *malvacearum*, *carotae*, *citrumelo*, *juglandis*, além de outras espécies do gênero *Xanthomonas* (*Xanthomonas fragariae*, *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*).

2.7 – Classificação e características dos mostos

Quanto à classificação dos mostos, podem ser sintéticos ou complexos. Os mostos sintéticos são aqueles cuja composição é conhecida quantitativamente e qualitativamente e é usado em pesquisas quando se quer controlar exatamente o curso de uma fermentação. O objetivo é saber a rota de fermentação, saber quanto e quando e quais os substratos estão sendo utilizados pelos microrganismos. Tem um alto custo. Para mostos complexos, a composição não é bem definida, enquadrando nesta categoria os meios naturais tais como: caldo de cana, melaço, suco de uva, entre outros.

Os principais requerimentos básicos que caracterizam os mostos são:

1) Proporcionar o máximo rendimento de produto ou biomassa por grama de substrato usado;
2) Produzir a máxima concentração de biomassa ou produto;
3) Permitir o máximo rendimento na formação do produto;
4) Produzir o mínimo de subprodutos indesejáveis;
5) Ser de uma qualidade permanente e estar disponível durante o ano todo;

6) Não sofrer degradação durante a esterilização;
7) Não deverá causar problemas em outras etapas do processo fermentativo particularmente: aeração, agitação, extração, purificação e tratamentos dos efluentes (VICENZI, sd).

2.8 – Processo Fermentativo

Desde 1961, quando Rogovin *et al*. publicaram o primeiro trabalho sobre produção de goma xantana, muitos outros se seguiram, onde foram estudados os vários aspectos do processo fermentativo, por *Xanthomonas campestris*.

Concentrações iniciais de glicose de 1 a 10% foram testadas por Rogovin *et al*. (1961), quando observaram um decréscimo acentuado do rendimento em polímero, calculado com base na concentração inicial de glicose no meio, à medida que esta era aumentada. A maior conversão de glicose em polímero (90%) foi obtida para concentração inicial de 1%. Concentrações crescentes de polímero no meio foram observadas como conseqüência do aumento da concentração inicial de glicose até o limite de 4%, momento em que a concentração de polímero permaneceu constante independentemente da concentração de glicose disponível para a fermentação. Pareceu-lhes que a concentração ótima de glicose inicial situava-se na faixa de 2,5 – 3,0%.

Os primeiros estudos nutricionais sobre a composição do meio de produção foram realizados por Davidson (1978) em cultivo contínuo, e por Souw & Demain (1979), em batelada. Souw & Demain (1979) estudaram diferentes fontes de carbono e nitrogênio e concluíram que as melhores fontes de carbono são açúcares, especialmente glicose e sacarose. Encontraram para a linhagem NRRL B-1459 um aumento na produção de xantana quando foram adicionados ácidos orgânicos, como cítrico e succínico, devido à atuação no controle do pH do meio, favorecendo a síntese da goma.

Souw & Demain (1979) obtiveram os melhores resultados em termos de peso do polímero/peso do meio fermentado, utilizando sacarose e glicose na concentração inicial de 4%. Foi também observado efeito estimulante para a formação de xantana quando foram adicionados piruvato (0,3 – 1,0%), α-cetoglutarato (0,6%) ou succinato (0,5 – 1,0%) à 4% de sacarose. Baixas concentrações de ácidos orgânicos metabolizadas através do Ciclo de Krebs, tais como acetato (ESGALHADO, 1997), piruvato, succinato, α-cetoglutarato (SOUW & DEMAIN,1979), e citrato (SOUW & DEMAIN, 1979; JANA & GHOSH, 1995), têm sido relatadas como estimuladoras da produção de xantana em processos contínuos e em batelada usando *Xanthomonas campestris*. Norton *et al*., (1984) relatam que fermentações com

concentrações iniciais de glicose acima de 2% são complicadas pela alta viscosidade apresentada e por problemas de mistura, que reduzem a conversão, aumentam o tempo de processo e os custos operacionais.

Além do tipo de substrato utilizado, a concentração inicial deste no meio de cultivo parece ser um fator decisivo para o sucesso do processo fermentativo.

Thonart *et al*. (1985) concluíram que a produção de polímero é altamente dependente da concentração inicial de açúcar, enquanto o crescimento do microrganismo não. Foi relatada uma produção decrescente de polímero à medida que a concentração inicial de glicose foi aumentada, caindo rapidamente a razão polímero/biomassa para concentrações iniciais maiores que 3%.

A produção dos exo-biopolímeros pode ser de crescimento associado (pululana e alginato), crescimento não associado (biopolímeros de *Pseudomonas* sp) ou parcialmente associado (goma xantana) (WEISS & OLLIS, 1980; PINCHES & PALLENT, 1986).

Entre os parâmetros da fermentação que podem afetar o processo produtivo está o pH do meio. Os valores de pH diminuem durante o curso da fermentação, devido à formação de ácidos orgânicos e a radicais ácidos existentes na própria estrutura da goma. Valores inferiores a 5,0 diminuem a formação da goma (KENNEDY & BRADSHAW, 1984), devendo o pH ser mantido próximo à neutralidade (7,0-7,5) pela adição de base ao processo. O controle do pH permite, assim, que a síntese do polissacarídeo continue até a exaustão do carboidrato (WHISTLER & BeMILLER, 1993).

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

Um balanço do substrato utilizado para a produção de polissacarídeos pode ser escrito pela Equação 2.1, que considera a conversão do substrato à massa celular e produto, bem como o consumo de substrato para manutenção:

$$-\frac{ds}{dt}=\frac{1}{Y_{x/s}}\frac{dx}{dt}+\frac{1}{Y_{p/s}}\frac{dp}{dt}+K_e X \qquad (2.1)$$

onde o último termo desta Equação corresponde ao substrato usado para atividades como motilidade celular, "enzyme turnover", trabalho osmótico, estocagem de nutrientes e outros processos e está relacionado a funções de manutenção (MULCHANDINI *et al*., 1988).

A temperatura é uma das mais importantes variáveis que afetam a fermentação para a produção de xantana. Moraine & Rogovin (1966) preconizam que 28° C seria a temperatura ótima de produção para *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Os estudos de Shu & Yang (1990), realizados com a mesma linhagem da bactéria, mostraram que o melhor intervalo de temperatura para o crescimento celular estava entre 24-27° C, enquanto que, para produção de xantana, as temperaturas mais apropriadas estavam compreendidas entre 30-33° C.

Além da temperatura, outras variáveis como a aeração e a agitação são igualmente importantes para a boa condução do processo fermentativo da xantana. Galindo *et al*. (1989) relatam que o controle dessas variáveis é de extrema relevância, pois ocorrem muitas mudanças nas propriedades reológicas do mosto devido à produção do biopolímero tornando o sistema bastante complexo em termos de mistura.

Xanthomonas campestris é capaz de crescer em uma variedade de substratos e a xantana tem sido produzida em uma ampla faixa de meios de cultura definidos e complexos (SUTHERLAND, 1990).

A fonte de nitrogênio utilizada no processo fermentativo pode ser vários produtos ricos em proteínas, tais como hidrolisado de levedura, farinha de soja, farinha de semente de algodão ou hidrolisado de caseína (ROSEIRO *et al*., 1993). Tradicionalmente, o nitrogênio tem sido o nutriente limitante (SUTHERLAND, 1990) e bons rendimentos em xantana requerem valores adequados para a relação carbono/nitrogênio (SUTHERLAND, 1990; ROSEIRO *et al*., 1992).

Além das fontes de carbono e nitrogênio para o meio de produção da xantana, devem ser adicionados fósforo, potássio, magnésio, cálcio e enxofre, além de traços de elementos apropriados (SUTHERLAND, 1990; ROSEIRO *et al*., 1992).

El-Salam *et al*. (1994) pesquisaram a produção de goma xantana usando um meio à base de melaço de cana-de-açúcar e a linhagem de *Xanthomonas campestris* E-NRC-3. Alcançaram para a melhor condição experimental 70,5 g/L de xantana, partindo de 25,0% de açúcar. Várias fontes de nitrogênio foram empregadas, mas os autores concluíram que a melhor foi o cloreto de amônio. O fator de conversão de substrato a produto obtido foi 0,38 $g.g^{-1}$.

A produção de xantana em escala industrial conforme WHISTLER & BeMILLER (1993) permanece sendo realizada por operações em batelada, apesar das vantagens

apresentadas pelo sistema contínuo. O risco de contaminação continua inviabilizando este sistema, impedindo desta forma sua ampla utilização pela indústria. Têm sido relatados alguns desenvolvimentos para o processo contínuo na síntese da goma xantana.

De Vuyst & Vermeire (1994), em trabalho utilizando a linhagem NRRL B-1459, formularam meios industriais para produção de xantana constituídos de sacarose (4,0%), glicose (4,0%), melaço (10,0%) ou sirodex A (xarope de glicose – 2,8%) como única fonte de carbono, milhocina (2,0%) como fonte combinada de fosfato-nitrogênio, adicionados de fosfato (0,1%) e citrato (0,1%), dependendo da aplicação da xantana formada.

Em vista do crescente interesse neste biopolímero, esforços por parte dos pesquisadores vêm sendo realizados para reduzir o custo envolvido na produção e melhorar o rendimento e a produtividade. Na maioria dos trabalhos relatados na literatura, a glicose e a sacarose têm sido usadas como fonte de carbono e os sais de amônio como fonte de nitrogênio (RAJESHWARI *et al*., 1995).

A linhagem, as condições de fermentação e composição do meio são responsáveis pelas variações na estrutura da xantana e, conseqüentemente, em suas propriedades. Logo, para a produção industrial, as condições de processo escolhidas dependerão não somente do rendimento desejado, mas também, do uso final do polímero e, por conseguinte, da qualidade e dos objetivos (SUTHERLAND, 1990; SUTHERLAND, 1996).

Umashankar *et al*. (1996) realizaram fermentação em batelada com o intuito de alcançar o mais alto rendimento. Os fatores que influenciaram a produção, principalmente os nutrientes, foram investigados. Eles concluíram que a concentração dos componentes do meio de cultivo para atingir uma maior produção de xantana usando *Xanthomonas campestris* foram: glicose 30,0 g/L, extrato de levedura 3,0 g/L, K_2HPO_4 6,0 g/L e $MgSO_4$ 0,2 g/L.

Um estudo nutricional realizado por García-Ochoa *et al*. (2000) mostrou que nitrogênio, fósforo e magnésio influenciaram o crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. campestris ao passo que nitrogênio, fósforo e enxofre influenciaram a produção de xantana. A composição ótima do meio de produção deduzida por García-Ochoa *et al*. (2000) foi a seguinte: sacarose (40,0 g/L), ácido cítrico (2,1 g/L), NH_4NO_3 (1,114 g/L), KH_2PO_4 (2,866 g/L), $MgCl_2$ (0,507 g/L), Na_2SO_4 (0,089 g/L), H_3BO_3 (0,006 g/L), ZnO (0,006 g/L), $FeCl_3.6H_2O$ (0,020 g/L), $CaCO_3$ (0,020 g/L), e HCl concentrado (0,13 mL/L); e o pH foi ajustado para 7,0 acrescentando NaOH.

Em termos de estrutura química, a presença de ácidos acético e pirúvico produzem polissacarídeos do tipo aniônico (SANDFORD & BAIRD, 1983 *apud* GARCÍA-OCHOA *et al*., 2000). Pode-se observar pela Tabela 2.6 a composição média de vários polissacarídeos

produzidos por algumas bactérias do gênero *Xanthomonas* (KENNEDY & BRADSHAW, 1984 *apud* GARCÍA-OCHOA *et al*., 2000).

Tabela 2.6 - Composição percentual média de polissacarídeos produzidos pela bactéria *Xanthomonas* (adaptado de Kennedy & Bradshaw, 1984).

Bactéria	D-glicose	D-manose	D-ácido glucurônico	Piruvato	Acetato
X. campestris	30,1	27,3	14,9	7,1	6,5
X. fragaria 1822	24,6	26,1	14,0	4,9	5,5
X. gummisudans 2182	34,8	30,7	16,5	4,7	10,0
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

Fonte: García-Ochoa et al (2000)

Skaracis *et al*. (2003) investigaram xarope de beterraba como fonte de carbono para produção de goma xantana a partir de *Xanthomonas campestris* ATCC 1395 e obtiveram 53,0 g/L de xantana partindo de 175,0 g/L de xarope. O tempo de processo fermentativo foi 24 h e o meio de produção foi fortificado com K_2HPO_4 atuando como agente tamponante e nutriente para crescimento celular.

López *et al*. (2003) pesquisaram hidrolisados de resíduos ácidos provenientes da agricultura como fonte de carbono na produção de xantana-AHW (*wastes acid hydrolysates*) e avaliaram o percentual de ácido urônico, ácido acético, ácido pirúvico e a razão acetil/piruvato em amostras de xantana padrão e de xantana-AHW produzida. A Tabela 2.7 mostra os percentuais desses componentes nas duas amostras.

Tabela 2.7 - Características químicas das amostras[a] de xantana.

Componentes	Xantana padrão (%)	Xantana-AHW (%)
Ácido urônico	14,16 ± 1,02	10,60 ± 2,06
Ácido acético	4,83 ± 0,80	3,33 ± 0,50
Ácido pirúvico	3,74 ± 0,50	2,81 ± 0,43
Acetil/piruvato	1,29 ± 0,15	1,19 ± 0,21

[a]Valores da média de cinco determinações. Média ± desvio padrão.

Fonte: López *et al*. (2003).

Oliveira *et al*. (2005) utilizando meios à base de soro de leite como substrato para obtenção de xantana obtiveram para os meios A, B e C 12,1, 12,6 e 18,9 g/L deste biopolímero, respectivamente, com as seguintes conversões de substrato a produto: 0,40, 0,41 e 0,63 $g.g^{-1}$. A composição dos meios de produção A, B e C empregada por estes autores foi a seguinte:

Soro de leite A: 2% soro, 0,5% K_2HPO_4,0,01% $MgSO_4$, 0,003% $MnCl_2$;
Soro de leite B: 2% soro, 0,5% K_2HPO_4,0,01% $MgSO_4$, 0,003% $MnCl_2$, 0,2% ácido cítrico; e
Soro de leite C: 2% soro, 0,5% K_2HPO_4,0,01% $MgSO_4$, 0,003% $MnCl_2$, 0,2% ácido cítrico, 0,25% extrato de levedura.

Mediante o exposto, observa-se que muitos são os trabalhos publicados na literatura abordando a produção de goma xantana, investigando desde o seu surgimento, condições ótimas para se alcançar elevadas produtividades, haja vista a sua grande utilização. No entanto, caldo de cana como matéria-prima praticamente não se têm registros na literatura.

2.8.1 – Recuperação e Purificação da Goma Xantana

Ao término do processo fermentativo para a obtenção da xantana, o polímero é recuperado e purificado. Os métodos usados para a recuperação de um biopolímero dependem, sobretudo, das características do microrganismo utilizado, do tipo de polissacarídeo e do grau de pureza desejado (SANDFORD, 1979). O processo de recuperação da xantana tem um importante papel na economia do processo. Cerca de 50% do custo total do processo deve-se às operações de “downstream” (HACKING, 1986).

Um método que pode ser usado para a recuperação da goma xantana consiste em concentrá-la através da evaporação do mosto. Esta técnica é possível e viável economicamente, porém apresenta a desvantagem de resultar em um produto de qualidade inferior, de coloração intensa, contendo células e compostos que não foram metabolizados (SANDFORD, 1979; PACE & RIGHELATO, 1981).

A recuperação do polissacarídeo pode também ser feita através da precipitação, pela adição de um solvente adequado (MARGARITIS & PACE,1985). Smith & Pace (1982) revisaram esquemas de recuperação para polissacarídeos microbianos. A precipitação baseada no caráter polieletrolítico do polissacarídeo tem sido realizada pela 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.

Após a precipitação, a goma é removida através de equipamentos tradicionais como filtros ou centrífugas e posteriormente os sólidos obtidos neste estágio de separação são lavados com solução (etanol/água), para remoção de grande parte das impurezas (sais inorgânicos e pigmentos), sendo, então secos a vácuo ou pela passagem forçada de ar quente ou gás inerte (PACE & RIGHELATO, 1981). As condições de secagem devem ser tais que

evitem a degradação química, coloração excessiva ou mudanças na solubilidade do produto (MARGARITIS & PACE, 1985). A xantana seca é então moída a uma granulometria pré-determinada, dependendo da aplicação do produto.

O produto final moído obtido através da precipitação com solvente não deve conter células de *Xanthomonas campestris*, pois afeta diretamente a performance do produto para uma determinada aplicação, sendo, portanto, a sua remoção essencial (MARGARITIS & PACE, 1985).

A presença de certas enzimas formadas durante a produção da goma pode causar problemas em seu posterior processamento ou imprimir características indesejáveis ao produto final, restringindo, por exemplo, a gama de materiais com os quais é compatível. A presença de atividade celulolítica em gomas xantana comercialmente disponíveis impossibilita sua utilização em mistura com ésteres de celulase, como a carboximetilcelulose. Um método proposto para a inativação da celulase, presente na goma xantana, é o tratamento do precipitado, ainda úmido, com um agente oxidante tal como o óxido de propileno, propiolactona, glutaraldeído ou pivalolactona (PACE & RIGHELATO, 1981; MARGARITIS & PACE, 1985).

2.9 – Reologia

O termo reologia deriva do grego *rhéos*, que significa corrente ou fluxo, e designa a área da ciência dedicada à deformação e ao escoamento dos materiais (TAGER, 1978; COUARRAZE & GROSSIORD, 1983). Navarro (1997) define reologia de uma forma mais completa, considerando-a como ciência relacionada à descrição das propriedades mecânicas dos vários materiais sob inúmeras condições de deformação, quando eles exibem a capacidade de escoar e/ou acumular deformações reversíveis.

As propriedades reológicas de compostos de natureza polimérica dependem do peso molecular e de sua distribuição, da possibilidade de formação de ligações intermoleculares, do comportamento que a macromolécula assume quando em solução, de sua concentração, da temperatura na qual se efetuam as medições e da intensidade da força aplicada sobre o material, entre diversos outros fatores (LOPES, 1989).

Fluidos que escoam segundo o modelo de Newton são chamados de fluidos newtonianos. Nestes casos, a deformação cresce contínua e linearmente, qualquer que seja a tensão aplicada e a resistência ao escoamento é proporcional à taxa de deformação (SEVERS, 1962; CHEREMISINOFF, 1993).

A Figura 2.4 apresenta a classificação dos fluidos com seus reogramas (curvas de escoamento) típicos, bem como suas equações reológicas de estado.

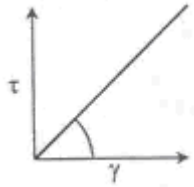
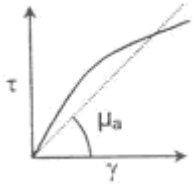
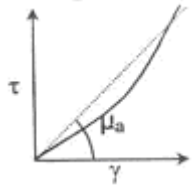
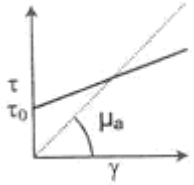
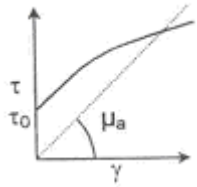
Descrição	**Reograma**	**Equação Constitutiva**	**Viscosidade Absoluta ($\mu_a = \tau\gamma^{-1}$)**
Newtoniano		$\tau = \mu\gamma$	Constante $\mu_a = \mu$
Pseudoplástico (Lei de potência)		$\tau = K\gamma^n$ n < 1	Decresce com o aumento da taxa de cisalhamento $\mu_a = K\gamma^{n-1}$
Dilatante (Lei de potência)		$\tau = K\gamma^n$ n > 1	Aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento $\mu_a = K\gamma^{n-1}$
Plástico Binghamiano		$\tau = \tau_o + K_p\gamma^n$	Decresce com o aumento da taxa de cisalhamento quando a tensão inicial τ_o é excedida $\mu_a = \frac{\tau_n}{\gamma} + K_p$
Plástico Cassoniano		$\tau^{1/2} = \tau_o^{1/2} + K_p\gamma^{1/2}$	Decresce com o aumento da taxa de cisalhamento quando a tensão inicial τ_o é excedida $\mu_a = \left[\left(\frac{\tau_n}{\gamma}\right)^{1/2} + K_p\right]^2$

Figura 2.4 - Classificação dos fluidos de acordo com o seu comportamento reológico
Fonte:(ATKINSON & MAVITUNA, 1991).

Nos fluidos não-newtonianos, a tensão de cisalhamento é uma função não linear da taxa de deformação e depende ainda da temperatura, da pressão, do peso molecular, da morfologia das moléculas e do tempo.

Os fluidos pseudoplásticos podem apresentar, também para velocidades de cisalhamento muito altas ou muito baixas, comportamento newtoniano (platô newtoniano). A extensão da região pseudoplástica depende do polímero e das condições experimentais (LOPES, 1989).

A viscosidade relativa de uma solução polimérica é dada pela Equação 2.2 (MANO, 1985):

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} \tag{2.2}$$

onde η é a viscosidade absoluta da solução do polímero em (Pa.s); η_o a viscosidade absoluta do solvente, em (Pa.s). A η_{rel} é, portanto, admensional.

A viscosidade específica é definida pela Equação 2.3 como sendo a razão da diferença das viscosidades de uma solução e do solvente pela viscosidade do solvente. É adimensional e indica a variação relativa que o soluto provoca na viscosidade do solvente.

$$\eta_{\text{sp}} = \frac{\eta_{\text{solução}} - \eta_{\text{solvente}}}{\eta_{\text{solvente}}} = \eta_{\text{rel.solução}} - 1 \tag{2.3}$$

A viscosidade reduzida é definida como sendo a razão entre a viscosidade específica de uma solução e a sua concentração, expressa em mL/g conforme Equação 2.4.

$$\eta\, red. = \frac{\eta\, sp}{C} \tag{2.4}$$

onde C é a concentração do polímero em solução (g/mL).

A viscosidade intrínseca está relacionada às dimensões moleculares (volume hidrodinâmico) de cadeias poliméricas isoladas (GARGALLO *et al.*, 1987). Esta viscosidade é definida pela Equação 2.5 como o limite da viscosidade reduzida quando a concentração do soluto tende para zero.

$$[\eta] = \lim_{C \to 0} \left(\frac{\eta\, sp}{C} \right) \tag{2.5}$$

A viscosidade intrínseca de uma solução polimérica pode ser determinada através de medidas de η_{sp}/C, a diferentes concentrações, em regime diluído.

Os valores de $[\eta]$ para polissacarídeos são geralmente bastante elevados quando comparados à maioria dos polímeros sintéticos de mesmo peso molecular, como conseqüência da baixa flexibilidade das cadeias de natureza glicídica. Os altos valores de $[\eta]$ encontrados em polissacarídeos têm sido atribuídos à restrição do movimento rotacional em torno da ponte de oxigênio (ou ligação glicosídica) em virtude do impedimento estérico entre unidades monossacarídicas adjacentes. Em geral, além da restrição rotacional em torno das ligações covalentes, a presença de cargas iônicas não neutralizadas na cadeia polimérica resulta no aumento do volume hidrodinâmico, contribuindo para o incremento da viscosidade do polímero em solução (ALVES, 1998).

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo destina-se à apresentação da metodologia analítica empregada, bem como, especifica o microrganismo e a matéria-prima utilizados, cita os planejamentos experimentais adotados, descreve a seqüência para conduzir os ensaios e relaciona os reagentes e equipamentos necessários ao desenvolvimento experimental.

3.1 – Microrganismo

Foi utilizada a bactéria *Xanthomonas campestris pv. campestris* NRRL B-1459, fornecida pela Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello conforme Figura 3.1.

Figura 3.1 - Xanthomonas campestris pv. campestris NRRL B-1459.

3.2 – Meios de Manutenção

As linhagens da bactéria *Xanthomonas campestris pv. campestris* foram mantidas em meio YMA (extrato de levedura, malte e ágar) (NAKAJIMA *et al*., 1990) com a seguinte composição em g/L: glicose 10,0, extrato de levedura 3,0, extrato de malte 3,0, peptona 5,0, ágar 15,0. O pH do meio foi ajustado para 6,0 e a esterilização foi a 110^0 C por 20 min. Os cultivos eram feitos a cada quinze dias e após crescimento a 30 ± 1ºC por 48 horas, a cultura era estocada sob refrigeração.

3.3 – Matéria-Prima

Os experimentos foram conduzidos empregando caldo de cana como fonte de sacarose proveniente de duas variedades de cana-de-açúcar: RB 835486 e SP 791011. Para a realização dos testes preliminares utilizou-se caldo de cana diluído a 40 g/L oriundo de caldo bruto nas seguintes concentrações de sacarose: 166,6 g/L e 179,6 g/L correspondendo nesta ordem às variedades de cana RB 835486 e SP 791011. Em função dos resultados obtidos nos testes preliminares, os ensaios subseqüentes foram efetuados apenas com a variedade SP 791011. O lote desta variedade de cana apresentou uma concentração de sacarose no caldo bruto igual a 270,0 g/L. A cana de variedade SP 791011 foi gentilmente cedida pelo proprietário Sr. Artur Lourenço Borges, cuja fazenda situa-se no Município de Araporã, conforme vista do local na Figura 3.2. A cana foi coletada, moída, e o caldo filtrado foi armazenado em baixa temperatura (-5ºC) durante toda a fase experimental e sob condições assépticas.

Figura 3.2 - Vista do local onde a cana SP 791011 foi coletada.

3.4 – Composição dos Meios de Produção

Na fase preliminar dos ensaios considerou-se cinco situações bastante distintas em termos de suprimento dos meios adotados e de concentração de sacarose com vistas à biossíntese da xantana. O meio de produção mais completo, com dez componentes (Meio B), mostrado na Tabela 3.1, foi extraído de LIMA (1999). As demais composições dos Meios C e D foram investigadas por exclusão de algumas substâncias. Os Meios A e E pesquisados

contemplaram as situações utilizando caldo de cana bruto e diluído a 40,0 g/L em sacarose, respectivamente.

Tabela 3.1 - Componentes dos meios de produção e suas respectivas concentrações em g/L.

Componentes dos meios de produção	**10 componentes Meio B**	**6 componentes Meio C**	**4 componentes Meio D**
caldo de cana diluído	40,0 g em sacarose	40,0 g em sacarose	40,0 g em sacarose
extrato de levedura	3,0 g	3,0 g	3,0 g
ácido cítrico	3,0 g	3,0 g	--
NH_4NO_3	0,86 g	0,86 g	0,86 g
$MgSO_4$. $7H_2O$	0,2 g	--	--
Na_2HPO_4	2,5 g	2,5 g	2,5 g
KH_2PO_4	2,5 g	2,5 g	2,5 g
Na_2SO_4	1,13 g	1,13 g	--
$MnCl_2$	0,03 g	--	--
$Ca(OH)_2$	0,01 g	--	--
$FeSO_4.7H_2O$	0,01 g	--	--
água destilada	1000,0 mL	1000,0 mL	1000,0 mL

O pH do meio foi ajustado para 7,5 e o meio mineral e a solução de sacarose foram esterilizados a 110 ^oC por 15 min para evitar uma possível degradação do substrato.

3.5 – Planejamento Experimental

Após selecionar a variedade de cana mais apropriada e os meios de produção que apresentaram maior viscosidade absoluta para um valor e taxa de deformação fixada em 1 s^{-1}, a etapa posterior sucede a um planejamento experimental a dois níveis com três variáveis especificadas na Tabela 3.2. A Tabela 3.3 mostra os níveis e as variáveis referentes à execução de um segundo planejamento fatorial. Para ambos, as respostas monitoradas durante o processo foram: concentração de sacarose residual (C_{SR}), viscosidade absoluta do mosto fermentado (μ), rendimento relativo à formação de produto ($Y_{P/S}$), concentração de goma (C_G) em g/L e viscosidade absoluta da solução de xantana a 1% ($\mu_{G1\%}$).

Tabela 3.2 - Variáveis estudadas e seus níveis no primeiro planejamento.

Variáveis	**Níveis das variáveis**	
	-1	**+1**
N° de componentes (X_1)	4	6
Concentração de sacarose (g/L) (X_2)	20	40
Tempo (h) (X_3)	24	48

Tabela 3.3 - Variáveis estudadas e seus níveis no segundo planejamento.

Variáveis	**Níveis das variáveis**	
	-1	**+1**
N° de componentes (X_1)	-	4
Concentração de sacarose (g/L) (X_2)	20	40
Tempo (h) (X_3)	24	48

Quanto à natureza das variáveis X_1, X_2 e X_3 no primeiro e segundo planejamento experimental, atribuiu-se a X_1 condição de variável qualitativa e as demais foram definidas como variáveis quantitativas.

O tratamento estatístico dos dados associados aos 1º e 2º planejamentos revela o melhor meio de produção entre os pesquisados e aponta para a necessidade de se investigar valores intermediários de concentração de sacarose e tempos de processo superiores a 48 h. Surge então, o 3º planejamento experimental fatorial a três níveis e duas variáveis (3^2) definidas conforme Tabela 3.4. Tal como nos planejamentos anteriores, as mesmas respostas foram devidamente monitoradas**,** e com base nessa ferramenta estatística foi possível plotar superfícies de respostas.

Tabela 3.4 - Variáveis estudadas e seus níveis no terceiro planejamento.

Variáveis	**Níveis das variáveis**		
	-1	**0**	**+1**
Concentração de sacarose (g/L) (X_1)	20	30	40
Tempo (h) (X_2)	24	48	72

Após executar três planejamentos experimentais em nível de bancada, um aumento de escala tornou-se providencial para verificar a influência de variáveis importantes no processo, como aeração e agitação. A Tabela 3.5 mostra as variáveis e os seus níveis pertinentes ao 4º planejamento fatorial 3^2 em reator, uma vez fixadas a aeração, a agitação e a temperatura em 0,5 vvm, 800 rpm e 28º C respectivamente (LIMA, 1999). O pH foi controlado entre 7,3-7,8.

Tabela 3.5 - Variáveis estudadas e seus níveis no quarto planejamento.

Variáveis	**Níveis das variáveis**		
	-1	0	+1
Concentração de sacarose (g/L) (X_1)	15	25	35
Tempo (h) (X_2)	18	24	30

3.6 – Determinação Quantitativa de Nitrogênio e Fósforo no Caldo de Cana Bruto

A determinação de nitrogênio no caldo de cana bruto foi realizada, em laboratório terceirizado (SENAI-CETAL) e consta no Anexo A, pelo método Kjeldahl. Já a determinação de fósforo (Apêndice B) foi realizada nos laboratórios do Núcleo de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, de acordo com procedimento da NBR 12772 (1992).

3.7 – Produção de Goma Xantana

3.7.1 – Produção de Goma Xantana em Frascos Erlenmeyers Agitados

Os experimentos relativos a testes preliminares e aqueles referentes aos planejamentos 1, 2 e 3 foram conduzidos em erlenmeyers de 500 mL de capacidade útil contendo 50 mL de meio de produção. As fermentações foram realizadas em mesa agitadora a 120 rpm, na temperatura de $28 \pm 1^{o}C$ por 48 horas. Utilizou-se como inóculo, 10% (v/v) de um cultivo crescido sob agitação (120 rpm) em mesa agitadora, a temperatura de $28 \pm 1^{o}C$, por 16 horas. O meio utilizado para preparação do inóculo era constituído em g/L: extrato de levedura 3,0; NH_4NO_3 0,86 ; Na_2HPO_4 2,5; KH_2PO_4 2,5. A concentração celular média do inóculo foi de 0,43 g/L.

3.7.2 – Produção de Goma Xantana em Fermentador

Os ensaios foram realizados em fermentador Biostat-B com 2 L de capacidade, contendo 1800 mL de meio de produção. Na Figura 3.3 observa-se o fermentador usado para conduzir os experimentos. Utilizou-se como inóculo, 10% em volume de um cultivo crescido sob agitação (120 rpm) em mesa agitadora, a temperatura de $28 \pm 1^{o}C$, por 16 horas. O meio de produção era constituído por sacarose (15,0 g/L, 25,0 g/L e 35,0 g/L), extrato de levedura (3,0 g/L), NH_4NO_3 (0,86 g/L), Na_2HPO_4 (2,5 g/L), KH_2PO_4 (2,5 g/L) e antiespumante (marca Sigma antifoam 289). Durante o processo, a agitação e a aeração foram mantidas em 800 rpm e 0,5 vvm (AMANULLAH *et al*. 1998; LIMA,1999), a temperatura foi de $28 \pm 1^{o}C$ e o tempo de 30 horas.

Figura 3.3 - Foto do fermentador Biostat-B utilizado para realizar os ensaios.

Ao longo das fermentações foram feitas observações microscópicas usando preparações coradas pelo método de Gram conforme Figura 3.4 visando investigar a presença de prováveis contaminantes. A Figura 3.4 mostra exclusivamente a presença de bastonetes Gram (-) com morfologia semelhante, não sendo observada outros tipos de células.

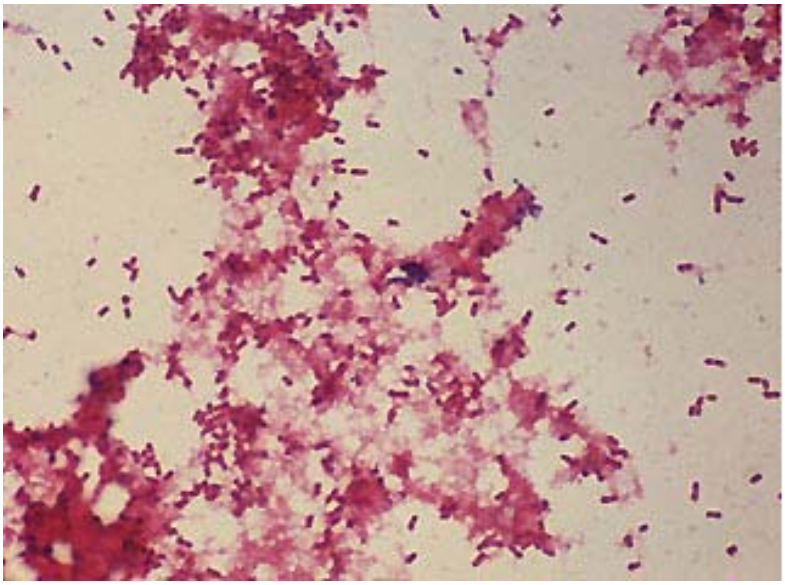


Figura 3.4 - Forma apresentada pela lâmina quando visualizada por meio de observação microscópica.
Fonte: google / imagens / *Xanthomonas maltophilia* (01/07/2005).

A Figura 3.5 representa a seqüência analítica percorrida pelas amostras retiradas do reator na forma de fluxograma.

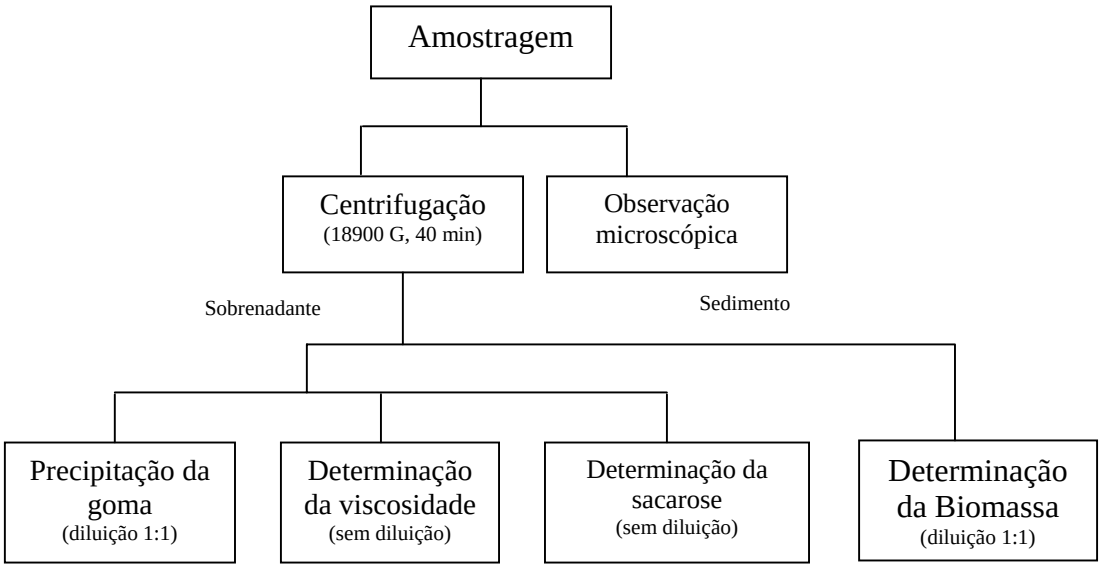


Figura 3.5 - Esquema do procedimento analítico percorrido pelas amostras após retiradas do fermentador.

3.8 – Determinação da Biomassa Através de Massa Seca

O mosto foi diluído 1:1 em solução salina a 0,85% (De VUYST & VERMEIRE, 1994) e as células foram separadas por centrifugação em centrífuga Beckman Coulter Avanti J-25 a 12500 rpm correspondendo a um campo centrífugo relativo de 18900 g por 40 minutos. Em seguida, as células foram lavadas em solução salina 0,85% para completa eliminação dos componentes do meio e dos metabólitos. A quantificação celular foi feita através de massa seca a 90 C ± 1°C, em estufa, até peso constante.

3.9 – Determinação Quantitativa da Sacarose

A sacarose presente no caldo de cana e nas amostras retiradas do processo nos tempos estipulados foi hidrolisada para obter glicose e frutose, cujas determinações foram feitas por método enzimático utilizando o kit glicose-oxidase (GPO-PAP, cepa) (SHU & YANG, 1990). Após a reação enzimática, a intensidade da cor da solução era medida a 500 nm em espectrofotômetro Thermo Spectronic modelo Genesys 10 UV.

3.9.1 – Condições de Hidrólise da Sacarose

Em 1 mL de amostra, acrescentava-se 1 mL de ácido clorídrico 2 N. Aquecia-se entre 65°C e 70°C por 10 minutos, resfriava-se em água corrente e adicionava-se 3 mL de solução de hidróxido de sódio 1 N. A amostra preparada, quando necessário era diluída, para que a concentração de glicose obtida situasse na faixa de linearidade da reação pelo método enzimático. O cálculo da concentração de sacarose em g/L foi efetuado utilizando a Equação 3.1.

$C_{sac.}$ = fator de calibração x média da leitura (absorbância) x D x (1/100) x 1,9 (3.1)

3.10 – Recuperação e Purificação da Goma

O mosto fermentado diluído em água na razão de 1:1, foi processado em centrífuga Beckman Coulter Avanti J-25, para retirada das células, a 12500 rpm correspondendo a um campo centrífugo relativo de 18900 g por 40 minutos. O sobrenadante foi filtrado a vácuo e tratado com solução de KCl e o polímero recuperado por precipitação com etanol conforme Figura 3.6. Para 10 mL do mosto diluído centrifugado, adicionam-se 3 mL de solução saturada de KCl e 20 mL de etanol absoluto, obtendo dessa forma, sob agitação, a goma (RAMIREZ & FUCIKOVSKY, 1988). Alves (1991) sugere e assim procedeu-se à lavagem do precipitado com soluções de etanol em concentrações crescentes iguais a 70%, 80%, 90% e etanol absoluto, o qual permaneceu em contato por cerca de 10 minutos. A secagem do produto foi realizada em placas de Petri recobertas com filme plástico perfurado e mantido em estufa à temperatura de 30°C.

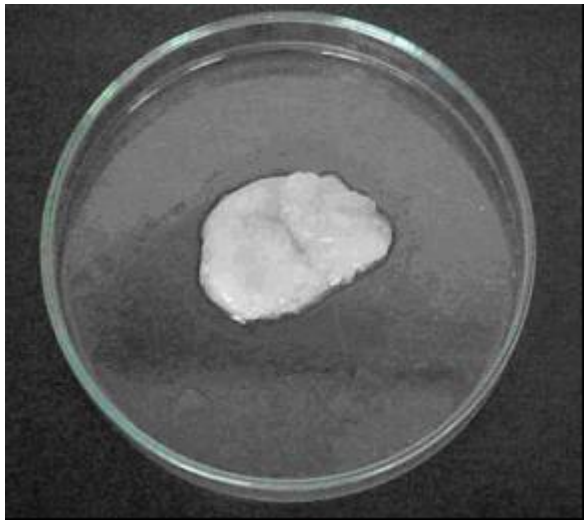


Figura 3.6 - Formato apresentado pela goma momentos após sua precipitação.

3.11 – Avaliação do Comportamento Reológico

A reologia do mosto fermentado e da solução polimérica a 1% foi determinada com o auxílio do reômetro Brookfield RVDVIII. Para tal, foram utilizados os dados de tensão cisalhante, medidos a partir de taxas de deformação, seguindo o modelo de Ostwald de Waele ou *power-law* (CHHABRA & RICHARDSON, 1999).

Com os valores de τ e γ avaliados estatisticamente por uma estimativa não linear obtém-se K (índice de consistência) e n (índice de comportamento) para os meios fermentados e para as soluções de xantana na concentração de 1%. Assim, a viscosidade absoluta para um fluido "*power-law*" foi determinada a partir da Equação 3.2.

$$\mu_a = \frac{\tau}{\gamma} = K\left(\gamma\right)^{n-1} \tag{3.2}$$

3.11.1 – Preparo das Amostras do Mosto Fermentado para Análise Reológica

As amostras do mosto fermentado foram submetidas à centrifugação em centrífuga Beckman Coulter Avanti J-25 a 12500 rpm (18900 g) por 40 minutos. O sobrenadante foi aquecido a 80 ^{o}C por 30 minutos e a viscosidade foi determinada em reômetro Brookfield RVDVIII. As leituras foram realizadas a 25 ^{o}C, em velocidades de cisalhamento variando de 0,38 a 120,0 s^{-1} (LIMA, 1999).

3.11.2 – Preparo da Solução 1% de Goma Xantana para Análise Reológica

Após secagem em estufa a 30 ^{o}C, a goma foi acondicionada sob vácuo em dessecador para posterior preparo da sua solução 1% (m/v). Triturada na forma de pó, a goma possui aspecto semelhante ao amido de milho. O procedimento para hidratação da solução 1% ocorreu sob agitação magnética durante um período de aproximadamente 10 horas segundo López *et al* (2003).

3.12 – Espectroscopia na Região do Infravermelho das Gomas Produzidas

A espectrofotometria é o processo instrumental de medição baseado nas propriedades de absorção e emissão de energia eletromagnética em alguma região do espectro eletromagnético. Algumas das vantagens dessa técnica são: a facilidade de preparação das amostras e a possibilidade do uso em filmes sólidos em amostras líquidas e gasosas.

Esta análise tem sido amplamente empregada para identificação de biopolímeros e foi realizada com as amostras purificadas das gomas produzidas e da goma comercial, através de pastilhas de KBr, em Espectrômetro marca Perkin Elmer, Spectrum 1000, FT-IR Spectrometer. A espectroscopia de infravermelho fornece informações importantes a respeito da caracterização da estrutura molecular e dos grupamentos funcionais existentes. A heterogeneidade da composição em monossacarídeos da xantana e a formação de interações intermoleculares que normalmente ocorrem no metabolismo tornam esta técnica complexa (BOTELHO, 1999). Uma vez determinados os espectrogramas das gomas pesquisadas e da xantana comercial, a comparação dos vários picos, e a consulta em tabelas constitui boa prova de identificação das estruturas moleculares do composto.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 – Caldo de Cana

O caldo bruto da cana pertencente à variedade SP 791011 apresentou 270 ± 20 ppm de nitrogênio total e 103,2 ± 5,0 ppm de fósforo total. A concentração de sacarose obtida para esta variedade foi de 270,0 ± 5 g/L e o lote do caldo correspondente, foi armazenado em quantidade adequada para executar todos os ensaios pertinentes aos quatro planejamentos experimentais adotado nesse trabalho.

4.2 – Análise dos Testes Preliminares

Analisando os resultados obtidos para os testes preliminares apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2, verificou-se que em todos os meios, os valores de índice de consistência (K) e índice de comportamento (n) mostraram que as duas variedades de cana de açúcar apresentaram-se próprias para serem utilizadas como matéria prima para produção de goma xantana. As várias determinações realizadas indicaram a variedade SP 791011 como a mais adequada, proporcionando maior formação de goma e maior aproveitamento do substrato.

Tabela 4.1 - Resultados obtidos das fermentações usando caldo de cana da variedade de cana de açúcar RB 835486, em diferentes meios de produção.

Variáveis experimentais	Meio A	Meio B	Meio C	Meio D	Meio E
sacarose residual (g/L)	142,7	14,3	13,6	26,7	35,0
sacarose consumida (g/L)	23,9	25,7	26,4	13,3	5,0
% utilizada de substrato	12,48 ± 2,00	64,26 ± 2,50	65,90 ± 4,00	33,35 ± 3,00	12,52 ± 0,50
pH final	4,92 ± 0,02	6,55 ± 0,05	6,47 ± 0,02	6,59 ± 0,04	4,71 ± 0,01
μ_{MF} [cP] a $1s^{-1}$	2960,5	2222,0	2230,3	2686,4	885,0
K ($Kg.m^{-1}.s^{n-2}$)	2,960	2,222	2,230	2,686	0,885
n	0,309	0,380	0,365	0,288	0,342
R^2	0,998	0,998	0,998	0,997	0,998

μ_{MF} – viscosidade absoluta do meio fermentativo para a taxa de cisalhamento de 1 s^{-1}; K – índice de consistência; n – índice de comportamento; R^2 – coeficiente de correlação; Substrato inicial – 40,0 g/L, exceto meio A – 166,6 g/L); pH inicial – 7,5; concentração celular média do inóculo – 0,43 g/L; tempo de fermentação – 48 h.

Tabela 4.2 - Resultados obtidos das fermentações usando caldo de cana da variedade de cana de açúcar SP 791011, em diferentes meios de produção.

Variáveis experimentais	Meio A	Meio B	Meio C	Meio D	Meio E
sacarose residual (g/L)	144,8	10,6	11,5	14,0	31,9
sacarose consumida (g/L)	34,9	29,4	28,5	26,0	8,1
% utilizada de substrato	19,41 ± 2,0	73,43 ± 1,0	71,30 ± 3,5	64,99 ± 2,0	20,30 ± 1,5
pH final	5,61 ± 0,02	7,44 ± 0,01	7,39 ± 0,01	6,19 ± 0,02	5,22 ± 0,04
μ_{MF} [cP] a $1s^{-1}$	3435,8	3152,9	4491,7	5675,5	1290,3
K ($Kg.m^{-1}.s^{n-2}$)	3,436	3,153	4,492	5,675	1,290
n	0,309	0,361	0,319	0,244	0,288
R^2	0,998	0,998	0,999	0,999	0,996

μ_{MF} – viscosidade absoluta do meio fermentativo para a taxa de cisalhamento de 1 s^{-1}; K – índice de consistência; n – índice de comportamento; R^2 – coeficiente de correlação; Substrato inicial – 40,0 g/L, exceto meio A – 179,7 g/L); pH inicial – 7,5; concentração celular média do inóculo – 0,43 g/L; tempo de fermentação – 48 h.

Na seqüência, através da Tabela 4.2 os Meios C e D (6 e 4 componentes respectivamente) foram selecionados para a realização do planejamento experimental por apresentarem menor número de componentes, possuírem maiores valores de K e menores de n e, sobretudo, maior percentual de utilização de substrato.

Com respeito aos valores dos pHs finais encontrados nas Tabelas 4.1 e 4.2, observou-se um abaixamento considerável explicado em decorrência destes não terem sido controlados ao longo do processo e provavelmente devido à presença de ácidos orgânicos e radicais ácidos na estrutura da goma produzida. Segundo Esgalhado *et al*. (1995), o pH ideal para o crescimento de *Xanthomonas campestris pv. campestris* situa-se entre 6,0-7,5, enquanto que, para a produção da goma, estes valores ficam entre 7,0-8,0.

As Figuras 4.1 e 4.2 mostram os gráficos da viscosidade absoluta do mosto fermentado em função da taxa de deformação das várias situações pesquisadas. Observa-se que nos processos conduzidos com caldo de cana *in natura* as viscosidades dos mostos foram menores que aquelas obtidas usando caldo fortificado, mostrando que uma melhor polimerização de glicose requer a presença de alguns nutrientes, tais como, sulfato, vitaminas, fosfatos e nitrogênio. Nos meios fortificados com fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico, extrato de levedura e nitrato de amônio, maiores viscosidades foram obtidas, provavelmente, devido às necessidades dos microrganismos por essas fontes de nutrientes.

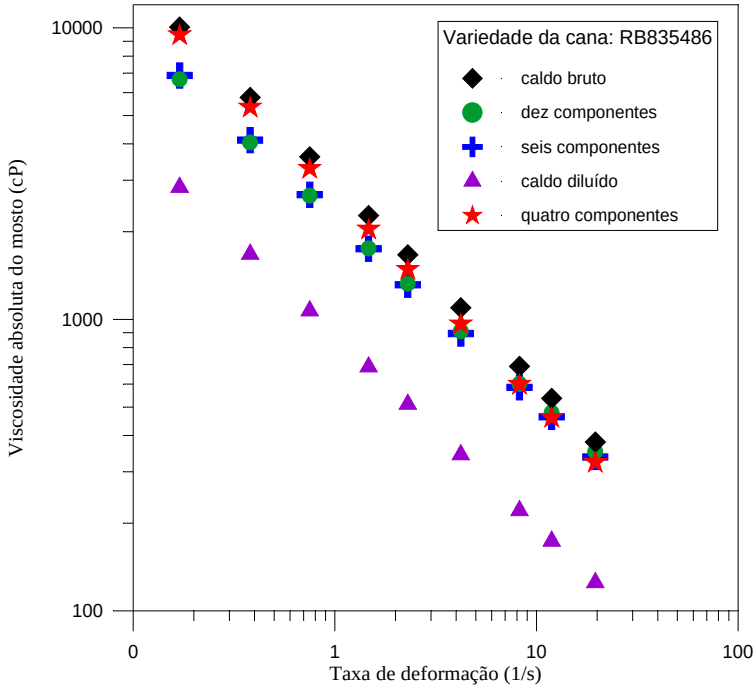


Figura 4.1 - Viscosidade absoluta do mosto fermentado em função da taxa de deformação para diferentes meios de produção quando se utilizou caldo de cana proveniente da variedade RB 835486.

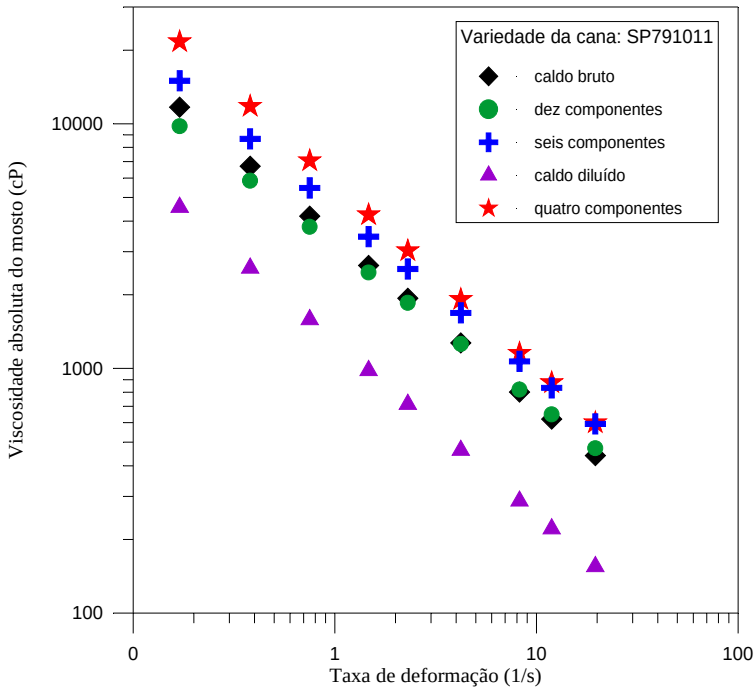


Figura 4.2 - Viscosidade absoluta do mosto fermentado em função da taxa de deformação para diferentes meios de produção quando se utilizou caldo de cana proveniente da variedade SP 791011.

4.3 – Análise do Primeiro Planejamento Experimental 2^3

Posteriormente, procedeu-se à interpretação dos resultados do 1º planejamento fatorial apresentado na Tabela 4.3. O maior fator de conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$, a maior concentração de goma produzida (C_G) e a maior viscosidade absoluta da solução polimérica a 1% ($\mu_{G1\%}$) foram, respectivamente, 0,43 $g.g^{-1}$, 8,35 g/L e 11663,3 cP quando a concentração de sacarose, o tempo de fermentação e a composição do meio assumiram nesta ordem valores de 20 g/L, 48 h e 4 componentes (experimento 7).

Torrestiana *et al.* (1990), usando um meio com 24 g/L de sacarose e trabalhando com a mesma linhagem, obtiveram uma concentração de xantana de 7,8 g/L. O resultado sensivelmente mais alto encontrado no 1º planejamento, pode estar relacionado com as diferenças na forma de conduzir o experimento e em razão da matéria-prima utilizada.

Comparando os pares experimentais 1 e 5; 2 e 6; 3 e7 e 4 e 8, verifica-se que para as mesmas condições de concentração de sacarose e de tempo de processo, os experimentos conduzidos em meio fermentativo suplementado com 4 componentes apresentaram maiores conversões de substrato em produto $Y_{P/S}$, maiores concentrações de gomas produzidas e maiores viscosidades absolutas da solução de xantana a 1%.

Tabela 4.3 - Valores obtidos para as respostas relativas ao 1º planejamento experimental 2^3.

Nº exp.	Número de componentes no meio (X_1)	Concentração de sacarose (g/L) (X_2)	Tempo (h) (X_3)	sacarose residual (g/L)	Viscosidade do meio à 0,75 s^{-1} (cP)	$Y_{P/S}$ ($g.g^{-1}$)	Concentração de goma (g/L)	Viscosidade da goma à 0,75 s^{-1} (cP)
1	6	40	48	16,908	1730,1	0,25	5,760	1207,8
2	6	40	24	25,870	111,7	0,18	2,575	1463,2
3	6	20	48	0,579	1145,0	0,31	6,170	2931,4
4	6	20	24	9,631	196,2	0,19	1,970	5345,5
5	4	40	48	16,907	12869,3	0,32	7,480	4355,5
6	4	40	24	26,134	2641,1	0,30	4,205	7583,9
7	4	20	48	0,632	5821,0	0,43	8,350	11663,3
8	4	20	24	11,675	163,5	0,24	2,030	8036,0

Concentração inicial do inóculo – 0,43 g/L.
Foi adotado o nível +1 para a variável de maior concentração e tempo, e –1 para a variável de menor concentração e tempo.

Neste 1º planejamento fatorial para a análise de todas as respostas, os parâmetros com nível de significância maior que 10 %, em um teste de hipótese utilizando t de Student, foram considerados não relevantes. As Tabelas 4.4 a 4.8 mostram os valores dos níveis de significância menores que 10% para as variáveis e suas interações e o coeficiente de regressão para a variável qualitativa X_1, para as variáveis quantitativas X_2 e X_3, e para as interações, para as seguintes repostas: concentração de sacarose residual, viscosidade absoluta do meio

fermentado, conversão de substrato a produto, concentração de goma e viscosidade da solução 1% da goma. Conforme análise estatística as interações X_1X_2 e X_1X_3 não foram significativas para todas as respostas estudadas.

As Figuras 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 e 4.7 mostram os diagramas de Pareto para a concentração de sacarose residual, viscosidade absoluta do meio fermentado, conversão de substrato a produto, concentração de goma e viscosidade da solução 1% da goma, respectivamente. Os diagramas de Pareto representados nas Figuras 4.4, 4.5, 4.6 e 4.7 revelam o sentido negativo da variável qualitativa X_1, indicando que ao passar do número de componentes no meio igual a 6 (X_1 = +1) para o número de componentes igual a 4 (X_1 = -1), ocorreu um aumento nas respostas viscosidade do meio fermentado, $Y_{P/S}$, concentração de goma e viscosidade da goma a 1%. Comparando os ensaios de 1 a 4 com os ensaios de 5 a 8 nota-se que os melhores resultados obtidos foram para as situações nas quais o meio de produção foi suplementado com quatro componentes. Assim, esse meio de produção foi o selecionado para o próximo planejamento.

Os valores para os coeficientes de correlação (R^2) apresentados nas Tabelas 4.4 a 4.8 indicam a variabilidade dos dados expressos em bases percentuais.

As Equações de 4.1 a 4.5 provêm de modelos empíricos e foram geradas através de múltipla regressão.

Como a variável X_1 é uma variável qualitativa e a Equação do modelo empírico deve ser em função das variáveis quantitativas, fez-se necessário a correção das equações substituindo a variável X_1 pelo valor –1 de forma a maximizar as respostas estudadas, pois a análise estatística apresentou coeficiente de regressão negativo para essa variável.

Observa-se pelas Tabelas 4.5 a 4.8 que X_1 influenciou a viscosidade do mosto fermentado, o rendimento $Y_{P/S}$, a concentração de goma e a viscosidade absoluta da solução polimérica a 1%. Conseqüentemente, a variável X_1 foi substituída por –1 nas Equações 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5 ajustadas.

As variáveis quantitativas X_2 (concentração de sacarose) e X_3 (tempo) contribuíram, em quaisquer das equações que apareceram exercendo significância, nos seus níveis –1 (20,0 g/L) e +1 (48 h) para a maximização de μ_{MF}, $Y_{P/S}$, C_G e $\mu_{G1\%}$ e para a minimização da concentração de sacarose residual C_{SR}. Isto indica que neste planejamento as melhores respostas foram obtidas no sentido de menores concentrações de sacarose e maiores tempos de fermentação dentro do intervalo estudado para estas variáveis.

Tabela 4.4 - Regressão múltipla para a C_{SR} quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(5)	p
.	13,542	0,254	53,328	0,00000004
X2 (Cs)	7,913	0,254	31,160	0,00000064
X3 (t)	-4,786	0,254	-18,845	0,00000775
R^2 = 0,996				

$$C_{SR} = 13{,}542 + 7{,}913\ X_2 - 4{,}786\ X_3 \qquad (4.1)$$

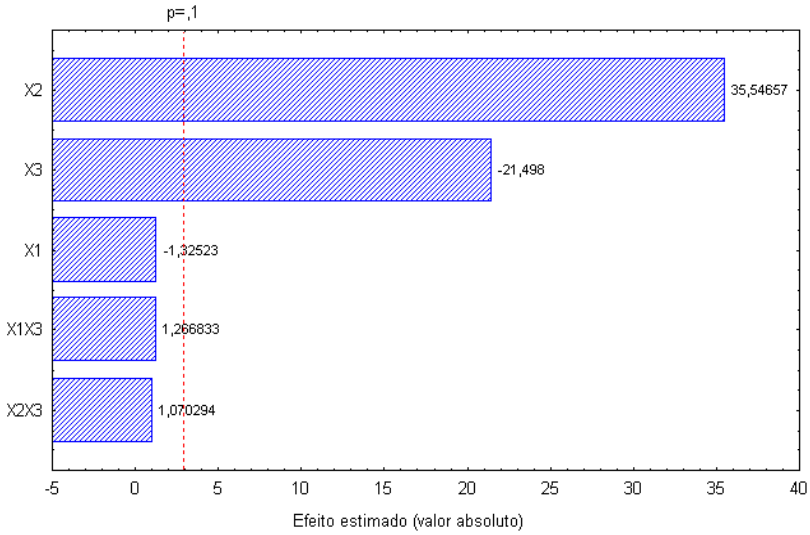


Figura 4.3 - Diagrama de Pareto para a concentração de sacarose residual quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6.

Tabela 4.5 - Regressão múltipla para a μ_{MF} quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(5)	p
	3084,738	1120,893	2,752	0,040213
X1 (N°c)	-2288,988	1120,893	-2,042	0,096609
X3 (t)	2306,613	1120,893	2,058	0,094694
R^2 = 0,627				

$$\mu_{MF} = 5373{,}726 + 2306{,}613\ X_3 \qquad (4.2)$$

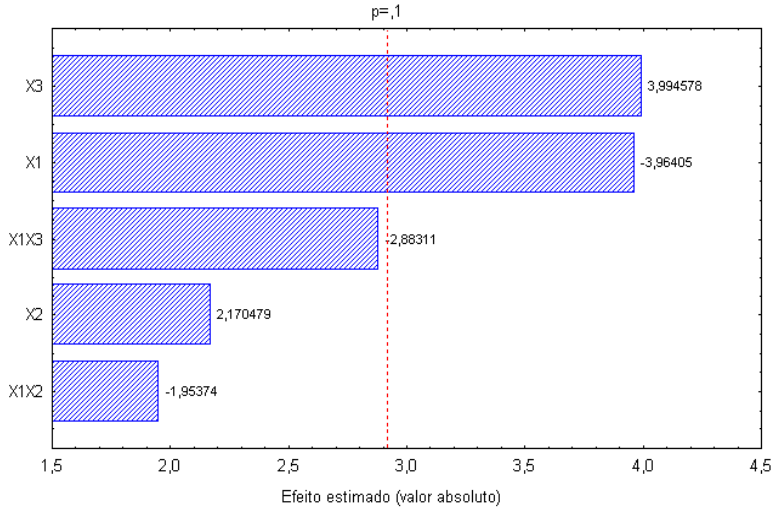


Figura 4.4 - Diagrama de Pareto para a viscosidade do meio fermentado quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6.

Tabela 4.6 - Regressão múltipla para $Y_{P/S}$ quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(4)	p
	0,278	0,0108	25,807	0,000013
X1 (N^oc)	-0,045	0,0108	-4,185	0,013863
X3 (t)	0,050	0,0108	4,650	0,009662
X2X3 (Cs/t)	-0,028	0,0108	-2,557	0,062808
$R^2 = 0,919$				

$$Y_{P/S} = 0,323 + 0,050\ X_3 - 0,028\ X_2X_3 \qquad (4.3)$$

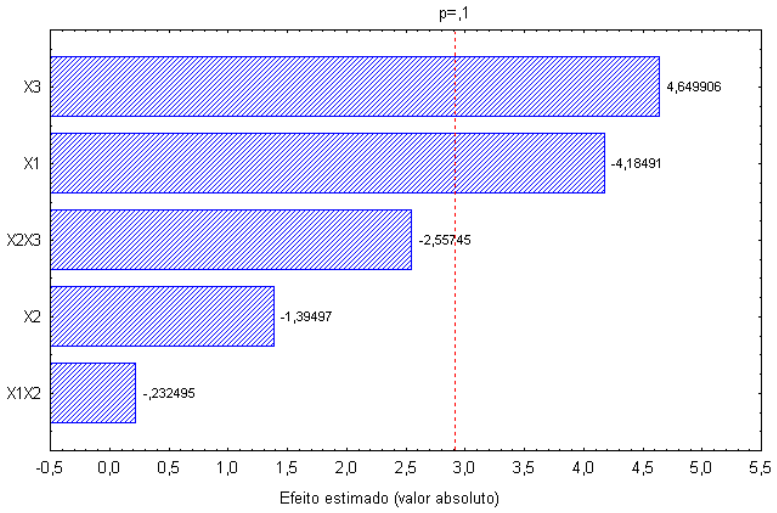


Figura 4.5 - Diagrama de Pareto para a conversão de substrato a produto quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6.

Tabela 4.7 - Regressão múltipla para C_G quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(4)	p
	4,818	0,221	21,813	0,000026
X1 (N°c)	-0,699	0,221	-3,164	0,034059
X3 (t)	2,123	0,221	9,610	0,000655
X2X3 (Cs/t)	-0,508	0,221	-2,298	0,083134
$R^2 = 0,964$				

$$C_G = 5,517 + 2,123\ X_3 - 0,508\ X_2X_3 \quad (4.4)$$

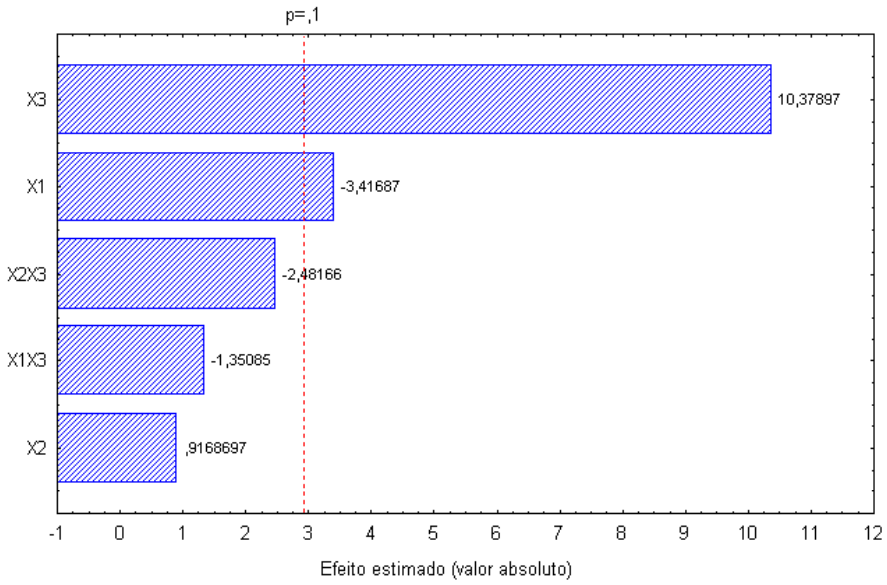


Figura 4.6 - Diagrama de Pareto para a concentração da goma quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6.

Tabela 4.8 - Regressão múltipla para $\mu_{G1\%}$ quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(5)	p
	5323,325	618,798	8,602	0,000350
X1 (N°c)	-2586,350	618,798	-4,179	0,008658
X2 (Cs)	-1670,725	618,798	-2,700	0,042787
$R^2 = 0,832$				

$$\mu_{G1\%} = 7909,675 - 1670,725\ X_2 \quad (4.5)$$

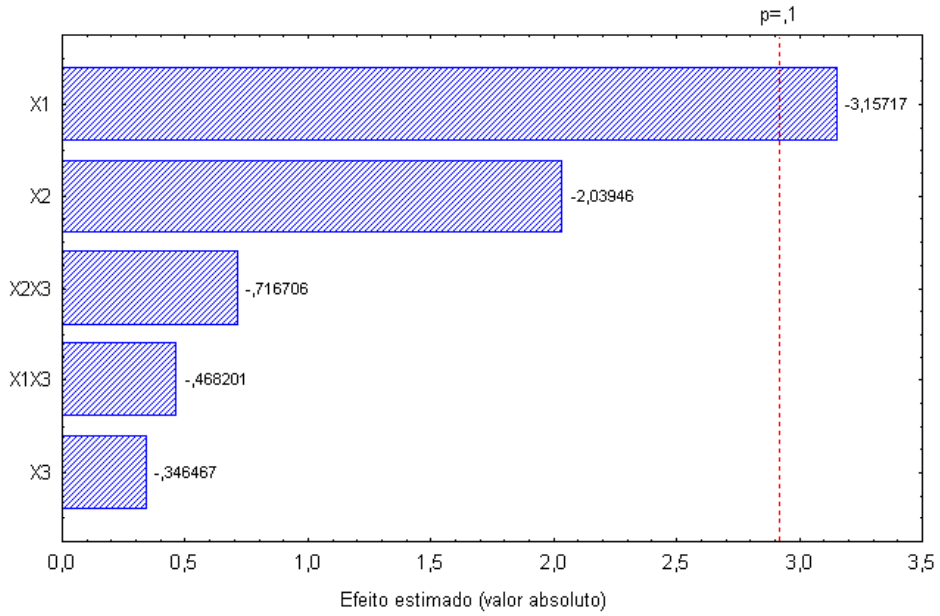


Figura 4.7 - Diagrama de Pareto para a viscosidade da solução 1% da goma quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 6.

4.4 – Análise do Segundo Planejamento Experimental 2^3

O 2º planejamento consistiu na realização de ensaios mantendo constantes as variáveis quantitativas, concentração de sacarose (20,0 e 40,0 g/L) e tempo de processo (24 e 48 h), em relação ao 1º planejamento. Dessa forma, a diferença básica entre o 1º e 2º projeto experimental fatorial foi a composição dos meios de produção. Este planejamento compõe-se também de uma variável qualitativa X_1 relacionada ao número de componentes adicionados ao meio fermentativo. Nesse caso, os meios de produção foram suplementados com quatro componentes (nível +1) e sem adição de componentes (nível -1), isto é caldo de cana, diluído com água destilada.

A Tabela 4.9 mostra os valores encontrados para as respostas analisadas ao longo da execução dos experimentos.

Os parâmetros com nível de significância maior que 10 %, em um teste de hipótese utilizando t de Student, foram considerados não relevantes. As Tabelas 4.10 a 4.14 mostram os valores dos níveis de significância menores que 10% para as variáveis e suas interações e o coeficiente de regressão para a variável qualitativa X_1, para as variáveis quantitativas X_2 e X_3, e para as interações. Conforme análise estatística a interação X_2X_3 não foi significativa para as respostas C_{SR}, μ_{MF}, C_G e $\mu_{G1\%}$.

Tabela 4.9 - Valores obtidos para as respostas relativas ao 2º planejamento experimental 2^3.

Nº exp.	Número de componentes no meio (X_1)	Concentração de sacarose (g/L) (X_2)	Tempo (h) (X_3)	sacarose residual (g/L)	Viscosidade do meio a 0,75 s^{-1} (cP)	$Y_{P/S}$ ($g.g^{-1}$)	Concentração de goma (g/L)	Viscosidade da goma a 0,75 s^{-1} (cP)
1	4	40	48	16,907	12869,3	0,32	7,480	4355,5
2	4	40	24	26,134	2641,1	0,30	4,205	7583,9
3	4	20	48	0,632	5821,0	0,43	8,350	11663,3
4	4	20	24	11,675	163,5	0,24	2,030	8036,0
5	0	40	48	28,252	1582,0	0,27	3,005	2050,0
6	0	40	24	31,092	681,9	0,36	3,120	1406,0
7	0	20	48	11,978	484,7	0,30	2,445	3100,0
8	0	20	24	15,381	422,7	0,37	1,440	3564,0

Concentração inicial do inóculo – 0,43 g/L.
Foi adotado o nível +1 para a variável de maior concentração e tempo, e –1 para a variável de menor concentração e tempo.

As Figuras 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 e 4.12 mostram os diagramas de Pareto para a concentração de sacarose residual, viscosidade absoluta do meio fermentado, conversão de substrato a produto, concentração de goma e viscosidade da solução a 1% de goma, respectivamente. Os diagramas de Pareto representados nas Figuras 4.8, 4.9, 4.11 e 4.12 revelam o sentido positivo da variável qualitativa X_1, indicando que ao passar de um meio sem suplementação (X_1 = -1) para um meio em que se adicionou quatro componentes (X_1 = +1), ocorreu um aumento nas respostas: viscosidade do meio fermentado, concentração de goma, viscosidade da solução de goma a 1% e uma redução na concentração de sacarose residual. Comparando os ensaios de 1 a 4 com os ensaios de 5 a 8 nota-se que os melhores resultados obtidos foram para as situações onde o meio de produção era suplementado com quatro componentes, principalmente com relação à resposta viscosidade da goma xantana em solução a 1%. Assim, selecionou-se para as próximas etapas do estudo, o meio de produção suplementado com 4 componentes.

Os valores para os coeficientes de correlação (R^2) apresentados nas Tabelas 4.10 a 4.14 indicam a porcentagem da variabilidade dos dados experimentais que estão descritos no modelo ajustado.

As Equações de 4.6 a 4.10 provêm de modelos empíricos e foram geradas através de múltipla regressão.

Como a variável X_1 é uma variável qualitativa e a Equação do modelo empírico deve ser em função das variáveis quantitativas, fez-se necessário a correção das equações substituindo a variável X_1 pelo valor +1 de forma a maximizar as respostas estudadas, com exceção da sacarose residual cujo interesse era minimizar.

Observa-se pelas Tabelas 4.10, 4.11, 4.13 e 4.14 que X_1 influenciou a concentração de sacarose residual, a viscosidade do mosto fermentado, a concentração de goma e a

viscosidade absoluta da solução polimérica a 1%. Conseqüentemente, a variável X_1 foi substituída por +1 nas Equações 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10 ajustadas.

As variáveis quantitativas X_2 (concentração de sacarose) e X_3 (tempo) em quaisquer das equações que apareceram**,** exercendo significância contribuíram nos seus níveis –1 (20,0 g/L) e +1 (48 h) para a maximização de μ_{MF}, $Y_{P/S}$, C_G e $\mu_{G1\%}$ e para a minimização da concentração de sacarose residual C_{SR}. Estes resultados indicam que neste planejamento experimental as melhores respostas foram obtidas no sentido de menores concentrações de sacarose e maiores tempos de fermentação dentro do intervalo estudado para estas variáveis. Resultados semelhantes foram obtidos no planejamento experimental anterior, e estas tendências apontam para a necessidade de estudar a faixa que compreendesse o intervalo entre 20 e 40 g/L na concentração de sacarose e ampliar o de tempo de fermentação, objetivando a otimização das respostas. Assim, o planejamento adotado na próxima etapa deste estudo utilizou-se as concentrações de sacarose iguais a 20, 30 e 40 g/L e os tempos de processo de 24, 48 e 72 horas.

Comparando os experimentos 5 a 8 da Tabela 4.9 com os ensaios 1 a 4 da Tabela 4.3, verifica-se que para os experimentos em que se empregou a mesma concentração de sacarose e o mesmo tempo de fermentação, os resultados de $\mu_{G1\%}$ e de $Y_{P/S}$ foram maiores ou próximos para os ensaios em que se utilizou caldo de cana diluído, sem suplementação de sais minerais e vitaminas. Estes resultados mostram que a adição de ácido cítrico e sulfato de sódio não favoreceram os resultados para as duas respostas analisadas.

Vale ressaltar que as concentrações de sacarose residual nos experimentos em que se utilizou caldo de cana diluído em relação aos suplementados com seis e quatro componentes foram superiores.

Tabela 4.10 - Regressão múltipla para a C_{SR} quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(3)	p
	17,756	0,214	82,965	0,0000039
X1 (Nc)	-3,919	0,214	-18,313	0,0003553
X2 (Cs)	7,840	0,214	36,631	0,0000447
X3 (t)	-3,314	0,214	-15,485	0,0005851
X1X3 (N^oc /t)	-1,753	0,214	-8,192	0,0038054
R^2 = 0,998				

$$C_{SR} = 13,837 + 7,840\ X_2 - 5,067\ X_3 \qquad (4.6)$$

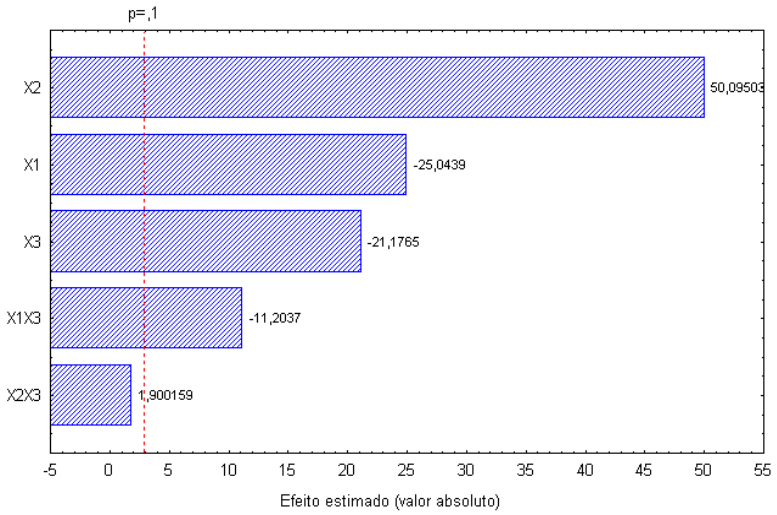


Figura 4.8 - Diagrama de Pareto para a concentração de sacarose residual quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0.

Tabela 4.11 - Regressão múltipla para a μ_{MF} quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(3)	p
	3083,275	756,659	4,075	0,02668
X1 (N^{o}c)	2290,450	756,659	3,027	0,05644
X3 (t)	2105,975	756,659	2,783	0,06880
X1X3 (N^{o}c /t)	1865,450	756,659	2,465	0,09043
R^2 = 0,897				

$$\mu_{MF} = 5373,725 + 3971,425\ X_3 \qquad (4.7)$$

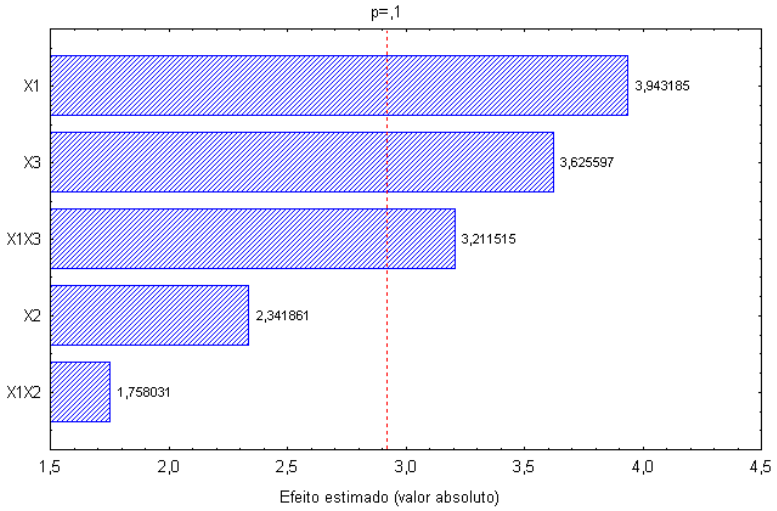


Figura 4.9 - Diagrama de Pareto para a viscosidade do meio fermentado quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0.

Tabela 4.12 - Regressão múltipla para $Y_{P/S}$ quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(5)	p
	0,324	0,0102	31,736	0,0000006
X1X3 (N^{o}c/t)	0,046	0,0102	4,534	0,0062037
X2X3 (Cs/t)	-0,024	0,0102	-2,328	0,0673638
R^2 = 0,838				

$$Y_{P/S} = 0,324 + 0,046\ X_3 - 0,024\ X_2X_3 \quad (4.8)$$

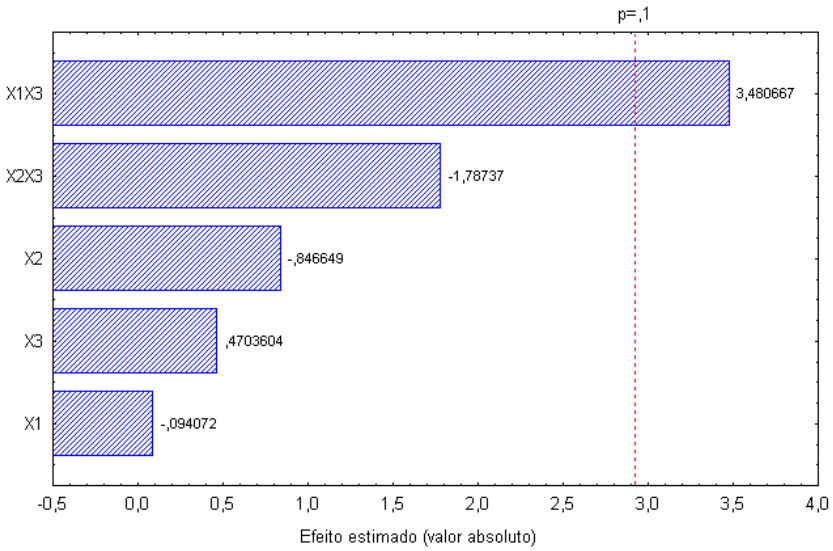


Figura 4.10 - Diagrama de Pareto para a conversão de substrato a produto quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0.

Tabela 4.13 - Regressão múltipla para C_G quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(4)	p
	4,009	0,367	10,922	0,00040
X1 (N^{o}c)	1,507	0,367	4,105	0,01479
X3 (t)	1,311	0,367	3,570	0,02337
X1X3 (N^{o}c /t)	1,088	0,367	2,964	0,04138
R^2 = 0,906				

$$C_G = 5,516 + 2,399\ X_3 \quad (4.9)$$

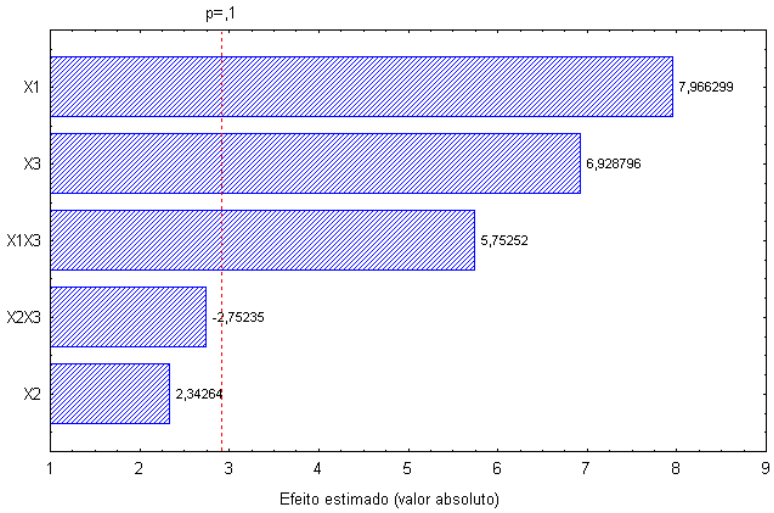


Figura 4.11 - Diagrama de Pareto para a concentração da goma quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0.

Tabela 4.14 - Regressão múltipla para $\mu_{G1\%}$ quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(5)	p
	5219,838	606,113	8,612	0,00035
X1 (N^oc)	2689,838	606,113	4,438	0,00678
X2 (Cs)	-1370,988	606,113	-2,262	0,07317
R^2 = 0,832				

$$\mu_{G1\%} = 7909{,}676 - 1370{,}988\ X_2 \qquad (4.10)$$

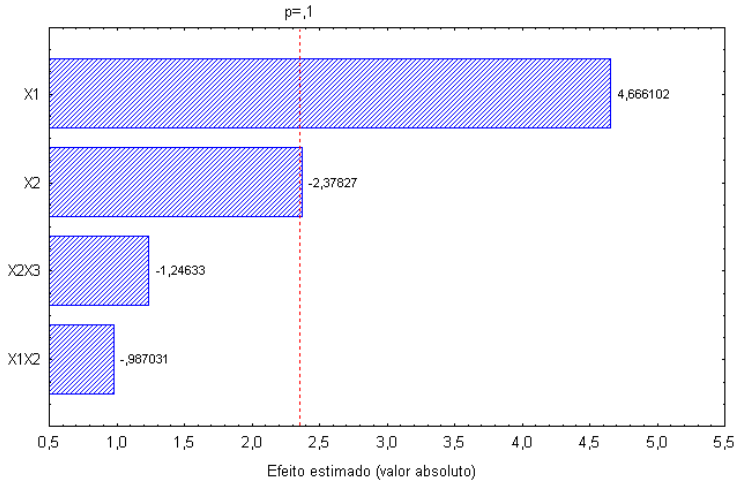


Figura 4.12 - Diagrama de Pareto para a viscosidade da solução 1% da goma quando o número de componentes no meio de produção é igual a 4 e 0.

4.5 – Análise do Terceiro Planejamento Experimental 3^2

Com base nos resultados relativos aos 1º e 2º planejamentos, o meio de produção que apresentou melhores respostas na produção de goma xantana foi caldo de cana suplementado com quatro componentes, sendo eles em g/L: extrato de levedura 3,0; NH_4NO_3 0,86; Na_2HPO_4 2,5 e KH_2PO_4 2,5. Os ensaios subseqüentes relacionados aos 3º e 4º planejamento foram efetuados fixando o meio de produção descrito anteriormente.

A Tabela 4.15 refere-se aos resultados avaliados quando a concentração de sacarose empregada foi em g/L, 20,0; 30,0 e 40,0 e o tempo de processo foi 24, 48 e 72 h.

Tabela 4.15 - Valores obtidos para as respostas relativas ao 3º planejamento experimental 3^2.

Nº exp.	Concentração de sacarose (g/L) (X_1)	Tempo (h) (X_2)	sacarose residual (g/L)	Viscosidade do meio a 0,75 s^{-1} (cP)	$Y_{P/S}$ ($g.g^{-1}$)	Concentração de goma (g/L)	Viscosidade da goma a 0,75 s^{-1} (cP)
1	20	24	11,675	163,5	0,244	2,030	8036,0
2	20	48	0,632	5821,0	0,431	8,350	11663,3
3	20	72	0,146	4409,8	0,296	5,869	10330,0
4	30	24	16,155	689,8	0,276	3,820	1285,9
5	30	48	3,885	8440,4	0,372	9,710	2101,7
6	30	72	2,120	10517,4	0,281	7,834	2007,8
7	40	24	26,134	2641,1	0,303	4,205	7583,9
8	40	48	16,907	12869,3	0,324	7,480	4355,5
9	40	72	12,827	17247,6	0,205	5,560	2465,4

Concentração inicial do inóculo – 0,43 g/L.
Foi adotado o nível +1 para a variável de maior concentração e tempo, –1 para a variável de menor concentração e tempo, e 0 para o ponto central.

Por se tratar de um projeto experimental fatorial envolvendo três níveis (-1, 0, +1) e duas variáveis (X_1, X_2), as equações geradas pelo modelo completo consideram termos quadráticos (X_1^2, X_2^2) em sua estrutura. Tal como nos planejamentos anteriores, os parâmetros com nível de significância maior que 10 %, em um teste de hipótese utilizando t de Student, foram considerados não relevantes. As Tabelas 4.16 a 4.20 mostram as variáveis que apresentaram valores de níveis de significância menores que 10% e o coeficiente de regressão para as variáveis X_1, X_2 e para as interações para as seguintes respostas: concentração de sacarose residual, viscosidade absoluta do meio fermentado, fator de conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$, concentração de goma produzida e viscosidade da solução de goma a concentração de 1% (p/v), respectivamente. As Equações 4.11, 4.13, 4.15, 4.17 e 4.19 apresentam os modelos ajustados para as respostas na ordem enumerada anteriormente. Esta ferramenta estatística permite a partir do modelo ajustado plotar superfícies de respostas e identificar sob projeção rotacional da figura o ponto que maximiza ou minimiza a resposta analisada. Outro método, oriundo de programação em *Software Maple V Release 4*, determina

as raízes características da equação quadrática (λ_1 e λ_2) proveniente da superfície de 2ª ordem ajustada por mínimos quadrados e o ponto estacionário.

Para visualizar com maior facilidade os efeitos das variáveis independentes (concentração de sacarose e tempo de fermentação) sobre a concentração de sacarose residual, viscosidade absoluta do meio fermentado, fator de conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$, concentração de goma produzida e viscosidade da solução de goma a 1%, foram feitas as superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 4.13, 4.14, 4.15, 4.16 e 4.17, respectivamente.

Tabela 4.16 – Regressão múltipla para a C_{SR} quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(4)	p
Mean/Interc.	4,475	0,823	5,433	0,00557
X_1	7,236	0,451	16,042	0,00009
X_1^2	4,000	0,781	5,120	0,00689
X_2	-6,479	0,451	-14,363	0,00014
X_2^2	4,368	0,781	5,591	0,00502
$R^2 = 0,992$				

$$C_{SR} = 4,475 + 7,236\ X_1 - 6,479\ X_2 + 4,000\ X_1^2 + 4,368\ X_2^2 \quad (4.11)$$

Os sinais dos coeficientes das variáveis isoladas X_1 e X_2 mostram que para menores concentrações de sacarose e maiores tempos de fermentação, menores são as concentrações de sacarose residual. Esta análise está de acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.15, na qual verifica-se que os menores valores para a sacarose residual foram obtidos nos 3 primeiros experimentos (concentração de sacarose de 20 g/L) e esta concentração diminui com o tempo de fermentação para todos os ensaios do planejamento.

A Equação 4.12 apresenta a superfície ajustada na forma canônica.

$$Y_{SR} = -0,917 + 3,896\ W_1^2 + 4,473\ W_2^2 \quad (4.12)$$

Os sinais positivos das raízes λ_1 e λ_2, mostraram que a C_{SR} apresenta um ponto de mínimo, o que foi confirmado pela superfície de resposta apresentado na Figura 4.13. O ponto de otimização encontrado para a minimização da concentração de sacarose residual foi de – 0,865 (21,35 g/L) para a concentração de sacarose e 0,697 (64,7h) para o tempo. Este resultado está de acordo com os mostrados na Tabela 4.15 em que obteve-se menor

concentração de sacarose residual para o experimento 3, no qual utilizou-se 20 g/L de sacarose e 72 h de fermentação.

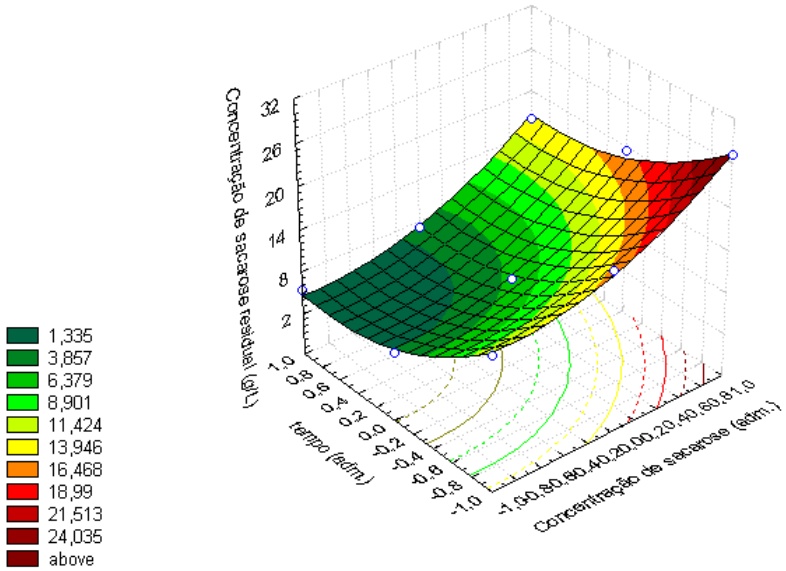


Figura 4.13 - Superfície de resposta para a concentração de sacarose residual quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h.

A superfície de resposta mostra que o ponto de mínimo para a concentração de sacarose residual encontra-se entre -0,6 e -1,0 (24 e 20 g/L) para a concentração de sacarose e entre 0,2 e 1,0 (52,8 e 72 h) para o tempo de fermentação na forma codificada das variáveis.

Tabela 4.17 - Regressão múltipla para a μ_{MF} quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(3)	p
Mean/Interc.	8615,000	213,452	40,360	0,00003
X_1	3727,283	116,913	31,881	0,00007
X_1^2	642,850	202,499	3,174	0,05030
X_2	4780,067	116,913	40,886	0,00003
X_2^2	-3098,700	202,499	-15,302	0,00061
X_1X_2	2590,050	143,188	18,088	0,00037
$R^2 = 0,999$				

$$\mu_{MF} = 8615,000 + 3727,283\ X_1 + 4780,067\ X_2 + 642,850\ X_1^2 - 3098,700\ X_2^2 + 2590,050\ X_1X_2 \quad (4.13)$$

Os sinais dos coeficientes das variáveis isoladas X_1 e X_2 mostram que para maiores concentrações de sacarose e maiores tempos de fermentação maiores são as viscosidades do meio fermentado. Este comportamento pode ser observado nos resultados apresentados na Tabela 4.15, em que a viscosidade do meio foi aumentando com o tempo de fermentação para

todas as concentrações de sacarose utilizadas e que aumentando esta concentração, a μ_{MF} também aumenta. Além disso, a Equação 4.13 mostra que o efeito do tempo na resposta foi mais significativo do que o da concentração de sacarose.

A Equação 4.14 apresenta a superfície ajustada na forma canônica.

$$Y_{MF} = 3538{,}042 - 3503{,}221\ W_1^2 + 1047{,}321\ W_2^2 \qquad (4.14)$$

Os sinais diferentes das raízes características λ_1 e λ_2, mostraram que a μ_{MF} apresenta um ponto de sela, o que foi confirmado observando a superfície de resposta apresentada na Figura 4.14. O ponto de otimização encontrado para a maximização da viscosidade do meio fermentado foi de 0,999 (40 g/L) para a concentração de sacarose e 0,828 (67,8h) para o tempo. Este resultado está de acordo com os mostrados na Tabela 4.15 em que obteve-se maior viscosidade do meio fermentado no experimento 9, no qual utilizou-se 40 g/L de sacarose e 72 h de fermentação.

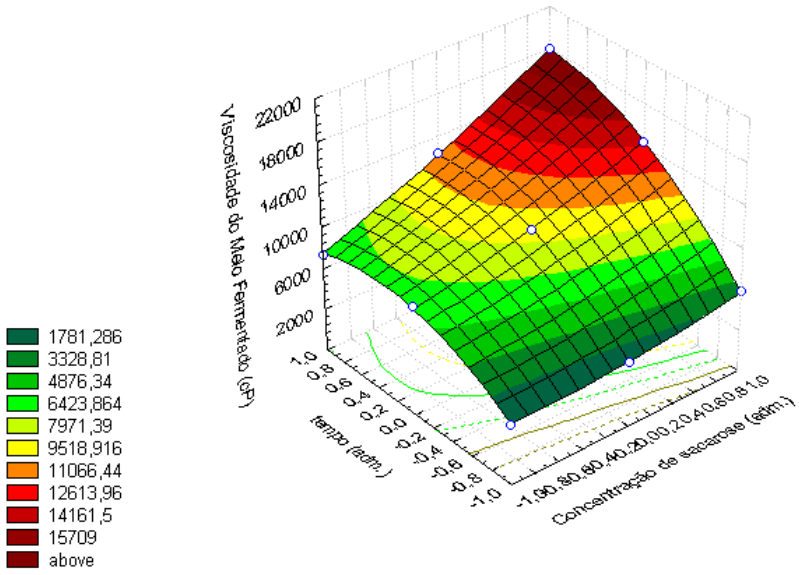


Figura 4.14 - Superfície de resposta para a viscosidade do meio fermentado quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h.

A superfície de resposta mostra que o ponto de máxima viscosidade do meio fermentado encontra-se no ponto 1,0 (40 g/L) para a concentração de sacarose e entre 0,6 e 1,0 (62,4 e 72 h) para o tempo de fermentação na forma codificada das variáveis.

Tabela 4.18 - Regressão múltipla para $Y_{P/S}$ quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(5)	p
Mean/Interc.	0,376	0,0158	23,798	0,0000024
X_1	-0,023	0,0112	-2,073	0,0929035
X_2^2	-0,108	0,0193	-5,600	0,0025080
X_1X_2	-0,038	0,0137	-2,751	0,0402687
$R^2 = 0,896$				

$$Y_{P/S} = 0,376 – 0,023\ X_1 – 0,108\ X_2^2 – 0,038\ X_1X_2 \quad (4.15)$$

A Equação 4.15 do modelo ajustado mostra que apenas a variável isolada X_1 (concentração de sacarose) foi significativa para o fator de conversão de substrato em produto. Conforme o modelo ajustado, aumentando-se a concentração de sacarose, ocorre uma redução em $Y_{P/S}$, porém este efeito é pequeno. Analisando os resultados na Tabela 4.15, verifica-se que os experimentos realizados a 48 h foram os que proporcionaram melhores resultado de $Y_{P/S}$ e que para esse tempo de fermentação a concentração de 20 g/L foi a que conduziu a melhores resultados dos fatores de conversão de substrato em produto.

A Equação 4.16 apresenta a superfície ajustada na forma canônica.

$$Y = 0,402 – 0,112\ W_1^2 – 0,00575\ W_2^2 \quad (4.16)$$

Os sinais negativos das raízes características λ_1 e λ_2, mostraram que a superfície de resposta do modelo ajustado para $Y_{P/S}$ apresenta um ponto de máximo, como pode ser visto na Figura 4.15. O ponto de otimização encontrado para a maximização do fator de conversão de substrato em produto foi de -1,0 (20 g/L) para a concentração de sacarose e 0,289 (54,9h) para o tempo. Este resultado está de acordo com os mostrados na Tabela 4.15 em que se obteve maior $Y_{P/S}$ para o experimento 2, utilizando-se 20 g/L de sacarose e 48 h de fermentação.

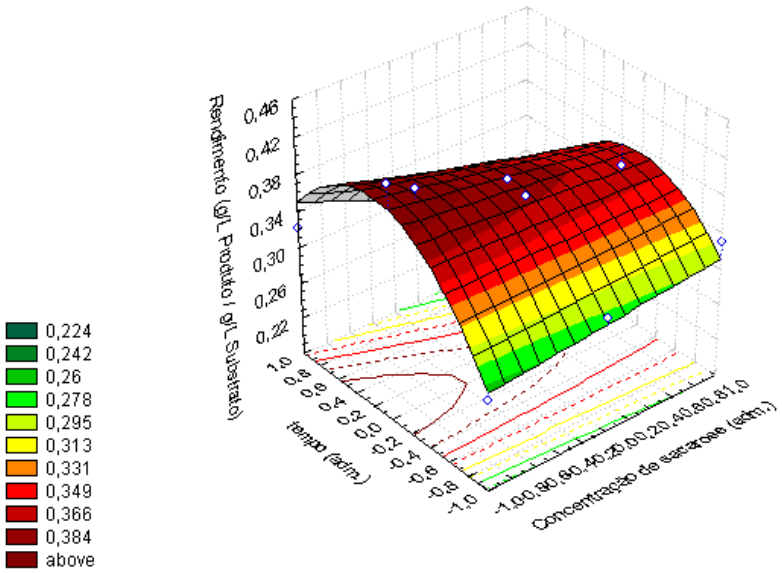


Figura 4.15 - Superfície de resposta para a conversão de substrato a produto quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h.

A superfície de resposta mostra que o ponto de máximo $Y_{P/S}$ encontra-se no ponto –1,0 (20 g/L) para a concentração de sacarose e entre -0,2 e 0,6 (43,2 e 62,4h) para o tempo de fermentação na forma codificada das variáveis.

Tabela 4.19 - Regressão múltipla para C_G quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(5)	p
Mean/Interc.	9,539	0,626	15,240	0,0000221
X_1^2	-1,539	0,594	-2,591	0,0487392
X_2	1,535	0,343	4,476	0,0065414
X_2^2	-3,627	0,594	-6,108	0,0017045
$R^2 = 0,928$				

$$C_G = 9,539 + 1,535\ X_2 - 1,539\ X_1^2 - 3,627\ X_2^2 \qquad (4.17)$$

A Equação 4.17 do modelo ajustado mostra que apenas a variável isolada X_2 (tempo de fermentação) foi significativa para a concentração de goma produzida. O sinal do coeficiente desta variável indica que para maiores tempos de fermentação, maiores os valores de C_G. Os resultados da Tabela 4.15 mostram que os experimentos realizados a 48 h foram os que proporcionaram melhores resultados de C_G e para esse tempo de fermentação a concentração de 30 g/L foi a que conduziu ao melhor resultado.

A Equação 4.18 apresenta a superfície ajustada na forma canônica.

$$Y_G = 9{,}702 - 3{,}672\ W_1^2 - 1{,}494\ W_2^2 \qquad (4.18)$$

Os sinais negativos das raízes características λ_1 e λ_2, mostraram que a superfície de resposta do modelo ajustado para C_G apresenta um ponto máximo conforme a Figura 4.16. O ponto de otimização encontrado para a maximização da concentração de goma produzida foi de 0,0114 (30,114 g/L) para a concentração de sacarose e 0,21 (53,0 h) para o tempo. Este resultado está de acordo com o mostrado na Tabela 4.15 em que obteve-se maior C_G para o experimento 5, no qual utilizou-se 30 g/L de sacarose e 48 h de fermentação.

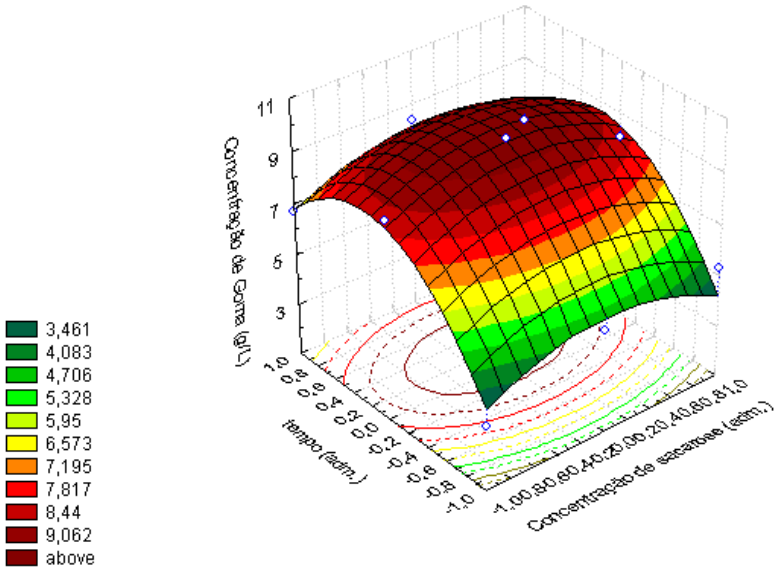


Figura 4.16 - Superfície de resposta para a concentração da goma quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h.

A superfície de resposta mostra que o ponto de máximo para a concentração de goma produzida encontra-se entre os pontos -0,4 e 0,4 (26 e 34 g/L) para a concentração de sacarose e entre -0,2 e 0,6 (43,2 e 62,4 h) para o tempo de fermentação na forma codificada das variáveis.

Tabela 4.20 - Regressão múltipla para $\mu_{G1\%}$ quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(5)	p
Mean/Interc.	1798,467	672,939	2,673	0,044213
X_1	-2604,083	475,840	-5,473	0,002775
X_1^2	5607,217	824,179	6,803	0,001045
X_1X_2	-1853,125	582,783	-3,180	0,024544
$R^2 = 0{,}945$				

$$\mu_{G1\%} = 1798{,}467 - 2604{,}083\ X_1 + 5607{,}217\ X_1^2 - 1853{,}125\ X_1X_2 \qquad (4.19)$$

A Equação 4.19 do modelo ajustado mostra que apenas a variável isolada X_1 (concentração de sacarose) foi significativa para a viscosidade da solução de goma a 1% (p/v). O sinal negativo desta variável mostra que maiores concentrações de sacarose proporcionam menores $\mu_{G1\%}$. Os resultados na Tabela 4.15 mostram que os experimentos conduzidos em menor concentração de sacarose (ensaios 1, 2 e 3) resultaram em maiores $\mu_{G1\%}$, e para esses ensaios o melhor resultado foi no tempo de 48 h de fermentação.

A Equação 4.20 apresenta a superfície ajustada na forma canônica.

$$Y_{G1\%} = 2167{,}424 - 887{,}517\ W_1^2 + 5739{,}407\ W_2^2 \qquad (4.20)$$

Os sinais diferentes das raízes características λ_1 e λ_2, mostraram que a superfície de resposta do modelo ajustado para $\mu_{G1\%}$ apresenta ponto de sela, como pode ser visto na Figura 4.17. O ponto de otimização encontrado para a maximização da concentração de goma produzida foi de –0,997 (20,0 g/L) para a concentração de sacarose e –0,264 (41,7 h) para o tempo. Este resultado está de acordo com o mostrado na Tabela 4.15 em que se obteve maior $\mu_{G1\%}$ para o experimento 2, utilizando-se 20 g/L de sacarose e 48 h de fermentação.

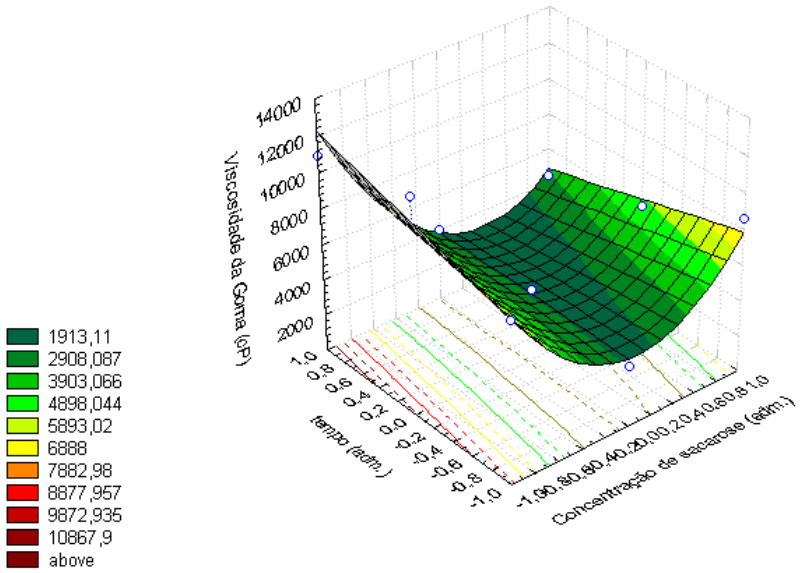


Figura 4.17 - Superfície de resposta para a viscosidade da solução 1% da goma quando avaliados os tempos de processo iguais a 24, 48 e 72 h.

A superfície de resposta mostra que o ponto de máximo para a viscosidade da solução de goma a 1% (p/v) encontra-se na menor concentração de sacarose -1,0 (20 g/L) na forma codificada da variável.

Comparando os resultados da Tabela 4.15 em termos de viscosidade absoluta do meio fermentado com os de viscosidade da solução de goma a 1%, verifica-se que maiores μ_{MF} não significa maiores $\mu_{G1\%}$.

A Tabela 4.21 apresenta um resumo dos pontos de otimização obtidos para os valores da concentração de sacarose e do tempo de fermentação em relação a cada resposta estudada, assim como a especificação de cada ponto obtido na faixa experimental adotada.

Tabela 4.21 - Pontos de otimização para a concentração de sacarose e o tempo de processo em erlenmeyer.

Respostas monitoradas no processo	Especificação do ponto obtido	Concentração de sacarose (g/L)	Tempo (h)
C_{SR}	ponto de mínimo	21,350	64,7
μ_{MF}	ponto de sela	39,990	67,8
$Y_{P/S}$	ponto de máximo	20,000	54,9
C_G	ponto de máximo	30,114	53,0
$\mu_{G1\%}$	ponto de sela	20,030	41,7

Concentração de sacarose em g/L – (20, 30, 40); Tempo de fermentação em horas – (24, 48, 72)

Analisando a Tabela 4.21 verifica-se que para a maioria das respostas a concentração de sacarose entre 20 e 30 g/L e o tempo em torno de 48 h favoreceram as respostas estudadas. O maior interesse na otimização seria obter maiores valores para $Y_{P/S,}C_G$ e $\mu_{G1\%}$. Assim, para o próximo planejamento adotou como ponto central 25 g/L de sacarose e 24 horas para o tempo de fermentação. A realização de testes preliminares em fermentador, uma vez fixadas as condições de temperatura em 28° C, de aeração em 0,5 vvm e de agitação mecânica em 800 rpm indicam total consumo de substrato decorridas 24 h de processo, razão pela qual o definiu como ponto central.

4.6 – Análise do Quarto Planejamento Experimental 3^2 em Reator

As Figuras 4.18, 4.19 e 4.20 apresentam as curvas obtidas para o crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto durante o processo de produção de goma xantana para as diferentes concentrações de sacarose por *Xanthomonas campestris pv. campestris* em 30 h de fermentação.

Os experimentos foram conduzidos em reator nas seguintes concentrações de sacarose 15,0, 25,0 e 35,0 g/L. Os níveis de agitação, aeração e temperatura foram 800 rpm, 0,5 vvm e 28° ± 1° C, respectivamente (LIMA, 1999). Foi realizado controle de pH do meio

com solução de NaOH 1 N. Com relação aos valores referentes à biomassa, atingiram concentração celular máxima de 2,345 g/L para 15,0 g/L de sacarose no meio de fermentação e 2,740 g/L para 25,0 g/L de sacarose com 12 h de processo. Já para a concentração de sacarose de 35,0 g/L, o crescimento celular máximo foi de 2,295 g/L em 15 h de processo. O fator de conversão de substrato em massa celular alcançado nesse estudo para as concentrações de sacarose de 15,0, 25,0 e 35,0 g/L foi nesta ordem, 0,188 $g.g^{-1}$; 0,242 $g.g^{-1}$ e 0,075 $g.g^{-1}$. Lima (1999), trabalhando com três linhagens de *Xanthomonas campestris pv. campestris* obteve o maior fator de conversão de substrato em massa celular para LFR-4 de 0,08 $g.g^{-1}$, seguidos de LFR-3 ($Y_{x/s}$ = 0,05 $g.g^{-1}$) e NRRL B-1459 ($Y_{x/s}$ = 0,03 $g.g^{-1}$).

Vale salientar que as condições para crescimento celular e formação da goma xantana possuem diferentes requerimentos nutricionais, bem como condições físico-químicas distintas (TAIT *et al.*, 1986). Com a finalidade de alcançar uma elevada velocidade de produção e rendimento de xantana, é necessário regular o crescimento celular e a produção de goma xantana. Foi proposto um processo em dois estágios: um, para otimizar o crescimento celular, e outro, para otimizar a produção de xantana (SHU & YANG, 1990; LO *et al.*, 1997). Este conceito do processo baseia-se no fato da necessidade de temperaturas e valores de pH diferentes para cada estágio. Uma fermentação otimizada em dois estágios resultaria em tempos menores de processo e maiores rendimentos em goma (LO *et al.*, 1997).

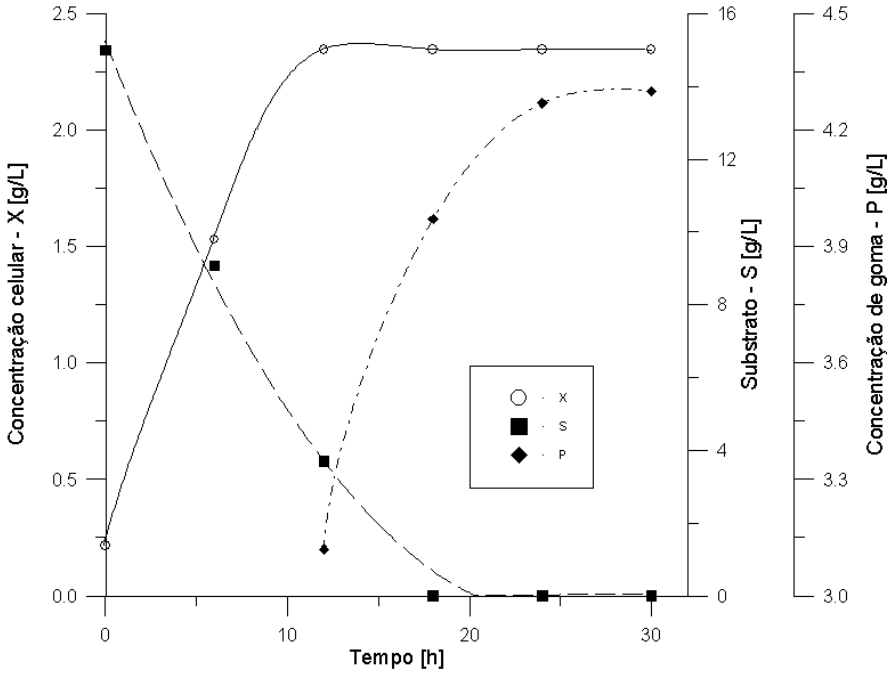


Figura 4.18 - Cinética da produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris* em meio de cultura a base de caldo de cana e 15g/L de sacarose inicial.

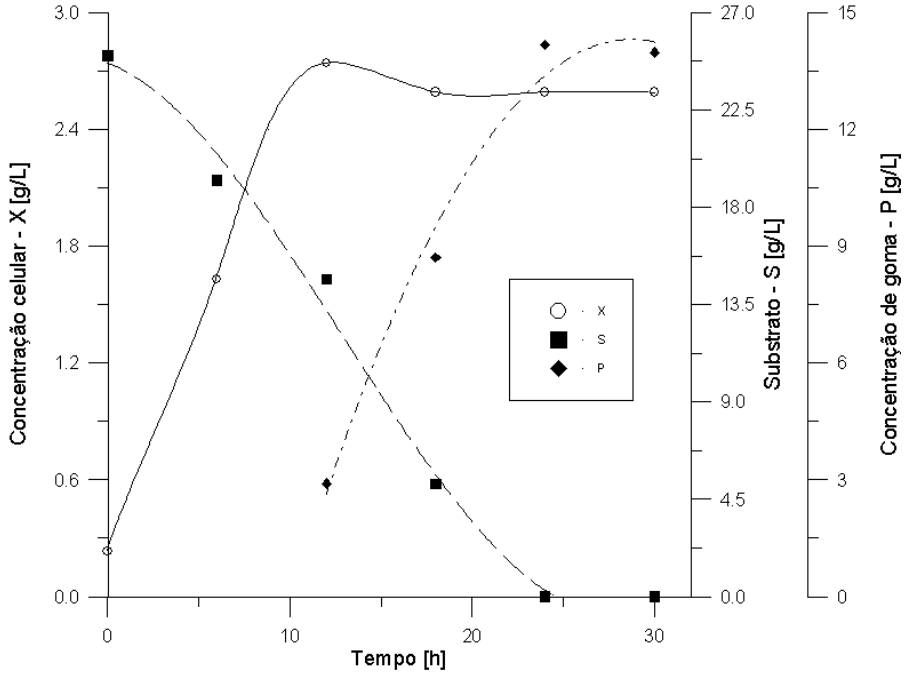


Figura 4.19 - Cinética da produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris* em meio de cultura a base de caldo de cana e 25g/L de sacarose inicial.

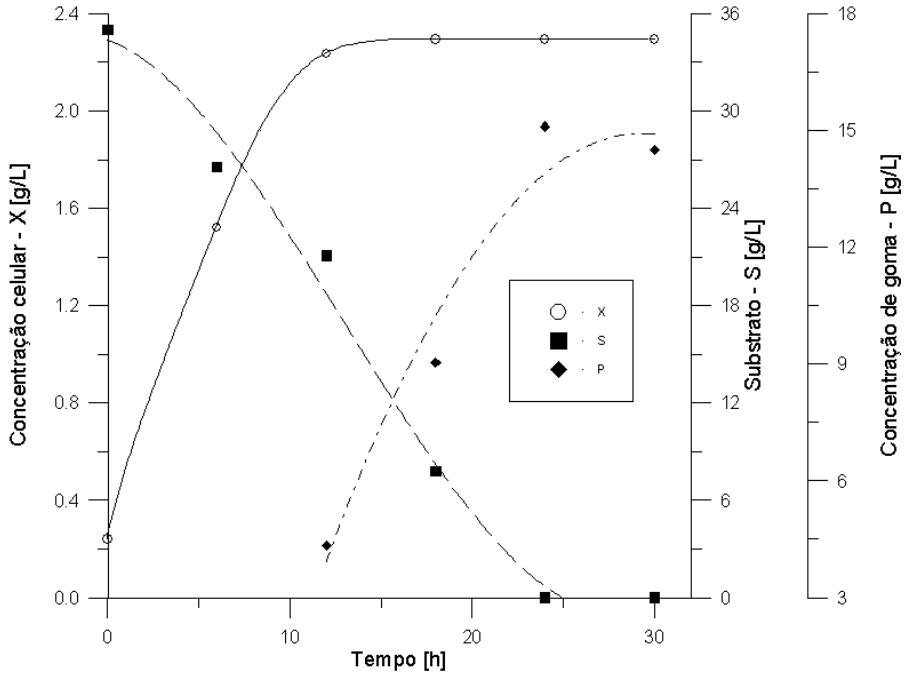


Figura 4.20 - Cinética da produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris* em meio de cultura a base de caldo de cana e 35g/L de sacarose inicial.

Segundo Rajeshwari *et al*. (1995), é vantajoso começar a produção de xantana com uma concentração de substrato definida, separando assim, os estágios de crescimento celular e produção usando carbono limitado e em excesso, respectivamente. Os pesquisadores acrescentam, ainda, que uma fermentação em vários estágios, mantendo uma concentração

inicial de açúcar de 15 g/L, durante a fase de crescimento, resulta em melhoramento de rendimento e produtividade.

As Figuras 4.18, 4.19 e 4.20 mostram que entre 12 e 15 horas o crescimento celular atinge o máximo, mantendo-se constante até 30 horas de fermentação. Verifica-se também que após 24 h de fermentação não existe mais substrato para ser consumido.

De acordo com os dados experimentais expostos na Tabela 4.22, verifica-se que o maior fator de conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$ foi atingido para a concentração de sacarose de 25,0 g/L ($Y_{P/S}$ = 0,57 $g.g^{-1}$), valor este superior àqueles obtidos nas concentrações de 15,0 e 35,0 g/L de sacarose.

Independente das concentrações iniciais de sacarose no meio de produção, o consumo de substrato foi total e a maior concentração de goma alcançada, 15,100 g/L pode ser verificada no experimento n° 8 da Tabela 4.22. Comparando os experimentos 5 e 8 para as respostas de formação de produto (g/L) e $Y_{P/S}$ em termos de utilização de substrato tem-se que a maior concentração de goma não culmina com o maior $Y_{P/S}$, logo, pode-se dizer que, os melhores resultados encontrados nesse estudo referem-se ao experimento n° 5, onde para uma menor concentração de sacarose obteve-se concentração de goma (14,180 g/L) próxima à do experimento n° 8 (15,100 g/L). Lima (1999) atingiu o máximo de 15 g/L de biopolímero quando o processo foi conduzido com *Xanthomonas campestris pv. campestris* LFR-4. Já para as linhagens NRRL B-1459 e LFR-3, a concentração de goma foi 12,5 e 8 g/L, respectivamente. Para a mesma linhagem de *Xanthomonas campestris pv. campestris* NRRL B-1459, o valor da concentração de goma encontrado nesse trabalho foi significativamente maior do que o encontrado por LIMA (1999), para condições de processo similares, com exceção da matéria-prima empregada, no caso este autor utilizou glicose.

Analisando as viscosidades dos meios fermentados, inicialmente, o mosto apresenta comportamento Newtoniano. Após um período de 12 h de fermentação, o caldo fermentado já apresenta características pseudoplásticas típicas de soluções de polissacarídeos pelo aumento expressivo da concentração de goma no meio. Nos experimentos, as viscosidades dos meios foram medidas apenas a partir de 12 h, a fim de evitar variações significativas do volume do meio fermentativo. As medidas viscosimétricas revelaram que os mais altos valores de viscosidade absoluta do meio fermentado foram obtidos para a concentração de sacarose igual a 35,0 g/L conforme Tabela 4.22 seguida das concentrações de 25,0 e 15,0 g/L.

Com o objetivo de estudar o comportamento reológico da solução polimérica de xantana a 1% proveniente dos mostos fermentados a diferentes concentrações de sacarose,

foram realizadas medidas de viscosidades absolutas em função do tempo de fermentação e da taxa de deformação resultando nas respostas monitoradas no processo segundo Tabela 4.22. Observa-se que para tempos de fermentação menores que 18 h, a viscosidade da solução 1% é maior e a solução apresentou-se límpida, transparente, ao passo que, para tempos maiores, a viscosidade diminuiu e a solução adquiriu aspecto mais translúcido. Tal fato pode ser explicado pela própria complexidade do meio fermentado imprimindo diferenças na configuração estrutural do biopolímero, e até mesmo, reduzindo seu peso molecular. Vale ressaltar os maiores valores de viscosidade da solução 1% de goma para os ensaios 4 e 5 da Tabela 4.22. Ainda com relação aos ensaios 4 e 5, verifica-se que as soluções 1% do polímero provêm de meios fermentados de viscosidades intermediárias àquelas onde a concentração inicial de sacarose foi 15,0 e 35,0 g/L, sugerindo que a polimerização foi mais efetiva na condição de 25,0 g/L de sacarose no meio.

Lopes (1989) observou a diminuição da viscosidade entre duas amostras da goma xantana (X-RPI e X-RPII) e atribuiu esta variação à diminuição do peso molecular do polímero em virtude da presença, no mosto fermentado, de enzimas promotoras de degradação. A ocorrência de celulase seria responsável pela lise de ligações glicosídicas da cadeia principal da goma e, conseqüentemente, pela redução do peso molecular e da viscosidade da xantana.

Tabela 4.22 - Valores obtidos para as respostas relativas ao 4º planejamento experimental 3^2.

Nº exp.	Concentração de sacarose (g/L) (X_1)	Tempo (h) (X_2)	sacarose residual (g/L)	Viscosidade do meio a 0,75 s^{-1} (cP)	$Y_{P/S}$ ($g.g^{-1}$)	Concentração de goma (g/L)	Viscosidade da goma a 0,75 s^{-1} (cP)	P (g/Lh)
1	15	18	0	438,9	0,264	3,970	7748,1	0,221
2	15	24	0	565,4	0,285	4,270	8813,6	0,178
3	15	30	0	426,9	0,287	4,300	2601,5	0,143
4	25	18	5,200	4973,9	0,440	8,710	**21509,9**	0,484
5	25	24	0,520	6526,6	**0,579**	**14,180**	**20493,7**	0,591
6	25	30	0	6055,4	0,559	13,980	10657,6	0,466
7	35	18	7,774	10688,6	0,332	9,040	7544,0	0,502
8	35	24	0	21909,9	**0,431**	**15,100**	7356,3	**0,629**
9	35	30	0	27115,8	0,414	14,500	5010,8	0,483

As Tabelas 4.23 a 4.27 mostram as variáveis que apresentaram valores de níveis de significância menores que 10%, o coeficiente de regressão para as variáveis X_1, X_2 e suas interações para as seguintes respostas: viscosidade absoluta do meio fermentado, fator de conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$, concentração de goma produzida, viscosidade da solução de goma a concentração de 1% (p/v) e produtividade, respectivamente. As Equações

4.21, 4.23, 4.25, 4.27 e 4.29 apresentam os modelos ajustados para as respostas na ordem enumerada anteriormente.

Como forma de ilustrar os efeitos das variáveis concentração de sacarose e tempo de fermentação nas respostas estudadas estão apresentados nas Figuras 4.21, 4.22, 4.23, 4.24 e 4.25 as superfícies de resposta.

Tabela 4.23 - Regressão múltipla para a μ_{MF} quando o processo foi avaliado no reator nos tempos iguais a 18, 24 e 30 h.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(4)	p
Mean/Interc.	5851,967	1403,933	4,168	0,01405
X_1	9713,850	992,730	9,785	0,00061
X_1^2	4338,950	1719,460	2,523	0,06512
X_2	2916,117	992,730	2,937	0,04250
X_1X_2	4109,800	1215,842	3,380	0,02778
$R^2 = 0,968$				

$$\mu_{MF} = 5851,967 + 9713,850\ X_1 + 2916,117\ X_2 + 4338,950\ X_1^2 + 4109,800\ X_1X_2 \qquad (4.21)$$

Os sinais dos coeficientes das variáveis isoladas X_1 e X_2 mostram que para maiores concentrações de sacarose e maiores tempos de fermentação maiores são as viscosidades dos meios fermentados. Este comportamento pode ser observado nos resultados apresentados na Tabela 4.15 e 4.22, em que a viscosidade do meio foi aumentando com o tempo de fermentação para todas as concentrações de sacarose utilizadas e que aumentando esta concentração, μ_{MF} também aumenta. A Equação 4.21 mostra que o efeito da concentração de sacarose foi mais significativo do que o do tempo de fermentação, ao contrário do que ocorreu no experimento realizado nos erlenmeyers.

A Equação 4.22 apresenta a superfície ajustada na forma canônica.

$$Y_{MF} = 1638,803 - 2045,446\ W_1^2 + 5000,346\ W_2^2 \qquad (4.22)$$

Os sinais diferentes das raízes características λ_1 e λ_2, mostraram que a μ_{MF} apresenta um ponto de sela, o que foi confirmado observando a superfície de resposta apresentada na Figura 4.21. O ponto de otimização encontrado para a maximização da viscosidade do meio fermentado foi de 0,992 (34,92 g/L) para a concentração de sacarose e 0,268 (25,6h) para o tempo. Este resultado está de acordo com os mostrados na Tabela 4.22 em que obteve-se maiores viscosidades do meio fermentado nos experimentos 8 e 9, no qual utilizou-se 35 g/L de sacarose e 24 e 30 h de fermentação, respectivamente.

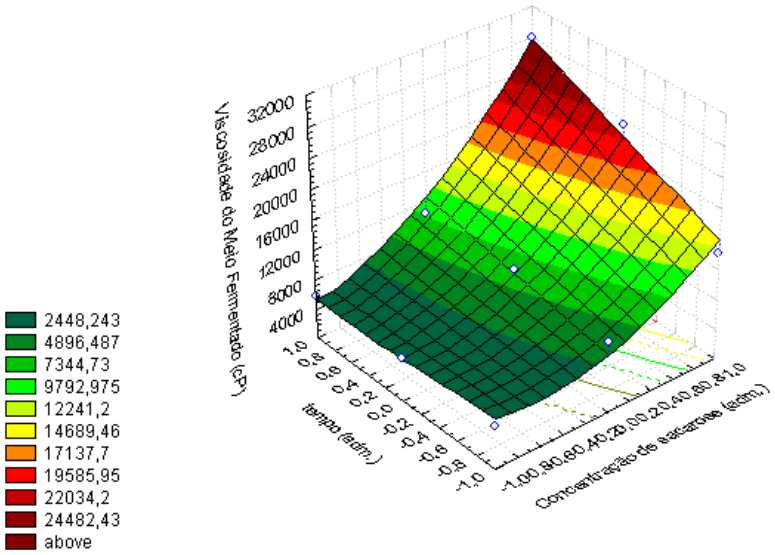


Figura 4.21 - Superfície de resposta para a viscosidade do meio fermentado quando o processo foi avaliado no reator.

A superfície de resposta mostra que o ponto de máxima viscosidade do meio fermentado encontra-se no ponto 1,0 (35 g/L) para a concentração de sacarose na forma codificada das variáveis.

Tabela 4.24 - Regressão múltipla para $Y_{P/S}$ quando o processo foi avaliado no reator nos tempos iguais a 18, 24 e 30 h.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(4)	p
Mean/Interc.	0,559	0,024	23,530	0,0000193
X_1	0,057	0,013	4,370	0,0119647
X_1^2	-0,191	0,023	-8,458	0,0010709
X_2	0,037	0,013	2,871	0,0454296
X_2^2	-0,049	0,023	-2,175	0,0952276
$R^2 = 0,963$				

$$Y_{P/S} = 0,559 + 0,057\ X_1 - 0,191\ X_1^2 + 0,037\ X_2 - 0,049\ X_2^2 \qquad (4.23)$$

Os sinais dos coeficientes das variáveis isoladas X_1 e X_2 na Equação 4.23 mostram que para maiores concentrações de sacarose e maiores tempos de fermentação maiores são os fatores de conversão de substrato em produto. Este comportamento pode ser observado nos resultados apresentados na Tabela 4.22, em que os $Y_{P/S}$ foram maiores para os experimentos realizados na concentração de 25 g/L e nesta concentração para o tempo de 24 h. A Equação 4.23 mostra que os efeitos das duas variáveis de processo são próximos em relação à resposta analisada.

A Equação 4.24 apresenta a superfície ajustada na forma canônica.

$$Y = 0{,}571 - 0{,}191\ W_1^2 - 0{,}0486\ W_2^2 \qquad (4.24)$$

Os sinais negativos das raízes características λ_1 e λ_2, mostraram que a superfície de resposta do modelo ajustado para $Y_{P/S}$ apresenta um ponto máximo, como mostra a Figura 4.22. O ponto de otimização encontrado para a maximização do fator de conversão de substrato em produto foi de 0,165 (26,65 g/L) para a concentração de sacarose e 0,406 (26,4 h) para o tempo. Este resultado esta de acordo com os mostrados na Tabela 4.22 em que obteve-se maior $Y_{P/S}$ para o experimento 5, no qual utilizou-se 25 g/L de sacarose e 24 h de fermentação.

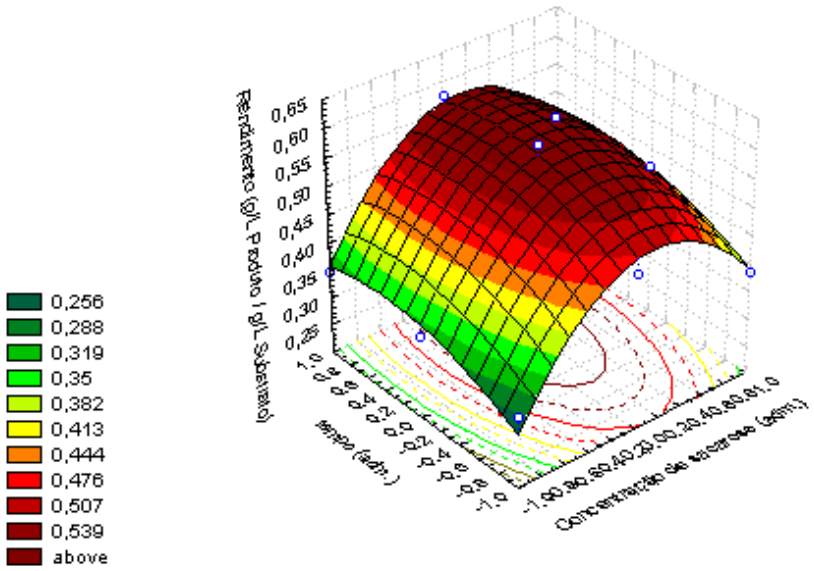


Figura 4.22 - Superfície de resposta para a conversão de substrato a produto quando o processo foi avaliado no reator.

A superfície de resposta mostra que o ponto de máximo $Y_{P/S}$ encontra-se entre -0,4 e 0,4 (20 e 28 g/L) para a concentração de sacarose e para o valor do tempo próximo ao ponto central.

El-Salam *et al*. (1994) pesquisaram a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* E-NRC-3 a partir de xarope de caldo de cana e alcançaram para 3,0% de açúcar

total no meio fermentado 15,5 g/L de xantana e uma conversão de substrato a produto de 0,58 $g.g^{-1}$, resultados que estão bastante próximos aos obtidos nesta pesquisa.

Tabela 4.25 - Regressão múltipla para C_G quando o processo foi avaliado no reator nos tempos iguais a 18, 24 e 30 h.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(5)	p
Mean/Interc.	12,290	1,189	10,332	0,0001461
X_1	4,350	0,841	5,172	0,0035491
X_1^2	-3,760	1,457	-2,581	0,0493711
X_2	1,843	0,841	2,192	0,0799319
$R^2 = 0,884$				

$$C_G = 12,290 + 4,350\ X_1 - 3,760\ X_1^2 + 1,843\ X_2 \quad (4.25)$$

A Equação 4.25 mostra que para maiores concentrações de sacarose e maiores tempos de fermentação maiores são as concentrações de goma. Os resultados apresentados na Tabela 4.22 mostram que as maiores concentrações de goma foram obtidas para a concentração de 35 g/L e tempos de 24 e 30 h. Nesta equação verifica-se que o efeito da concentração de sacarose foi mais significativo na resposta do que o do tempo.

A Equação 4.26 apresenta a superfície ajustada na forma canônica.

$$Y_G = 15,787 - 3,979\ W_1^2 - 1,881\ W_2^2 \quad (4.26)$$

Os sinais negativos das raízes características λ_1 e λ_2 na Equação acima, mostraram que a superfície de resposta do modelo ajustado para C_G apresenta um ponto máximo, como mostra a Figura 4.23. O ponto de otimização encontrado para a maximização da concentração de goma produzida foi de 0,689 (31,89 g/L) para a concentração de sacarose e 0,649 (27,9 h) para o tempo. Este resultado está de acordo com os mostrados na Tabela 4.22, conforme já discutido anteriormente.

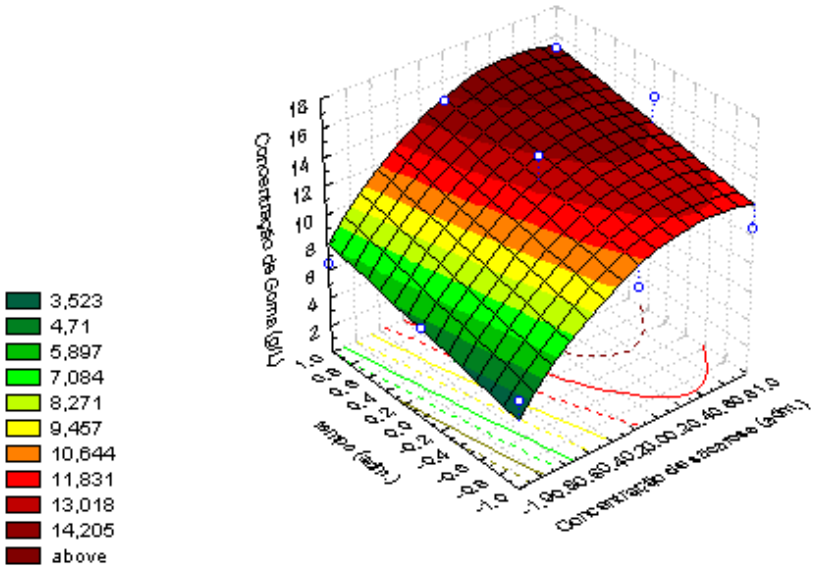


Figura 4.23 - Superfície de resposta para a concentração da goma quando o processo foi avaliado no reator.

A superfície de resposta mostra que o máximo obtido para concentração de goma foi para concentração de sacarose acima do ponto central e para maior tempo de fermentação.

Skaracis *et al.* (2003) em seus estudos visando otimizar a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* ATCC 1395 empregando planejamento Plackett-Burman, num meio onde o substrato adotado foi xarope de beterraba fortificado, conseguiram para um tempo de processo de 24 h uma faixa de produção de xantana de 11,9 a 47,5 g/L. Comprovaram ainda o efeito positivo da adição de K_2HPO_4 na produção de biomassa e de goma.

Bilanovic *et al.* (1994) utilizando resíduos cítricos e um meio padrão à base de glicose obtiveram para 24 h de processo de 2,0 a 4,0 g/L de xantana em média, resultados estes bastante inferiores aos alcançados nesta pesquisa.

Tabela 4.26 - Regressão múltipla para $\mu_{G1\%}$ quando o processo foi avaliado no reator nos tempos iguais a 18, 24 e 30 h.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(5)	p
Mean/Interc.	19582,100	1572,192	12,455	0,0000592
X_1^2	-11041,350	1491,512	-7,403	0,0007079
X_2	-3088,683	861,125	-3,587	0,0157612
X_2^2	-3042,550	1491,512	-2,040	0,0968799
$R^2 = 0,935$				

$$\mu_{G1\%} = 19582,100 - 11041,350\ X_1^2 - 3088,683\ X_2 - 3042,550\ X_2^2 \quad (4.27)$$

A Equação 4.27 do modelo ajustado mostra que apenas a variável isolada X_2 (tempo de fermentação) foi significativa para a viscosidade da solução de goma a 1% (p/v). O sinal negativo desta variável mostra que menores tempos de processo proporcionam maiores $\mu_{G1\%}$. Os resultados na Tabela 4.22 mostram que os experimentos conduzidos em concentração de sacarose de 25 g/L (ensaios 4, 5 e 6) resultaram em maiores $\mu_{G1\%}$, e para esses ensaios os resultados de 18 e 24 h foram bastante semelhantes.

A Equação 4.28 apresenta a superfície ajustada na forma canônica.

$$Y_{G1\%} = 20366{,}973 - 11054{,}721\ W_1^2 - 3029{,}178\ W_2^2 \qquad (4.28)$$

Os sinais negativos das raízes características λ_1 e λ_2 na Equação 4.28, mostraram que a superfície de resposta do modelo ajustado para $\mu_{G1\%}$ apresenta um ponto máximo, como mostra a Figura 4.24. O ponto de otimização encontrado para a maximização da concentração de goma produzida foi de -0,0094 (24,91 g/L) para a concentração de sacarose e -0,508 (20,95h) para o tempo. Este resultado está de acordo com os mostrados na Tabela 4.22, conforme já discutido anteriormente.

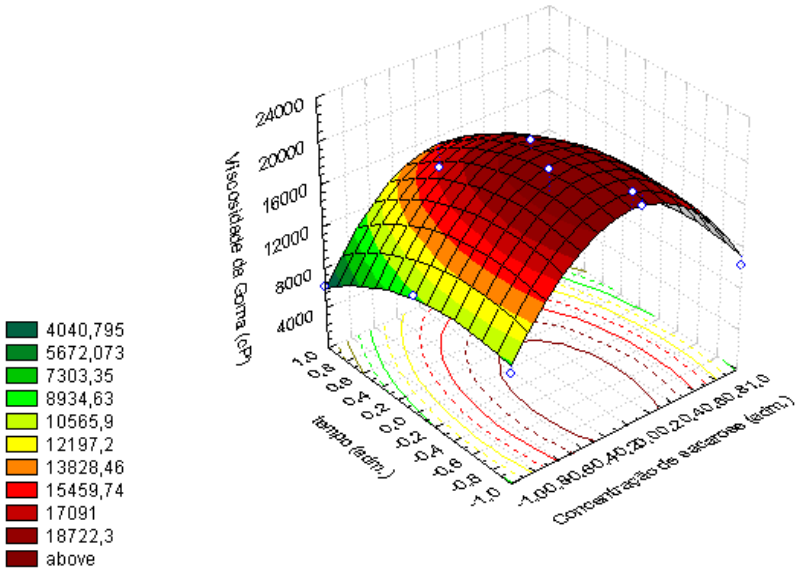


Figura 4.24 - Superfície de resposta para a viscosidade da solução 1% da goma quando o processo foi avaliado no reator.

A superfície de resposta mostra que o ponto de máxima $\mu_{G1\%}$ foi obtido para concentração de sacarose entre -0,4 e 0,2 (21 e 27 g/L) e para o tempo entre -1 e 0 (18 e 24 h).

Tabela 4.27 - Regressão múltipla para a produtividade quando o processo foi avaliado no reator nos tempos iguais a 18, 24 e 30 h.

Variáveis e interações	Coeficiente regressão	Desvio	t(5)	p
Mean/Interc.	0,569	0,035	16,277	0,0000160
X_1	0,179	0,019	9,344	0,0002365
X_1^2	-0,154	0,033	-4,651	0,0055786
X_2^2	-0,083	0,033	-2,497	0,0547039
$R^2 = 0,958$				

$$P = 0,569 + 0,179\ X_1 - 0,154\ X_1^2 - 0,083\ X_2^2 \qquad (4.29)$$

A Equação 4.29 do modelo ajustado mostra que apenas a variável isolada X_1 (concentração de sacarose) foi significativa para a produtividade. O sinal positivo desta variável mostra que maiores concentrações de sacarose proporcionam maiores P. Os resultados na Tabela 4.22 mostram que os experimentos conduzidos em concentração de sacarose de 25 g/L e 35 g/L no tempo de 24 h (ensaios 5 e 8) resultaram em maiores P.

A Equação 4.30 apresenta a superfície ajustada na forma canônica.

$$Y_P = 0,621 - 0,155\ W_1^2 - 0,082\ W_2^2 \qquad (4.30)$$

Os sinais negativos das raízes características λ_1 e λ_2 na Equação 4.30, mostraram que a superfície de resposta do modelo ajustado para P apresenta um ponto máximo, como mostra a Figura 4.25. O ponto de otimização encontrado para a maximização da produtividade foi de 0,577 (30,77 g/L) para a concentração de sacarose e -0,0639 (23,6 h) para o tempo na forma codificada. Substituindo este ponto de maximização no modelo ajustado (Equação 4.29) obtém-se uma produtividade 0,621 g/Lh. Este resultado está bem próximo do valor obtido no ensaio 8, conforme mostra a Tabela 4.22.

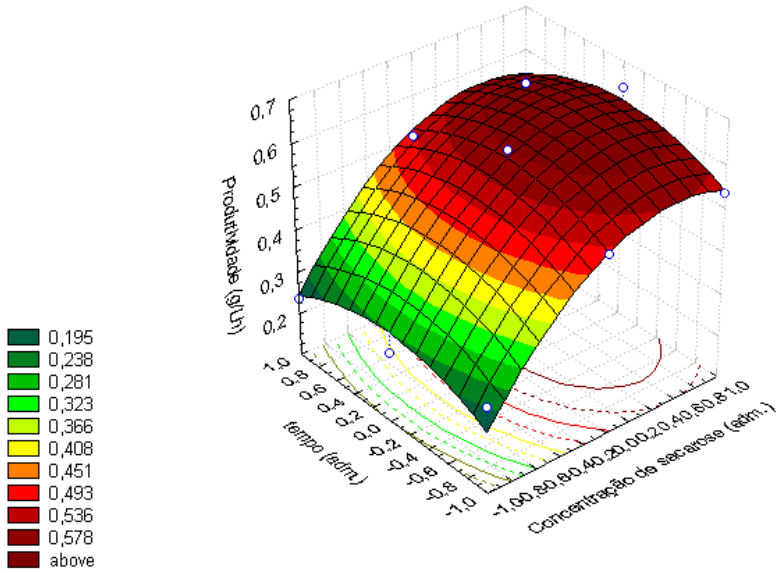


Figura 4.25 - Superfície de resposta para a produtividade quando o processo foi avaliado no reator.

A superfície de resposta mostra que o ponto de máxima produtividade foi obtido para concentração de sacarose entre 0,2 e 0,8 (27 e 33 g/L) e para o tempo entre –0,4 e 0,4 (21,6 e 26,4 h).

Amanullah *et al*. (1998) trabalharam diferentes estratégias de alimentação de glicose em biorreator e para um sistema batelada atingiram 33,1 g/L de xantana e 0,44 g/Lh de produtividade. Com relação as produtividades apresentadas na Tabela 4.22, merece destaque o ensaio 8 (0,629 g/Lh), resultado este superior ao encontrado pelos autores desse artigo.

A Tabela 4.28 apresenta um resumo dos pontos de otimização obtidos para os valores da concentração de sacarose e do tempo de fermentação em relação a cada resposta estudada, assim como a especificação de cada ponto obtido na faixa experimental adotada.

Tabela 4.28 - Pontos de otimização para a concentração de sacarose e o tempo de processo em reator.

Respostas monitoradas no processo	Especificação do ponto obtido	Concentração de sacarose (g/L)	Tempo (h)
μ_{MF}	ponto de sela	34,920	25,6
$Y_{P/S}$	ponto de máximo	26,650	26,4
C_G	ponto de máximo	31,890	27,9
$\mu_{G1\%}$	ponto de máximo	24,906	20,9
P	ponto de máximo	30,770	23,6

Concentração de sacarose em g/L – (15, 25, 35); Tempo em (h) – (18, 24, 30)

Substituindo o ponto de otimização na Equação 4.27 obtém-se a viscosidade da solução polimérica a 1% igual a 20366 cP, valor bastante próximo da condição de 24 h de fermentação a 25 g/L de concentração de sacarose. Avaliando os resultados obtidos na Tabela 4.22 e os pontos de otimização da Tabela 4.28, pode-se concluir que os melhores resultados em termos de viscosidade da solução de goma a 1% seria a concentração de sacarose de 25 g/L e tempo de fermentação entorno de 21 horas.

Substituindo este ponto de otimização (25 g/L e tempo de 21 h) nos modelos ajustados das Equações 4.29, 4.25 e 4.23, obtém-se uma produtividade de 0,548 g/Lh, concentração de goma de 11,37 g/L e $Y_{P/S}$ de 0,528. Porém estudos visando otimizar o processo em relação outras variáveis, tais como: concentração de nitrogênio, fonte de nitrogênio, nível de agitação e aeração e outras, devem ser realizados, visando melhorar o fator de conversão de substrato a produto e a concentração de goma produzida.

Os gráficos dos valores preditos x resíduos para as respostas analisadas no quarto planejamento experimental constam no Apêndice C.

A Figura 4.26 representa a viscosidade absoluta da solução 1% das amostras de xantana em função da taxa de deformação e do tempo de fermentação (24 h) em diferentes concentrações de sacarose comparada à xantana comercial. Vale ressaltar o resultado superior de viscosidade obtido pela goma produzida neste estudo em relação à xantana comercial.

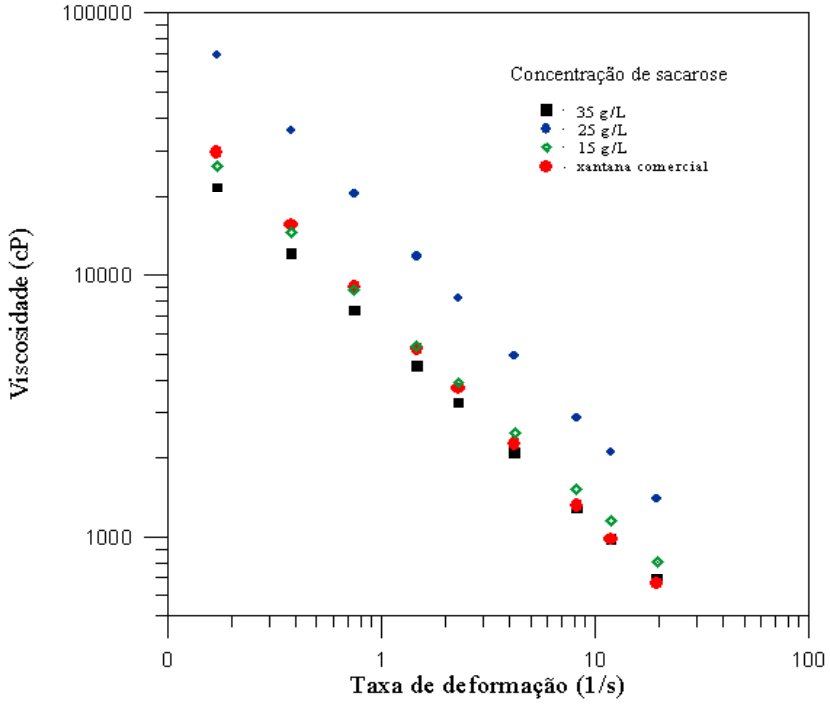


Figura 4.26 - Representa a viscosidade absoluta da solução 1% das amostras de xantana em função da taxa de deformação comparada à xantana comercial.

A Figura 4.26 foi plotada a partir dos valores da viscosidade absoluta e da taxa de deformação, uma vez conhecidos K (índice de consistência), n (índice de comportamento) para cada solução 1% de goma xantana produzida em laboratório e de xantana comercial. A Tabela 4.29 mostra os valores de K e n para as diferentes concentrações de sacarose para um tempo de fermentação de 24 h.

Tabela 4.29 - Valores de K e n para xantana produzida a partir de caldo de cana e para xantana comercial.

	15 g/L	25 g/L	35 g/L	xantana comercial
n (adm.)	0,28	0,18	0,27	0,20
K (Pa.s)	7,138	16,175	5,967	7,161

López *et al*. (2003) investigando propriedades da xantana-AHW empregando hidrolisado de resíduos ácidos da agricultura e comparando com xantana padrão, ambas as soluções a 1%, obtiveram para xantana-AHW, K e n iguais a 0,99 Pa.s e 0,23, respectivamente. Já para a xantana padrão obtiveram K e n nesta ordem iguais a 13,66 Pa.s e 0,14. Os resultados encontrados para K nesse estudo quando utilizou-se concentração de sacarose 25 g/L foi superior aos de López *et al*. provavelmente em razão da matéria-prima e do meio de produção peculiares desta pesquisa. Em relação aos valores obtidos para n, foram ligeiramente maiores do que os encontrados por estes pesquisadores.

4.7 – Espectroscopia na Região do Infravermelho

O espectro de infravermelho (IV) consiste numa metodologia adotada para detectar similaridades ou diferenças na estrutura química das gomas produzidas.

Analisando cuidadosamente os espectros de IV das gomas obtidas nas concentrações de sacarose de 15, 25 e 35 g/L nas Figuras 27, 28 e 29, e comparando com a xantana comercial na Figura 30 pode-se observar que a banda característica da deformação axial de grupos hidroxila (-OH) participantes de interações do tipo ligações de H ocorreu em torno de 3400 cm^{-1}. A banda em torno de 2500 a 3000 cm^{-1} é atribuída à deformação axial da ligação C-H (SILVERSTEIN *et al*., 1979).

As bandas características da deformação axial da carbonila de ésteres (C=O) apareceram nitidamente em 1750 cm^{-1} e 1625 cm^{-1} tanto para a goma de origem comercial quanto para os ensaios realizados neste estudo.

Na região entre 400 e 750 cm^{-1} ficou notavelmente evidenciada uma ligeira diferença entre as gomas obtidas nas diferentes concentrações de sacarose em relação à xantana comercial. A banda de absorção correspondente a 1038,0 cm^{-1} para a goma comercial e para os demais experimentos representa a absorção das ligações glicosídicas nas cadeias do biopolímero.

Logo, verificou-se que o espectro de IV da goma comercial é bastante similar àqueles obtidos para as situações de diferentes concentrações de sacarose no meio de produção pela linhagem de *Xanthomonas campestris pv. campestris* NRRL B-1459.

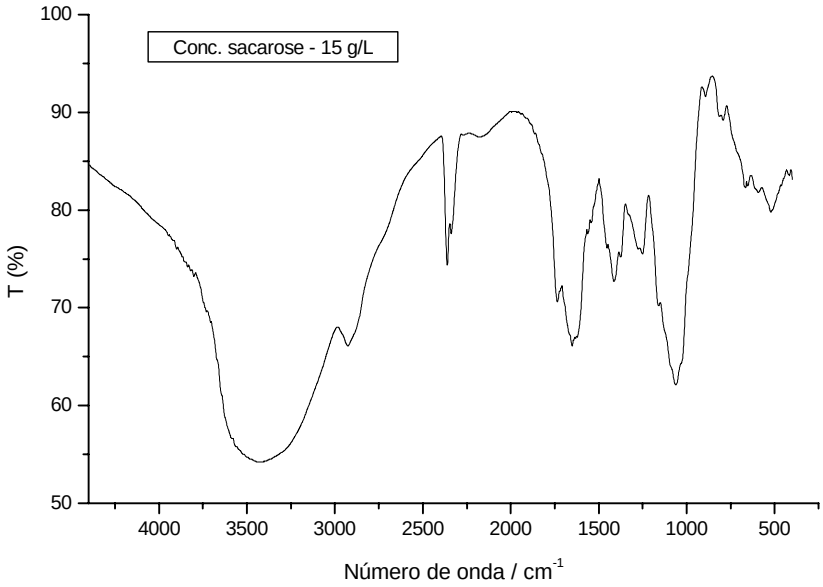


Figura 4.27 - Espectro na região do infravermelho da amostra de xantana produzida quando a concentração de sacarose é igual a 15 g/L.

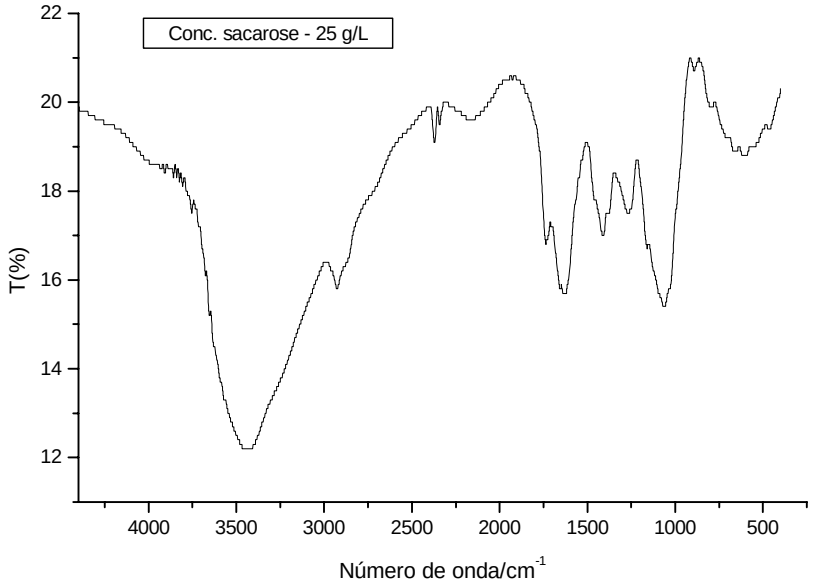


Figura 4.28 - Espectro na região do infravermelho da amostra de xantana produzida quando a concentração de sacarose é igual a 25 g/L.

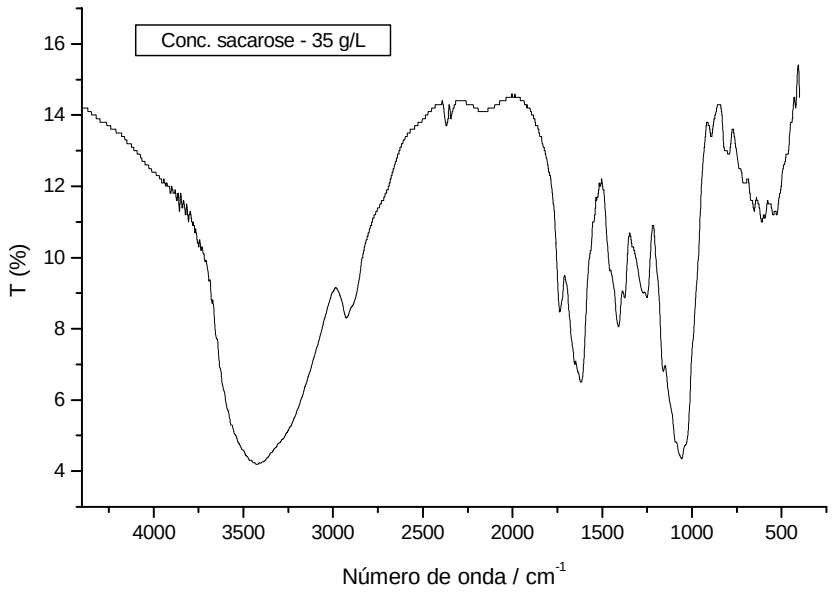


Figura 4.29 - Espectro na região do infravermelho da amostra de xantana produzida quando a concentração de sacarose é igual a 35 g/L.

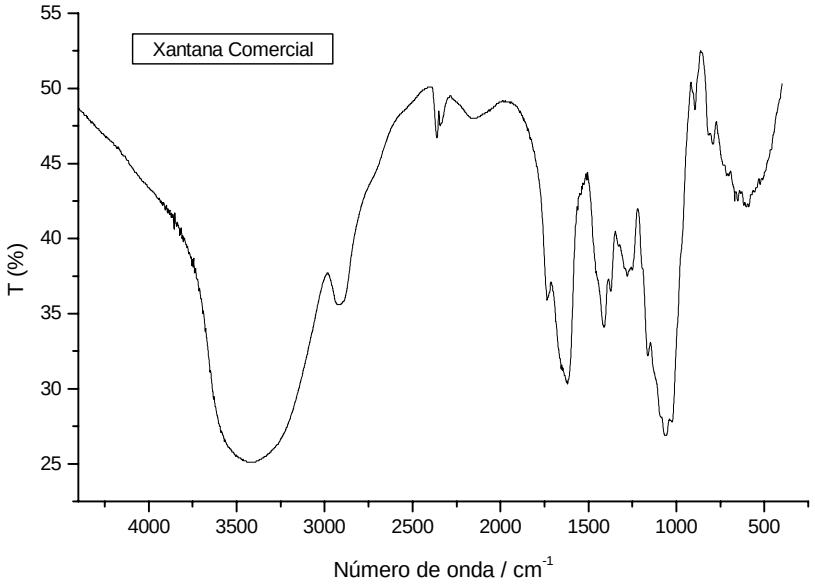


Figura 4.30 - Espectro na região do infravermelho de uma amostra de xantana comercial.

Comparando os espectros obtidos nesse estudo com aqueles realizados por Su *et al*. (2003), trabalhando com goma xantana e goma xantana modificada quimicamente visando elevar a taxa de dissolução das mesmas, conclui-se que o formato dos picos apresenta similaridade, comprovando assim a semelhança entre as gomas produzidas neste trabalho e as gomas comerciais utilizadas pelos autores.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 – Conclusões

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

- Para todos os meios fermentativos estudados, os valores de índice de consistência (K) e índice de comportamento (n) mostraram que as duas variedades de cana-de-açúcar apresentaram-se próprias para serem utilizadas como matéria-prima para produção de goma xantana.
- Entre as duas variedades de cana estudadas a SP 791011 apresentou-se como a mais adequada, proporcionando maior viscosidade do meio fermentado e maior aproveitamento de substrato.
- O caldo de cana diluído e fortificado com fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico, extrato de levedura e nitrato de amônio (4 componentes) apresentou maiores conversões de substrato em produto $Y_{P/S}$, maiores concentrações de goma produzidas e maiores viscosidades absolutas da solução de xantana a 1%.
- Os resultados do primeiro e segundo planejamentos apontaram para a necessidade de estudar a faixa que compreendesse o intervalo entre 20 e 40 g/L na concentração de sacarose e ampliar o tempo de fermentação, objetivando a otimização das respostas. Assim, no terceiro planejamento adotou-se as concentrações de sacarose iguais a 20, 30 e 40 g/L e os tempos de processo de 24, 48 e 72 horas.
- O fator de conversão de substrato em massa celular alcançado nesse estudo para as concentrações de sacarose de 15,0, 25,0 e 35,0 g/L foi nesta ordem, 0,188 $g.g^{-1}$; 0,242 $g.g^{-1}$ e 0,075 $g.g^{-1}$.
- O crescimento celular em reator atingiu o máximo entre 12 e 15 horas, mantendo-se constante até 30 horas de fermentação. Após 24 h de fermentação não existia mais substrato para ser consumido.
- Os melhores resultados obtidos em fermentador foram com concentração de sacarose 25 g/L e tempo de 24 h. Neste ensaio obteve-se a concentração de goma de 14,180 g/L, a conversão de substrato a produto de 0,579 $g.g^{-1}$, a produtividade de 0,591 g/Lh e a viscosidade da solução de goma a 1% de 20.493,7 cP.

- Os pontos de otimização em termos de viscosidade da solução de goma a 1% foram na concentração de sacarose de 25 g/L e no tempo de fermentação de 21 horas. Neste ponto obteve-se uma produtividade de 0,548 g/Lh, concentração de goma de 11,37 g/L, $Y_{P/S}$ de 0,528 $g.g^{-1}$ e viscosidade da solução polimérica 1% de 20366 cP.
- A goma produzida neste estudo na concentração de sacarose de 25g/L e no tempo de fermentação de 24 h comparada à xantana comercial apresentou resultado superior de viscosidade absoluta da solução a 1%.
- Os espectros de Infravermelho IV da goma comercial foram bastante similares àqueles obtidos para as situações de diferentes concentrações de sacarose no meio de produção pela linhagem de *Xanthomonas campestris pv. campestris* NRRL B-1459**.**

5.2 – Sugestões

- Verificar a possibilidade de retirada de um dos quatros componentes utilizados para fortificar o caldo de cana e determinar as melhores concentrações desses componentes.
- Avaliar a natureza da melhor fonte de nitrogênio a ser adotada na suplementação do caldo de cana.
- Otimizar as condições de aeração e de agitação, empregando planejamento experimental em biorreator.
- Estudar a influência do pH e da temperatura durante o processo de produção da goma.
- Estudar o processo de produção de goma utilizando batelada alimentada.
- Estudar mais detalhadamente o comportamento reológico da goma produzida.
- Avaliar o potencial de contaminação do meio empregando caldo de cana como matéria-prima.
- Determinar a melhor concentração de inóculo a ser utilizada no fermentador.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R.S.A. Efeito de alguns nutrientes na formação de goma xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris* LMI-3. Rio de Janeiro: UFRJ/Engenharia Química, 1991. 126p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1991.

ALVES, L. C. Obtenção e caracterização de biopolímero produzido por *Bradyrhizobium sp*. Rio de Janeiro: UFRJ/Engenharia Química, 1998, 102 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1998.

AMANULLAH, A., SATTI, S., NIENOW, A. W. Enhancing Xanthan Fermentations by Different Modes of Glucose Feeding. Biotechnology Progress, 1998, 14, 265 – 269.

ARGUELO-MORALES, M., RUSSELL, R. R. B., MONCHOIS, V. Isolation of an Active Catalytic Core of *Streptococcus downei* MFE28 GTF-I Glucosyltransferase. Journal of Bacteriology, v. 181, n. 7, p. 2290 – 2292, 1999.

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

ATKINSON, B., MAVITUNA, F. Biochemical engineering and biotechnology handbook. 2. ed., Basingstock: MacMillan, 1991.

BECKER, A., KATZEN, F., PÜHLER, A., IELPI, L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical / genetic perspective. Applied Microbiology Biotechnology, v. 50, p. 145 – 152. 1998.

BILANOVIC, D., GREEN, M. & SHELEF, G. Xanthan fermentation of citrus waste. Bioresource Technology, 48 (1994), 169 – 172.

BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A. Introdução à química de alimentos. 2. ed. São Paulo: Varela Ltda, 1989. Cap. 1. 223 p.

BOTELHO, M. L. R. Propriedades físico-químicas do exsudato de *Anacardium occidentale* L. para indústria de alimentos. Rio de Janeiro: UFRJ / Engenharia Química, 1999. 128 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999.

BRADBURY, J. F. Genus II XANTHOMONAS. In: Krieg, N. R., Holt, J. G. (Ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology. London: Williams & Wilkins, 1984. v. 1. p. 199 – 210.

BROCK, T. D., MADIGAN, M. T. Biology of microorganisms. 6. ed. New Jersey: Prentice-Hall Internacional Editions, 1991, 874 p.

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

CHHABRA, R.P. & RICHARDSON, J.F. – Non-Newtonian Flow in the Process Industries Fundamentals and Engineering Applications, Butterworth Heinemann, Great Britain, 436 p. (1999).

COLEGROVE, G.T. – Agricultural Applications of Microbial Polysaccharides. Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev. 22 (3) : 456 – 460, 1983.

COPLIN, D. L. & COOK, D. Molecular Genetics of Extracellular Polysaccharide Biosynthesis in Vascular Phytopathogenic Bacteria. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 3, n. 5, p. 271 – 279, 1990.

COUARRAZE, G. & GROSSIORD, J. L. Initiation à la rhéomètre technique et documentation. Paris, 1983. Rhéomètre à regime permanent – part IV, cap. 1.

COUSO, R. O., IELPI, L., DANKERT, M. A xanthan gum like polysaccharide from *Acetobacter xylinum*. Journal of General Microbiology, v. 133, p. 2123 – 2135, 1987.

DAVIDSON, I. H. Production of polysaccharide by *Xanthomonas campestris* in continuous culture. FEMS Microbiology Letters, v. 3, p. 347 – 349, 1978.

DOLS, M., REMAUD-SIMEON, M., WILLEMOT, R. M., VIGNON, M., MONSAN, P. Characterization of the Different Dextransucrase Activities Excreted in Glucose, Fructose, or Sucrose Medium by *Leuconostoc mesenteroides* Nrrl B-1299. Applied and Environmental Microbiology, v. 64, n. 4, p. 1298 – 1302, 1998.

DE VUYST, L.; VERMEIRE, A. Use of industrial medium components for xanthan production by *Xanthomonas campestris*. Applied Microbiology Biotechnology, v.42, p.187 – 191, 1994.

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, 1995.

ESGALHADO, M. E. L. M. The addition of organic acids to *Xanthomonas campestris* cultures; effects of sublethal organic acid stress on metabolism. Birmingham, England: The University of Birmingham, 1997. 183p. Tese (Doutorado) – The University Birmingham, Faculty Engineering, 1997.

FENTANES, E. G. Polisacárideos microbianos. In: RAMIREZ, R. Q., (Ed.), Prospectiva de la biotecnologia en México. México: Fundácion Javier Barros Sierra, 1985. p. 73 – 92.

FLORES, F., TORRES, L. G., GALINDO, E. Effect of the dissolved oxygen tension during cultivation of *X. campestris* on the production and quality of xanthan gum. Journal of Biotechnology, v. 34, p. 165 – 173, 1994.

GALINDO, E., TORRESTIANA, B., GARCIA-REJÓN, A. Rheological characterization of xanthan fermentation broths and their reconstituted solution. Bioprocess Engineering, v. 4, p. 113 – 118, 1989.

GALINDO, E. Engineering and microbiological aspects of the production of microbial polysaccharides: xanthan as a model. In: Proceedings of the International Symposium on Bioproducts Processing, p. 26 – 29, 1994.

GALINDO, E., SALCEDO, G., RAMÍREZ, M. E. Preservation of *Xanthomonas campestris* on agar slopes: effects on xanthan production. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 40, p. 634 – 637, 1994.

GARCÍA-OCHOA, F., SANTOS, V. E., CASAS, J. A., GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties – Research review paper, Biotechnology Advances 18 (2000), 549 – 579.

GARGALLO, L. G., RADIC, D. F., ALBUIN, E. S. et al. Propriedades hidrodinâmicas. In: Macromolécules en solucion. PNUD-UNESCO (CHI-84/006), Santiago, 1987. cap. IV, item 4.1, p. 92 – 106.

GARRET, R. H., GRISHAM, C. M. Biochemistry. Sanders College Publishing, 1997. cap. 10: Carbohydrates and cell surfaces.

GEREMIA, R. A. E., PETRONI, A., IELPI, L., HENRISSAT, B. Towards a Classification of Glycosiltransferases Based on Amino Acid Sequence Similarities: Prokaryotic a-Mannosyltransferases. Biochemistry Journal, v. 318, p. 133 – 138, 1996.

GLAZER, N., NIKAIDO, H. Microbial biotechnology – fundamentals of applied microbiology. 2. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995. 642 p.

GLICKSMAN, M. Gelling hydrocolloids in food product applications. In BLANSHANRD, J. M. V., MITCHELL, J. R. Polysaccharides in food. London: Butterworths, 1979. p. 185 – 204.

GODET, P. – Fermentation of Polysaccharide Gums. Process Biochem. 8 (1) : 33 – 34, 1973.

GOUGH, C. L., DOW, J. M., BARBER, C. E., et al. Cloning of two endoglucanase genes of *Xanthomonas campestris pv. campestris*: Analysis of the role of the major

endoglucanase in phatogenesis. The American Phytopathological Society, v. 1, n. 7, p. 275 – 281, 1988.

GRASS, M., LAPASIN, R., PRICL, S. A study of the rheological behavior of scleroglucan weak gel systems. Carbohydrate Polymers, v. 29, p. 169 – 181, 1996.

HACKING, A. J. Economic aspects of biotechnology. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 1986 p. 93 – 128.

HARADA, T., YOSHIMURA, T., HIDAKA, H. et al. Production of a new acidic polysaccharide, succinoglucan by *Alcaligenes faecalis var. myxogenes*. Agricultural Biological Chemistry, v. 29, n. 8, p. 757 – 762, 1965.

HARCUM, S. W., YOO, S. D. Xanthan gum production from waste sugar beet pulp, Bioresource Technology 70 (1999), 105 – 109; short communication.

HARDING, N. E., RAFFO, S., RAIMONDI, A., CLEARY, J. M., IELPI, L. Identification, Genetic and Biochemical Analysis of Genes Involved in Synthesis of Sugar Nucleotide Precursors of Xanthan Gum. Journal of General Microbiology, v. 139, p. 447 – 457, 1993.

HARDING, N. E., CLEARY, J. M., IELPI, L. Genetics and Biochemistry of Xanthan Gum Production by *Xanthomonas campestris*, L. In: HUI, Y. H., KHACHATOURIANS, G. G. Food Biotechnology Microorganisms, VCH. P. 495 – 514, 1994.

HASSLER, R. A., DOFERTY, D. H. Genetic engineering of polysaccharide structure: production of variants of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. Biotechnology Progress, v. 6, p. 182 – 187, 1990.

HOLT, John G. et al. (Ed.) Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p. p. 100.

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

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. – Structure of the Extracellular Polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Carbohydr. Res. 45 : 275 – 282, 1975.

JEANES, A.; PITTSLEY, J.E.; SENTI, F.R. – Polysaccharide B-1459 : A New Hydrocolloid Polyelectrolyte Produced from Glucose by Bacterial Fermentation. J. Appl. Polym. Sci. 5 (17) : 519 – 526, 1961.

KATSEN, F. D., FERREIRO, U., ODDO, C. G., IELMINI, M. V., BECKER, A., PUHLER, A., IELPI, L. *X. campestris pv. campestris* Gum Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence. Journal of Bacteriology, v. 180, n. 7, p. 1607 – 1617, 1998.

KAY, A., ISHINO, T., ARASHIDA, T. et al. Biosynthesis of curdlan from culture media containing ^{13}C-labeled glucose as carbon source. Carbohydrate Research, v. 240, p. 153 – 159, 1993.

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

KÖPLIN, R., ARNOLD, W., HÖTTE, B., SIMON, R., WANG, G. E., PÜHLER, A. Genetics of Xanthan Production in *X. campestris*: the *xan*A and *xan*B Genes are Involved In UDP-Glucose and GDP-Mannose Biosynthesis. Journal of Bacteriology, v. 174, n. 1, p. 191 – 199, 1992.

LIMA, M.A.G.A. – Obtenção e Caracterização de Xantanas Produzidas por Diferentes Linhagens de *Xanthomonas campestris pv. campestris*. Tese de doutorado – UFRJ. Escola de Química. Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 1999.

LO, Y.-M., YANG, S.-T., MIND, D. B. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. Applied Microbiology Biotechnology, v. 47, p. 689 – 694, 1997.

LOPES, L.M.A. – Caracterização Viscosimétrica de Misturas das Gomas Xantana e Guar. Tese de Mestrado. Instituto de Macromoléculas. Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMA / UFRJ), 1989.

LOPES, L., ANDRADE, C. T. Polímeros de origem microbiana: polissacarídeos bacterianos. Revista de Química Industrial, n. 703, p. 19 – 23, 1995.

LÓPEZ, M. J., VARGAS-GARCÍA, M. C., SUAREZ-ESTRELLA, F., MORENO, J. Properties of xanthan obtained from agricultural wastes acid hydrolysates. Journal of Food Engineering (2003).

MANO, E. B. Introdução a polímeros. 3. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1985. 111 p.

MARGARITIS, A.; PACE, G.W. - Microbial Polysaccharides In : Comprehensive Biotechnology ed. by M-Moo-Young. Pergamon Press, New York, Vol 3 : 1005 – 1044, 1985.

MARTINS, L., SÁ-CORREIA, I. Temperature Profiles of Gellan Gum Synthesis and Activities of Biosynthetic Enzymes. Biotechnology Applied Biochemistry, v. 20, p. 385 – 395, 1994.

MARZOCCA, M. P.; HARDING, N. E.; PETRONI, E. A. et al. Location and cloning of the ketal pyruvate transferase gene of *Xanthomonas campestris*. Journal of Bacteriology, v.173, n. 23, p. 7519 – 7524, 1991.

MORAINE, R. A., ROGOVIN, P. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. Biotechnology Bioengineering, VIII, p. 511 – 524, 1966.

MORRIS, V. J.; BROWNSEY, G. J.; RIDOUT, M. J. Acetan and related polysaccharides. Polymer News, v. 18, p. 294 – 300, 1993.

McNEELY, W. H., KANG, K. S. Xanthan and some other biosynthetic gums. In: Industrial gums. 2. ed. New York: Academic Press, 1973. Parte B. cap XXI. p. 473 – 498.

MULCHANDANI, A., LUONG, J. H. T., LEDUY, A. Batch Kinetics of microbial polysaccharide biosynthesis. Biotechnology and Bioengineering, v. 32, p. 639 – 646, 1988.

MURPHY, P. T., WHISTLER, R. L. Dextrans. In: Whistler, R. L., Bikales, J. N. (Ed)., Industrial gums – polysaccharides and their derivatives, 2. ed. New York: Academic Press, 1973. Parte B. Cap XXIII. p. 513.

NAKAJIMA, S., FUNAHASHI, H., YOSHIDA, T. Xanthan gum production in a fermentor with twin impellers. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 70, n. 6, p. 392 – 397, 1990.

NAKAMURA, K., TANAKA, Y. & SAKURAI, M. Dynamic mechanical properties of aqueous gellan solutions in the sol-gel transition region. Carbohydrate Polymers, v.30, p. 101 – 108, 1996.

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

NORTON, I. T., GOODALL, D. M., FRAGOU, S. A. et al. Mechanism and dynamics of conformational ordering in xanthan polysaccharide. Journal of Molecular Biology, v. 175, p. 371 – 394, 1984.

ODIAN, G. Principles of polymerization. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1991. 768p.

OLIVEIRA, S. H., OLIVEIRA, D. M. G., MARQUES, O. M., PALHA, M. A. P., LIMA, M. A. G. A. Influência de nutrientes na produção de xantana em meios de soro de leite por *Xanthomonas campestris pv. campestris*. Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2005.

PACE, G. W., RIGHELATO, R. C. Production of extracellular microbial polysaccharides. Advances in Biochemical Engineering, v. 15, p. 41 – 70, 1981.

PADILHA, F. F. Estudo da compartimentalização das enzimas para produção de biopolímeros por *Beijerinckia sp*. 7070. Pelotas, 1997. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

PICTON, L. MOCANU, G., MIHAI, D. et al. Chemically modified exopolysaccharide pullulans: physico-chemical characteristics of ionic derivatives. Carbohydrate Polymers, v. 28, p. 131 – 136, 1995.

PIERCE, L., PALLENT, J. L. Viscosity test for preliminary identification of strains of *Xanthomonas campestris*. Plant Disease, v. 74, p. 646 – 647, 1990.

PINCHES, A., PALLENT, L. J. Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media. Biotechnology and Bioengineering, v. 28, p. 1494 – 1496, 1986.

RAJESHWARI, K. V., PRAKASH, G., GHOSH, P. Improved process for xanthan production using modified media and intermittent feeding strategy. Letters in Applied Microbiology, v. 21, p. 173 – 175, 1995.

RAMÍREZ, M. E., FUCIKOVSKY, L., GARCÍA-JIMÉNEZ, F. et al. Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 29, p. 5 – 10, 1988.

ROGOVIN, S.P.; ANDERSON, R.F.; CADMUS, M.C. – Production of Polysaccharide with *Xanthomonas campestris*. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 3 (1) : 51 – 63, 1961.

ROLLER, S., DEA, I. C. M. Biotechnology in production and modification of biopolymers for foods. Critical Reviews in Biotechnology, v. 12, p. 261 – 277, 1992.

ROSEIRO, J. C., ESGALHADO, M. E., COLLAÇO, M. T. et al. Medium development for xanthan production. Process Biochemistry, v. 27, p. 167 – 175, 1992.

ROSEIRO, J. C., GÍRIO, F. M., KARÁ, A. et al. 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.

ROSS-MURPHY, S. B., REN, Y., ELLIS, P. R., SUTHERLAND, I. W. Dilute and semi-dilute solution properties of an exopolysaccharide from *Escherichia coli* strain S61. Carbohydrate Polymers 52 (2003), 189 – 195.

RUDIN, A. The elements of polymer science and engineering. Orlando: Academic Press, 1982.

SAEGUSA, T., HIGASHIMURA, T., ABE, A. Frontiers of macromolecular science. International Union of Pure and Applied Chemistry, p. 21 – 27, 1988.

SANDFORD, P. A. – Exocellular, Microbial Polysaccharides. Advances in Carbohydrate Chemical and Biochemistry 36 : 265 – 313, 1979.

SANDFORD, P. A., BAIRD, J. In: Aspinall GO, editor. The polysaccharides. Prague: Academia Press, 1983. pp. 470 – 3.

SEVERS, E. T. Introduction to rheology. In: Rheology of polymers, New York: Reinhold Publishing Corporation, 1962. Cap. 2. p. 8 – 21.

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.

SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRILL, T. C. Espectroscopia no infravermelho. In: Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois S. A., 1979. Cap. 3.

SKARACIS, G. N., KALOGIANNIS, S., IAKOVIDOU, G., Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses, Process Biochemistry 39 (2003) 249 – 256.

SLODKI, M.E.; CADMUS, M.C. – Production of Microbial Polysaccharides. Adv. Appl. Microbiol. 23 : 19 – 54, 1978.

SMITH, I. H., PACE, W. Recovery of microbial polysaccharides. Journal of Chemistry Technology & Biotechnology, v. 32, p. 119 – 129, 1982.

SOUW, P., DEMAIN, A.L. – Nutritional Studies on Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. Appl. Environ. Microbiol. 37 (6) : 1186 – 1192, 1979.

SU, L., JI, W. K., LAN, W. Z., DONG, X. Q. Chemical modification of xanthan gum to increase dissolution rate. Carbohydrate Polymers, 53 (2003), 497 – 499.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial surface polysaccharides – structure and function. International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology, v. 113, p. 187 – 231, 1988.

SUTHERLAND, I. W. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 163 p.

SUTHERLAND, I. W. Microbial Biopolymers from Agricultural Products: Production and Potencial. International Biodeterioration & Biodegradation, p. 249 – 261, 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, v. 11, p. 663 – 674, 2001.

TAGER, A. Physical Chemistry of Polymers, 2. ed. Moscow: Mir Publishers, 1978, 652 p.

TAIT, M. I., SUTHERLAND, I. W., CLARKE-STURMAN, A. J. Effects of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. Journal of General Microbiology, v. 132, p. 1483 – 1492, 1986.

THARANATHAN, R. N., PRASAD, M. S., SUDHAMANI, S. R. Isolation and characterization of an extracellular polysaccharide from *Pseudomonas caryophylli* CFR 1705. Carbohydrate Polymers 56 (2004), 423 – 427.

THONART, M., PAQUOD, M., HERMANS, L. et al. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and interfacial approach by zeta potencial measurement. Enzyme Microbiology Technology, v. 7, p. 235 – 238, 1985.

TORRESTIANA, B., FUCIKOVSKY, L., GALINDO, E. Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates. Letters in Applied Microbiology, v. 10, p. 81 – 83, 1990.

UMASANKAR, H., ANNADURAI, G., CHELLAPANDIAN, M. et al. Influence of nutrients on cell growth and xanthan production by *Xanthomonas campestris*. Bioprocess Engineering, v. 14, n. 6, p. 307 – 309, 1996.

VENDRUSCOLO, C. T., MOREIRA, A. N., DEL PINO, F. A. B. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através de inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia sp*. 7070, Ciênc. Tecnol. Alimentos, Campinas, 23(2): 300 – 305, maio-ago 2003.

VOJNOV, A. A., ZORREGUIETA, A., DOW, J. M., et al. Evidence for a role for the *gum*B and *gum*A gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. Microbiology, v. 144, p. 1487 – 1493, 1998.

WALTON, A. G., BLACKWELL, J. Biopolymers. New York: Academic Press, 1973. p 465 – 511.

WEISS, R. M., OLLIS, D. F. Extracellular microbial polysaccharides. I. Substrate, biomass, and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation. Biotechnology and Bioengineering, v. 22, p. 859 – 873, 1980.

WHISTLER, R. L., BeMILLER, J. N. Industrial gums, 3. ed. San Diego: Academic Press, 1993. 642 p.

YALPANI, M., SANDFORD, P. Commercial polysaccharides: recent trends and developments. In: Industrial polysaccharides – Progress in Biotecnology . Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1987, v. 3, p. 311 – 336.

ZAGALLO, A. C., WANG, C. H. Comparative glucose catabolism of *Xanthomonas* species. Journal of Bacteriology, v. 93, p. 970 – 975, 1967.

Google / história do plástico – www.cafebandeira.com.br/histplast (19/07/2005)

www.corpoclinico.com.br/artigos (artigos nutrologia – 2002/2003) (13/07/2005)

www.sinprors.org.br/paginaspessoais/layout2 (13/07/2005)

UNIJUI – UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE DO ESTADO DO RS
DBQ – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA E QUÍMICA
CURSO - QUÍMICA INDUSTRIAL DE ALIMENTOS
Biotecnologia de Alimentos.
Prof. Raul Vicenzi

www.seag.es.gov.br/cana (11/07/2005)

www.orplana.com.br/estatisticas (11/072005)

Anexo A
Certificado de Análise - Determinação de Nitrogênio

FIEMG
CIEMG
SESI
SENAI
IEL
Sistema FIEMG

Certificado de Análises
SENAI- CETAL/FAM
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
Centro Tecnológico de Alimentos- Fábio de Araújo Motta
LAMAM- Laboratório de Ensaios em Alimentos e Meio Ambiente
Rua Ernesto Vicentine nº 245 , Bairro : Roosevelt
CEP: 38401 -062
FONE : (34) 3228-5228/ 3228-5208
Email : cetal-lab@fiemg.com.br
C.N.P.J : 03.773.700.0014-21

LABORATÓRIO

X	FÍSICO-QUÍMICA
	MICROBIOLOGIA
	MEIO AMBIENTE

EMISSÃO Nº :	001/05
DATA :	09.05.2005

Laboratório credenciado pelo Instituto Mineiro de Agropecuária através da portaria nº 615 de 31 de outubro de 2003

Nº DO TERMO DE COLETA DE AMOSTRA
x

Nº DO PROTOCOLO NO LABORATÓRIO
164FQ/05

CLIENTE:	Vicelma Luiz Cardoso		
ENDEREÇO:	Av. João Naves de Avila, 2121		
CIDADE	Uberlândia	**ESTADO :**	MG
CNPJ:	429.623.406-44		
I.E.	-	**Nº REG. ESTAB. IMA:**	x
CONTATO :	Sandra/Vicelma		
TELEFONE :	3239-4292/3239-4189		
EMAIL :	-	**DELEGACIA:**	x

PRODUTO/AMOSTRA :	Caldo de cana bruto		
DATA FABRICAÇÃO :	x	**TEMPERATURA COLETA (º C) :**	Cliente não informou
DENOMINAÇÃO DE VENDA :	x	**RESPONSÁVEL COLETA:**	Cliente
MARCA :	x	**Nº LACRE AMOSTRA DE PROVA :**	x
RÓTULO IMA Nº :	x	**Nº LACRE AMOSTRA CONTRA PROVA :**	x
Nº DE UNIDADES COLETADAS	600 mL		
DATA DA COLETA :	Cliente não informou	**Nº LACRE AMOSTRA TESTEMUNHA:**	x
HORA COLETA (h) :	Cliente não informou	**TEMPERATURA DE RECEBIMENTO AMOSTRA (ºC)**	x

AMOSTRA ACEITA			x	**SIM**		**NÃO**
EMBALAGEM	x	**PRÓPRIA/ÍNTEGRA**		**ESTERIL**		
		PRÓPRIA/ALTERADA		**NÃO ESTERIL**		

FIEMG
CIEMG
SESI
SENAI
IEL

Sistema FIEMG

Certificado de Análises
SENAI- CETAL/FAM
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
Centro Tecnológico de Alimentos- Fábio de Araújo Motta
LAMAM- Laboratório de Ensaios em Alimentos e Meio Ambiente
Rua Ernesto Vicentine nº 245 , Bairro : Roosevelt
CEP: 38401 -062
FONE : (34) 3228-5228/ 3228-5208
Email : cetal-lab@fiemg.com.br
C.N.P.J : 03.773.700.0014-21

LABORATÓRIO

X	FÍSICO-QUÍMICA
	MICROBIOLOGIA
	MEIO AMBIENTE

EMISSÃO Nº : 001/05
DATA : 09.05.2005

Laboratório credenciado pelo Instituto Mineiro de Agropecuária através da portaria nº 615 de 31 de outubro de 2003

Nº DO TERMO DE COLETA DE AMOSTRA	Nº DO PROTOCOLO NO LABORATÓRIO
x	164FQ/05

ANÁLISES SOLICITADAS :		METODOLOGIA :
74	Nitrogênio Total (%)	Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater , 20th edition.1998. Pág. 4-99 a 4-126 –Método Kjeldahl
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

FIEMG
CIEMG
SESI
SENAI
IEL

Sistema FIEMG

Certificado de Análises
SENAI- CETAL/FAM
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
Centro Tecnológico de Alimentos- Fábio de Araújo Motta
LAMAM- Laboratório de Ensaios em Alimentos e Meio Ambiente
Rua Ernesto Vicentine nº 245 , Bairro : Roosevelt
CEP: 38401 -062
FONE : (34) 3228-5228/ 3228-5208
Email : cetal-lab@fiemg.com.br
C.N.P.J : 03.773.700.0014-21

LABORATÓRIO

X	FÍSICO-QUÍMICA
	MICROBIOLOGIA
	MEIO AMBIENTE

EMISSÃO Nº : 001/05
DATA : 09.05.2005

Laboratório credenciado pelo Instituto Mineiro de Agropecuária através da portaria nº 615 de 31 de outubro de 2003

Nº DO TERMO DE COLETA DE AMOSTRA
x

Nº DO PROTOCOLO NO LABORATÓRIO
164FQ/05

DATA INÍCIO DA ANÁLISE: 06.05.2005 — DATA TÉRMINO ANÁLISE: 09.05.2005

RESULTADO DAS ANÁLISES

ANÁLISES		PADRÃO MÍNIMO	PADRÃO MÁXIMO	RESULTADO	INCERTEZA DE MEDIÇÃO
74	Nitrogênio Total (%)	x	x	0,027	x
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	x	x	x	x
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	x	x	x	x
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	x	x	x	x
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	x	x	x	x
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	x	x	x	x
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	x	x	x	x
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	x	x	x	x
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	x	x	x	x
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	x	x	x	x
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	x	x	x	x
x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	x	x	x	x

A incerteza expandida (U) relatada, é baseada em uma incerteza padronizada combinada multiplicada por um fator de abrangência, fornecendo um nível de confiança de aproximadamente 95%.

CONCLUSÃO : xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

BASE INTERPRETATIVA :

RESOLUÇÃO : XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
COPAM : XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
PORTARIA : XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

OBSERVAÇÕES : OS RESULTADOS DESTA ANÁLISE TEM SIGNIFICADO RESTRITO E REFEREM-SE SOMENTE À AMOSTRA ANALISADA, NÃO PODENDO SER UTILIZADOS EM QUALQUER TIPO DE PROPAGANDA.

ASSINATURA ANALISTA

RESPONSÁVEL TÉCNICO
REGISTRO CRQ : CRQ-MG 02.407.189-2ª Região

UBERLÂNDIA, 09 de maio de 2005

3/3 Certificado e Formulario Lamam Rev 02

Apêndice B
Metodologia da Determinação do Fósforo Total

Apêndice B

METODOLOGIA DA DETERMINAÇÃO DO FÓSFORO TOTAL
(Método Colorimétrico por Redução com Ácido Ascórbico)

a) Reagente

- Persulfato de amônio cristalino $(NH_4)_2S_2O_8$

b) Reagente Combinado

- Dissolvia-se 0,13 g de tartarato de potássio e antimônio ($K(SbO)C_4H_4O_6.1/2H_2O$) em balão volumétrico de 1L contendo cerca de 700 mL de água. Adicionava-se 5,6 g de molibdato de amônio $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) e agitava-se até dissolver. Adicionava-se com cuidado 70 mL de ácido sulfúrico concentrado (d = 1,84) e agitava-se lentamente o conteúdo do balão. Esfriava-se a solução e avolumava-se para a marca de 1 L com água. A solução era estável por pelo menos um ano, se estocada em frasco de polietileno e protegida do calor (solução-mistura).
- Dissolvia-se 0,50 g de ácido ascórbico em 100 mL da solução-mistura descrita acima. Este reagente era estável por uma semana, se estocado a 4^oC.
- Solução indicadora de fenolftaleína (5g/L)
- Dissolvia-se 0,5 g de fenolftaleína em uma mistura de 50 mL de álcool etílico ou isopropílico e 50 mL de água.
- Solução-estoque padrão de fósforo (1mL ≅ 0,05 mg de fósforo)
- Dissolvia-se em água 0,297 g de fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4), seco por 1 h em estufa a 105 ^oC, e avolumava-se para 1 L de água.
- Solução-padrão de fósforo (1mL ≅ 0,025 mg de fósforo)
- Diluía-se 500 mL da solução-estoque para exatamente 1 L com água.
- Solução-padrão de fósforo (1mL ≅ 0,0025 mg de fósforo)
- Diluía-se 50 mL da solução-estoque para exatamente 1 L com água.
- Solução de hidróxido de sódio (40 g/L)

- Dissolvia-se 20 g de hidróxido de sódio (NaOH) em cerca de 400 mL de água. Esfriava-se a solução para a temperatura ambiente e diluía-se a 500 mL com água.
- Ácido sulfúrico (31% v/v)
- Lentamente adicionava-se 310 mL de ácido sulfúrico concentrado (d = 1,84) a cerca de 600 mL de água. Esfriava-se a solução e avolumava-se a 1 L com água. A adição de ácido sulfúrico devia ser sob refrigeração.

c) Ensaio

Calibração

- Pipetava-se 0 mL, 1 mL, 2 mL, 4 mL, 7 mL, 10 mL e 15 mL de solução-padrão de fósforo (1mL = 0,0025 mg de fósforo) em uma série de frascos erlenmeyer de 125 mL; completava-se para 50 mL com água a fim de preparar padrões contendo 0 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,35 mg/L, 0,5 mg/L e 0,75 mg/L de fósforo.
- Adicionava-se 10 mL do reagente combinado em cada padrão e agitava-se para misturar.
- Após um tempo mínimo de 10 minutos e máximo de 30 minutos, media-se a absorbância de cada solução a 880 nm em células de 20 mm no espectrofotômetro usando a solução-padrão zero para ajustar o instrumento no zero de absorbância.
- Traçava-se a curva de calibração construindo a curva concentração de fósforo mg/L (ppm) em ordenadas e absorbância em abscissas. A curva devia passar no ponto de origem (Lei de Beer).

d) Fósforo Total

- Pipetava-se um volume de amostra com teor estimado de no máximo 25 μg de fósforo hidrossolúvel + fósforo ortofosfato, em um frasco erlenmeyer de 125 mL. Adicionava-se, em seguida, 0,4 g de persulfato de amônio.
- Adicionava-se à amostra 1 mL de H_2SO_4 (31% v/v), algumas pérolas de vidro e aquecia-se em chapa por, no mínimo de 30 minutos. Adicionava-se água durante a ebulição, a fim de manter o volume entre 10 mL e 50 mL. Permitia-se o decréscimo de volume para 10 mL até o fim da ebulição, mas não a secura completa, ou que a amostra ficasse densa com fumos brancos de SO_3.

- Adicionava-se gotas de solução indicadora de fenolftaleína à amostra fria, ajustando a coloração levemente rósea, por adição de solução de NaOH. Usualmente é requerido um volume de 11,2 mL. Esta retornava a incolor com uma gota de H_2SO_4 (31% v/v).
- Esfriava-se a amostra à temperatura de aproximadamente 30°C. Transferia-se quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL e avolumava-se com água.
- Adicionava-se 10 mL de reagente combinado à amostra e misturava-se completamente com agitação moderada.
- Após um tempo mínimo de 10 minutos e máximo de 30 minutos, media-se a absorbância da cor azul a 880 nm com um espectrofotômetro, usando como branco 50 mL de água reagente, tratada similarmente ao procedimento para a amostra.
- Determinava-se a concentração de fósforo através da curva de calibração.

A Tabela B.1 ilustra os resultados de uma curva de calibração da análise de fósforo realizada durante este trabalho.

Tabela B.1 - Resultados da curva de calibrarão da análise de fósforo.

C (mg/L)	0	0,05	0,1	0,2	0,35	0,5	0,75
ABS (nm)	0,000	0,028	0,059	0,115	0,212	0,298	0,449

Os valores de fósforo total foram calculados a partir da equação da reta exposta na Figura B.1. A equação é a seguinte:

$$C = (0{,}00246 + 1{,}6648*ABS)*D \qquad (B.1)$$

Onde: C = Fósforo total (mg/L);

ABS = Valor da absorbância lida no espectrofotômetro (nm);

D = Diluição da amostra.

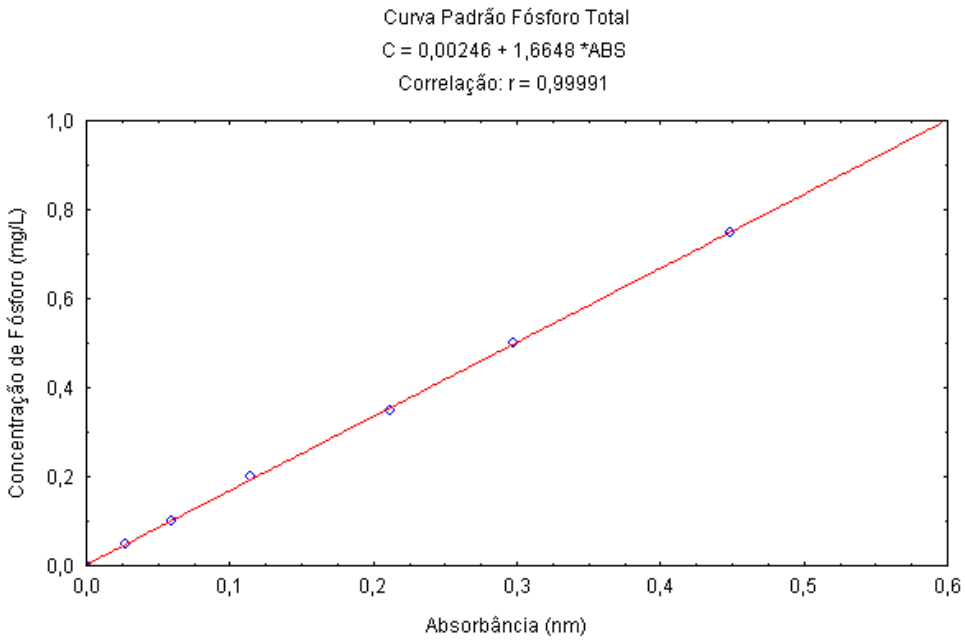


Figura B.1 - Curva de calibração para o fósforo total.

Apêndice C
Valores preditos x Resíduos das Respostas analisadas para ensaios no fermentador

Apêndice C

As Figuras C.1 a C.5 mostram os valores preditos x resíduos para as respostas analisadas no quarto planejamento experimental.

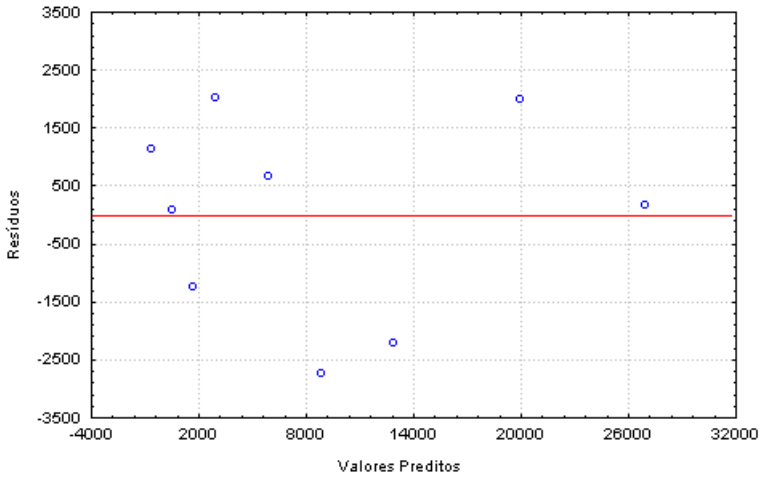


Figura C.1 – Representa valores preditos x resíduos para a viscosidade absoluta do mosto fermentado quando os experimentos foram realizados no reator.

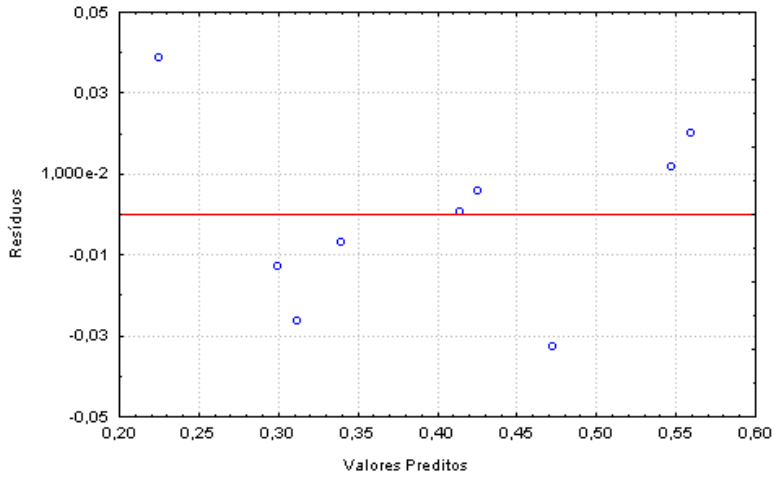


Figura C.2 – Representa valores preditos x resíduos para a conversão de substrato a produto quando os experimentos foram realizados no reator.

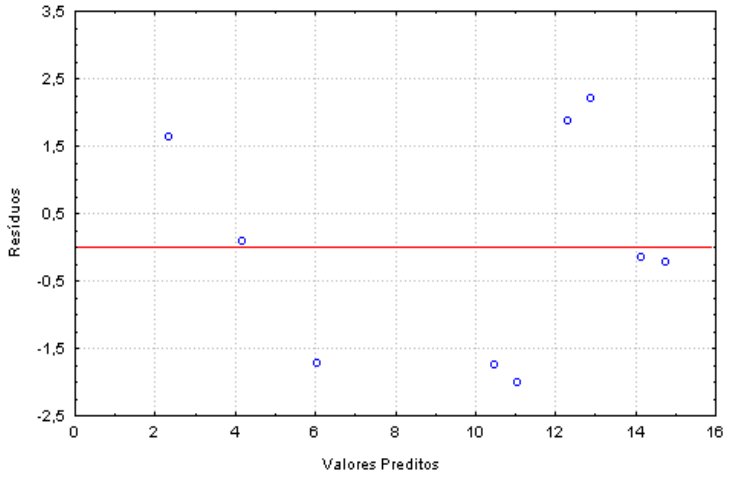


Figura C.3 – Representa valores preditos x resíduos para a concentração de goma quando os experimentos foram realizados no reator.

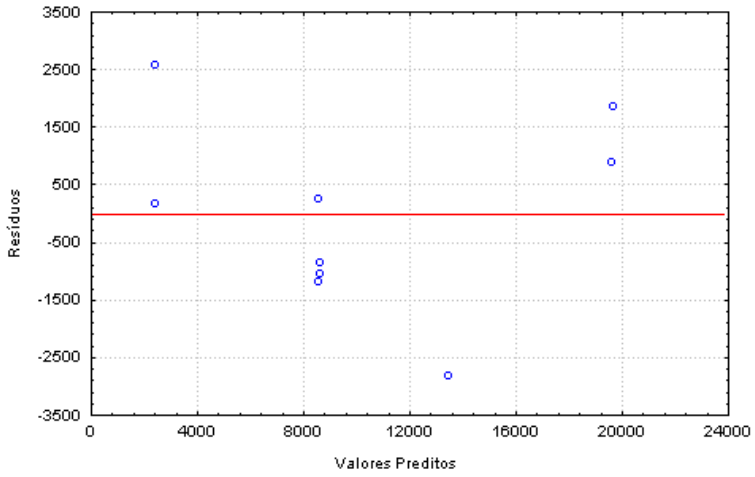


Figura C.4 – Representa valores preditos x resíduos para a viscosidade da solução 1% da goma quando os experimentos foram realizados no reator.

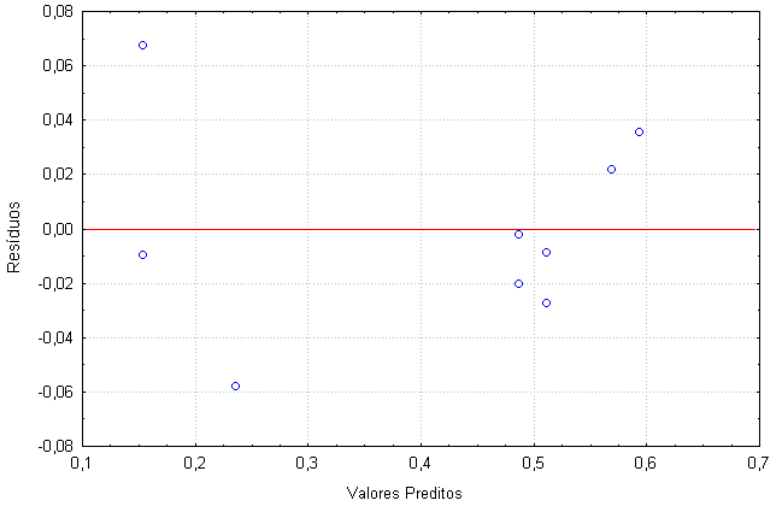


Figura C.5 – Representa valores preditos x resíduos para a produtividade quando os experimentos foram realizados no reator.