



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



Otimização da Produção e Caracterização de Goma Xantana Empregando Caldo de Cana

Doutoranda: Sandra Faria

Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Vicelma Luiz Cardoso (UFU)

Prof^a. Dr^a. Francisca Pessoa de França (UFRJ)

Uberlândia, Setembro de 2009.



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



Otimização da Produção e Caracterização de Goma Xantana Empregando Caldo de Cana

Autora: Sandra Faria
Engenheira Química

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

Uberlândia, 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F224o Faria, Sandra, 1971-
Otimização da produção e caracterização de goma xantana empregando
caldo de cana [manuscrito] / Sandra Faria. - 2009.
144 f. : il.

Orientadoras: Vicelma Luiz Cardoso e Francisca Pessoa de França.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química.
Inclui bibliografia.

1. Biopolímeros - Teses. 2. Cana-de-açúcar - Teses. I. Cardoso, Vicelma
Luiz. II. França, Francisca Pessoa de. III. Universidade Federal de Uber-
lândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 577.11

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 18/09/2009.

BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª. Dr.ª. Vicelma Luiz Cardoso
Orientadora (PPG-EQ/FEQ-UFU)



Prof.ª. Dr.ª. Francisca Pessoa de França
Co-Orientadora (Escola de Química/UFRJ)



Prof.ª. Dr.ª. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz
Depto de Bioquímica e Biologia Molecular
(PPG - Centro Politécnico/UFPR)



Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández Terrones
(PPG-IQ/UFU)



Prof.ª. Dr.ª. Miriam Maria de Resende
(PPG-EQ/FEQ-UFU)

De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre a começar...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto, devemos fazer da interrupção um caminho novo...
Fazer da queda um passo de dança...
Do medo uma escada...
Do sonho uma ponte...
Da procura um encontro...
E assim terá valido a pena".
Fernando Sabino

Apreendi com as primaveras a deixar-me cortar e a voltar sempre inteira...
Cecília Meireles

CADA UM QUE PASSA

Antoine de Saint-Exupéry

Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho
pois cada pessoa é única
e nenhuma substitui a outra.

Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho,
mas não vai só nem nos deixa sós.

Leva um pouco de nós,
deixa um pouco de si mesmo.

Há os que levam muito,
mas há os que não levam nada.

Essa é a maior responsabilidade de nossa vida
e a prova de que duas almas
não se encontram por acaso.

Agradecimentos

A conquista do título de Doutor em Engenharia vem acompanhada de sentimentos bastante distintos e incomuns, próprios àqueles que percorrem tal trajetória. Portanto, para vencer essa jornada a qual somos impulsionados pela senda científica, buscamos respostas, explicações, num contexto regado de certezas e dúvidas, 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 avós Francelino José de Faria (*in memoriam*) e Eurípedes Faria (*in memoriam*), pelo incentivo permanente à minha carreira.

À Prof^a Vicelma Luiz Cardoso, pela perseverança demonstrada ao longo dos anos, suavizando as dificuldades com equilíbrio para que nosso encerramento fosse *sublime*.

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

À Prof^a Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz, do Depto de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, agradeço pela execução de análises fundamentais para elucidar as características da goma produzida. Sua participação permitiu uma conclusão diferenciada para o tema desenvolvido.

À Prof^a Miriam Maria Resende, compartilho a concretização da tese.

À Prof^a Márcia Gonçalves Coelho, pela sabedoria e intelectualidade partilhada nos momentos de reflexão interna rumo ao crescimento pessoal.

Ao Prof. Eloízio Júlio Ribeiro, pelo crédito e incentivo essenciais no dia-a-dia.

Ao Prof. Ubirajara, pelas valiosas correções e sugestões no Exame de Qualificação.

Ao Prof. Euclides, pelas sugestões ponderadas nas bancas das quais fez parte.

Ao Engenheiro Édio José Alves pelas contribuições e dicas preciosas quando o problema era Informática.

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

Ao Prof. Ricardo Reis Soares e seu aluno de doutorado Leandro Gustavo da Silva, pela liberação do equipamento e pela execução dos espectros FTIR das amostras de xantana.

A todos os professores da FEQUI (Faculdade de Engenharia Química - UFU) que muito contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos funcionários da FEQUI: Zuleide, Cleo, Roberta, Anísio, Cleide, José Maria Tiago, 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.

Aos Srs. Artur Lourenço Borges e Ronaldo Sandre, pela gentileza da doação da matéria-prima utilizada nesta pesquisa.

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

Aos professores do Instituto de Química da UFU, especialmente: Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Sérgio Antônio L. de Moraes, Daniel Alves Cerqueira, Silvana Guilardi, Guimes Rodrigues Filho, Reinaldo Ruggiero, pela realização e interpretação de análises químicas importantes para este trabalho.

Aos companheiros de laboratório: Elizângela, Flávia, Paula, Christiane, Thálita, Carla, Maurielem, Marcelo, Rafael, Patrícia, pela convivência saudável e surpreendente. Cada um de vocês abrandou a rotina tornando-a mais leve.

À Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, pela obtenção de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

À CAPES, pelo apoio financeiro através do Projeto Procad.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de doutorado.

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, "meu porto seguro".

Índice

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 – Introdução a Biopolímeros	5
2.2 – Cana-de-açúcar	8
2.3 – Gomas oriundas de algas e de plantas	9
2.3.1 – Gomas oriundas de algas	9
2.3.2 – Gomas oriundas de plantas	9
2.4 – Gomas de origem microbiana	10
2.4.1 – Goma Xantana	16
2.5 – Microrganismos Produtores de Goma Xantana	20
2.6 – Classificação e características dos mostos	23
2.7 – Processo Fermentativo	23
2.7.1 – Cinética do processo fermentativo	23
2.7.1.1 – Modelagem matemática de processos fermentativos	24
2.7.1.2 – Modelos fenomenológicos	25
2.7.2 – Condições de produção da Goma Xantana	27
2.7.3 – Recuperação e Purificação da Goma Xantana	34
2.8 – Reologia de Compostos Poliméricos	35
2.9 – Termogravimetria	38
2.9.1 – Introdução: Origens e Fundamentos	38
2.9.2 – Termobalanças Modernas	39
2.9.3 – Fatores que afetam as Curvas TG	40

2.9.4 – Termogravimetria Derivada	40
2.9.4.1 – Vantagens da Termogravimetria Derivada	41
2.9.4.2 – Aplicações da termogravimetria	41
2.9.5 – Análise Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	42
2.9.5.1 – Introdução	42
2.9.5.2 – Fatores que afetam as curvas DTA	43
2.9.5.3 – Aplicação da Análise Térmica Diferencial	43
2.9.5.4 – Aplicações da Análise Térmica em Química	45
2.9.6 – Diferenças entre DTA e DSC	45
2.10 – Caracterização Estrutural por Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR), ¹³ C-RMN e Análise Quimiométrica	46
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 – Microrganismo e Meios de Manutenção	51
3.2 – Matéria-Prima	52
3.3 – Composição dos Meios de Produção para os testes preliminares	52
3.4 – Planejamentos Experimentais	52
3.5 – Determinação Quantitativa de Nitrogênio e Fósforo no Caldo de Cana Bruto	55
3.6 – Produção de Goma Xantana em Fermentador	56
3.6.1 – Determinação dos Parâmetros Cinéticos	58
3.6.1.1 – Modelagem da Produção de Goma Xantana: Identificação de Parâmetros e Constantes	59
3.7 – Determinação do Coeficiente de Transferência de Oxigênio - K _{La}	59
3.8 – Determinação da Biomassa Por Massa Seca	60
3.9 – Determinação Quantitativa da Sacarose	60
3.10 – Recuperação e Purificação da Goma	60
3.11 – Avaliação do Comportamento Reológico	61
3.11.1 – Preparo das Soluções de Goma Xantana para Análise Reológica	62
3.11.2 – Determinação da viscosidade intrínseca das amostras de goma xantana	62

3.12 – Determinação do conteúdo de açúcar total do produto	63
3.12.1 – Determinação da composição de açúcares neutros	63
3.12.2 – Determinação de açúcares ácidos	64
3.13 – Análise por cromatografia de exclusão estérica de alta pressão e determinação da massa molecular	64
3.14 – Análises Térmicas (TGA/DTA)	65
3.15 – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	65
3.16 – Determinação por RMN ^1H	65
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
4.1 – Testes Preliminares	67
4.2 – Análise do 1º Planejamento Experimental	68
4.3 – Análise do 2º Planejamento Experimental	80
4.4 – Análise Cinética da Condição Otimizada	88
4.4.1 – Determinação dos Parâmetros Cinéticos via Modelagem Matemática	89
4.5 – Caracterização do Produto na Condição Otimizada	91
4.5.1 – Determinação da Composição Monossacarídica	91
4.5.1.1 – Análise por Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão e Determinação da Massa Molecular	93
4.5.2 – Análise Espectroscópica (FT-IR)	95
4.5.3 – Comportamento Reológico das Soluções de Xantana a 0,75% (m/v)	101
4.5.3.1 – Determinação da viscosidade intrínseca da goma xantana	105
4.5.4 – Avaliação Térmica da Xantana Comercial e da Xantana Obtida em Condições Otimizadas (TGA-DTA)	108
4.5.5 – Caracterização Espectroscópica por Ressonância Magnética Nuclear de Próton	111
4.6 – Produção de Goma Xantana Utilizando Caldo de Cana Hidrolisado por Invertase	114
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	117
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Unidade estrutural repetitiva da goma xantana.....	2
Figura 2.1 -	Estrutura química da dextrana.....	11
Figura 2.2 -	Estrutura química da gelana.....	12
Figura 2.3 -	Estrutura química da curdlana.....	12
Figura 2.4 -	Estrutura química da pululana.....	13
Figura 2.5 -	Estrutura química da escleroglucana.....	14
Figura 2.6 -	(A) Via Entner-Doudoroff; (B) Ciclo do ácido tricarboxílico.....	17
Figura 2.7 -	Reconstrução metabólica descrita para elucidar a assimilação do carboidrato por <i>Xanthomonas campestris</i> , incluindo intermediários fosforilados, precursores da xantana, polimerização das unidades repetitivas, secreção do EPS.....	18
Figura 2.8 -	Modelo para a biossíntese da goma xantana por <i>Xanthomonas campestris</i>	19
Figura 2.9 -	Aspecto da cultura de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	20
Figura 2.10 -	Lesão causada por <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> em folhas de couve.....	21
Figura 2.11 -	Podridão negra causada por <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> em repolho.....	22
Figura 2.12 -	Classificação dos fluidos de acordo com o seu comportamento reológico.....	36
Figura 2.13 -	Espectro FTIR de: (1) Xantana; (2) Xantana esterificada com AC – Acryloyl chloride (condições da reação: T = 2 – 4°C; t _r = 24 h).....	48
Figura 2.14 -	Perfil da resolução do espectro ¹ H-RMN da xantana em diferentes temperaturas (C _p = 2,92 g.L ⁻¹ em D ₂ O – acetato de sódio 3x10 ⁻³ M).....	49
Figura 2.15 -	Espectro RMN comparativo da <i>performance</i> da xantana em D ₂ O: (a) ¹ H-RMN líquido (C _p = 2,92 g.L ⁻¹ , T = 85°C, D ₁ = 30 s); (b) ¹ H HRMAS (T = 25°C, D ₁ = 30 s).....	50
Figura 3.1 -	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459.....	51
Figura 3.2 -	Forma apresentada pela lâmina quando visualizada por meio de observação microscópica.....	57
Figura 3.3 -	Esquema simplificado do procedimento analítico para monitoramento das amostras após retiradas do fermentador.....	57
Figura 3.4 -	Formato apresentado pela goma momentos após sua precipitação.....	61
Figura 4.1 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a Concentração de Goma em função de X ₁ e X ₂	71
Figura 4.2 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a Concentração de Goma em função de X ₁ e X ₃	72

Figura 4.3 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a Concentração de Goma em função de X_2 e X_3	72
Figura 4.4 -	Superfície de resposta e curva de contorno para $Y_{P/S}$ em função de X_1 e X_2 ..	74
Figura 4.5 -	Superfície de resposta e curva de contorno para $Y_{P/S}$ em função de X_1 e X_3 ..	74
Figura 4.6 -	Superfície de resposta e curva de contorno para $Y_{P/S}$ em função de X_2 e X_3 ..	75
Figura 4.7 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a Viscosidade da Goma (solução 1%) em função de X_1 e X_2	77
Figura 4.8 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a Viscosidade da Goma (solução 1%) em função de X_1 e X_3	78
Figura 4.9 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a Viscosidade da Goma (solução 1%) em função de X_2 e X_3	78
Figura 4.10 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a Concentração de Goma em função de X_4 e X_5	82
Figura 4.11 -	Superfície de resposta e curva de contorno para $Y_{P/S}$ em função de X_4 e X_5 ...	83
Figura 4.12 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a Viscosidade da Goma (solução 1%) em função de X_4 e X_5	85
Figura 4.13 -	Superfície de resposta e curva de contorno para o Coeficiente de Transferência de Oxigênio (K_La) em função de X_4 e X_5	86
Figura 4.14 -	Transferência de Oxigênio em função do tempo para diferentes taxas de aeração (0,25; 0,50 e 0,75 vvm) e velocidades de agitação (500; 750 e 1000 rpm).....	87
Figura 4.15 -	Perfil das concentrações celular (■), sacarose (▲) e goma xantana (★) na condição otimizada. Símbolos representam dados experimentais; linhas representam o modelo de Weiss & Ollis (1980).....	89
Figura 4.16 -	Estrutura química da xantana.....	91
Figura 4.17 -	Cromatograma dos produtos de hidrólise da amostra de xantana analisados por cromatografia líquido-gasosa na forma de acetatos de alditol.....	93
Figura 4.18 -	Perfil de eluição por HPSEC utilizando detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz (MALLS - mostrado o ângulo de 90°).....	94
Figura 4.19 -	Perfil de eluição por HPSEC para (EPS) produzido por <i>Klebsiella oxytoca</i>	95
Figura 4.20 -	Espectro FT-IR das amostras de xantana em <i>pellets</i> KBr: comercial, condição otimizada, obtida a partir do caldo de cana hidrolisado.....	96
Figura 4.21 -	Efeito do tamanho do anel sobre a frequência de absorção da ligação C=O em compostos cíclicos.....	99
Figura 4.22 -	Curvas de Viscosidade Aparente, Tensão Cisalhante em função da Taxa de Deformação considerando a xantana comercial (solução 0,75%).....	102

Figura 4.23 -	Curvas de Viscosidade Aparente, Tensão Cisalhante em função da Taxa de Deformação considerando a xantana em condições otimizadas (solução 0,75%).	102
Figura 4.24 -	Viscosidade da solução de goma xantana em água (■: 0,1 %; ▲: 0,3 %; ●: 0,5 %) em função da taxa de deformação à pH 7 e T = 20°C.	103
Figura 4.25 -	Curvas de Viscosidade Aparente em função da Taxa de Deformação para a xantana em diferentes Temperaturas.	104
Figura 4.26 -	Representa a regressão linear dos dados η_{sp}/C x C para obtenção da viscosidade intrínseca da goma xantana: comercial e nas condições otimizadas.	107
Figura 4.27 -	Curvas TGA-DTA simultâneas para xantana comercial; razão de aquecimento igual a 20°C.min ⁻¹ ; atmosfera de nitrogênio 30 mL.min ⁻¹ . (TGA — curva azul; dTGA — curva vermelha; DTA — curva preta).	108
Figura 4.28 -	Curvas TGA-DTA simultâneas para xantana nas condições otimizadas; razão de aquecimento igual a 20°C.min ⁻¹ ; atmosfera de nitrogênio 30 mL.min ⁻¹ . (TGA — curva azul; dTGA — curva vermelha; DTA — curva preta).	109
Figura 4.29 -	Curvas Termogravimétricas: (A) xantana/amido de milho, e (B) xantana/amido de trigo medidos a uma razão de aquecimento 10°C.min ⁻¹ sob atmosfera inerte de nitrogênio.	111
Figura 4.30 -	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (¹ H-RMN) para a amostra de xantana (EPS) nas condições otimizadas, obtido em água deuterada (D ₂ O) a 70°C. 1- Prótons α -anoméricos de hexoses ou pentoses (4,9 ppm); (2,3)- Prótons de carbonos β de hexoses ou pentoses (4,6; 4,7 ppm); 4- Prótons de carbonos conectados a oxigênio (4,3 ppm); (5,6,7)- Prótons de ácidos glucurônicos e urônicos (1,8; 2,3; 2,5 ppm); 8- Próton de H6 de ramnose (1,3 ppm); (7,8)- Pode representar prótons pertencentes ao grupamento acetila (1,3; 1,8 ppm).	112
Figura 4.31 -	Detalhe da estrutura química do constituinte básico da acemanana isolada da FP de <i>Aloe barbadensis</i> , com as indicações dos respectivos valores de deslocamentos químicos (¹³ C-RMN, 9,4 Tesla).	113
Figura 4.32 -	Perfil das concentrações celular (■), sacarose (▲) e goma xantana (★) na condição hidrolisada. Símbolos representam dados experimentais; linhas representam o modelo de Weiss & Ollis (1980). Os parâmetros para ajuste dos dados experimentais: ($X_{max} = 7,638$ [g/L]; $\alpha = 1,984$ [gS/gX]; $\beta = 0,183$ [gS(gX.h) ⁻¹]; $m = 1,092 \cdot 10^{-4}$ [gP/gX]; $\lambda = 9,697 \cdot 10^{-2}$ [gS(gX.h) ⁻¹]). Figuras A e B obtidas a partir da velocidade específica de crescimento máxima (A $\rightarrow \mu_{máx.} = 0,473$ h ⁻¹); (B $\rightarrow \mu_{exp.} = 0,824$ h ⁻¹).	115

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.....	16
Tabela 2.5 -	Funções da goma xantana e aplicações típicas em alimentos.....	19
Tabela 2.6 -	Composição percentual média de polissacarídeos produzidos pela bactéria <i>Xanthomonas</i> (adaptado de Kennedy & Bradshaw, 1984).....	32
Tabela 2.7 -	Características químicas das amostras ^a de xantana.....	32
Tabela 2.8 -	Variação de entalpia para fenômenos físicos e químicos.....	44
Tabela 2.9 -	Tipos de estudos, substâncias empregadas na Análise Térmica.....	45
Tabela 3.1 -	Variáveis estudadas e seus níveis no primeiro planejamento experimental.....	53
Tabela 3.2 -	Matriz planejamento experimental para valores reais e codificados das variáveis X_1 , X_2 e X_3	53
Tabela 3.3 -	Variáveis estudadas e seus níveis no segundo planejamento experimental.....	54
Tabela 3.4 -	Matriz planejamento experimental para valores reais e codificados das variáveis X_4 , X_5	55
Tabela 4.1 -	Variáveis independentes X_1 , X_2 e X_3 e suas respostas C_G , $Y_{P/S}$, $\mu_{1\%}$	69
Tabela 4.2 -	Regressão múltipla para a Concentração de Goma considerando o 1º planejamento.....	70
Tabela 4.3 -	Regressão múltipla para a Conversão $Y_{P/S}$ considerando o 1º planejamento...	73
Tabela 4.4 -	Regressão múltipla para a Viscosidade da Goma (solução 1%) considerando o 1º planejamento.....	75
Tabela 4.5 -	Limites inferiores e superiores dos intervalos representativos das variáveis X_1 , X_2 e X_3 , dentro da região de otimização, obtidos a partir das curvas de contornos $(X_1) \times (X_2)$, $(X_1) \times (X_3)$ e $(X_2) \times (X_3)$ para cada resposta.....	79
Tabela 4.6 -	Variáveis independentes do 2º planejamento, X_4 e X_5 e suas respostas C_G , $Y_{P/S}$, $\mu_{1\%}$	80
Tabela 4.7 -	Regressão múltipla para a Concentração de Goma considerando o 2º planejamento.....	81
Tabela 4.8 -	Regressão múltipla para a Conversão $Y_{P/S}$ considerando o 2º planejamento...	83
Tabela 4.9 -	Regressão múltipla para a Viscosidade da Goma (solução 1%) considerando o 2º planejamento.....	84

Tabela 4.10 -	Respostas estudadas na melhor condição experimental comparadas ao modelo estatístico aplicado para diferentes planejamentos.....	88
Tabela 4.11 -	Parâmetros cinéticos determinados na condição otimizada comparados com a literatura.....	90
Tabela 4.12 -	Razões molares dos principais constituintes da xantana para diferentes linhagens de <i>Xanthomonas</i>	92
Tabela 4.13 -	Valores para K e n em várias soluções combinando goma xantana/WPI (<i>whey protein isolate</i>) a pH 7 e T = 20°C (Modelo de Ostwald-de-Waele).....	104
Tabela 4.14 -	Efeito da concentração de goma xantana nos parâmetros do modelo “power-law” e na viscosidade aparente (η_a) a 100 s ⁻¹ da mistura* (5% w/w) de goma xantana-amido de arroz.....	106
Tabela 4.15 -	Valores de viscosidade intrínseca para a goma xantana, goma <i>locust bean</i> (LBG), e seus <i>blends</i> com adição de três sais em concentrações selecionadas.....	107
Tabela 4.16 -	Dados termogravimétricos (TGA e DTG) de polissacarídeos naturais e modificados.....	110

RESUMO

A produção de goma xantana e a sua caracterização estrutural decorrente das condições otimizadas através de planejamentos experimentais foram os principais objetivos desse estudo. Vários relatos apontam o caldo de cana-de-açúcar como excelente matéria-prima para a elaboração de meios fermentescíveis, sob a ação de diferentes espécies microbianas, (bactérias, leveduras, fungos) na biossíntese de produtos de interesse comercial. Nesse contexto, frente à oferta de cana nos cultivos do Brasil, esta pesquisa foi motivada ao desenvolvimento de goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 utilizando caldo de cana diluído para experimentos com duração de 24 h, através de uma seqüência definida por duas matrizes, construídas a partir do Software *Statistica*. A primeira delas, selecionada para verificar os efeitos das concentrações de sacarose (12,13 a 37,87 g.L⁻¹), extrato de levedura (máximo de 6,0 g.L⁻¹) e nitrato de amônio (máximo de 1,714 g.L⁻¹) nas respostas que indicam a *performance* do processo (concentração de goma, conversão de substrato à produto ($Y_{P/S}$), e viscosidade aparente da xantana em solução). A segunda matriz complementar à primeira, consolidou as interações advindas da velocidade de agitação (500 a 1000 rpm) e da taxa de aeração (0,25 a 0,75 vvm) no comportamento não-newtoniano do sistema. Após interpretação das respostas, considerando as curvas de contorno geradas pelos modelos ajustados, os custos envolvidos na biotransformação, selecionou-se esse conjunto de variáveis (27,0 g.L⁻¹ de sacarose; 1,8 g.L⁻¹ de extrato de levedura; 0,8 g.L⁻¹ NH₄NO₃; 750 rpm e 0,35 vvm) para prosseguir à predição dos parâmetros cinéticos do modelo de Weiss & Ollis (1980), por ajuste dos dados experimentais (crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto) e, à caracterização da estrutura da goma xantana. Esse ensaio promoveu 16,40 g.L⁻¹ de goma, conversão $Y_{P/S}$ igual a 0,61 g.g⁻¹ e viscosidade da solução 1% (m/v) 23000,0 cP a 0,75 s⁻¹. A massa molecular (M_w) e o teor de açúcar total obtidos para a xantana, considerando a polimerização conduzida no ponto ótimo foram 4,172*10⁶ Da e 85,3%, respectivamente, assim distribuídos, em glucose 43%, manose 32% e ácido glucurônico 24% na proporção 1,79:1,33:1. O espectro de infravermelho registrou grupos marcantes na elucidação do composto e, quando as amostras, comercial e otimizada, sujeitas à comparação, emitiram suas bandas em regiões de comprimento de ondas equivalentes, a similaridade das xantanas se confirmou. A goma, ainda, foi avaliada pela técnica da Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN ¹H) sendo, portanto, identificada em último estágio por deslocamentos químicos (δ ppm) comuns ao núcleo de hidrogênio como a presença de prótons α -anoméricos e prótons de carbonos β de hexoses ou pentoses, prótons de carbonos conectados a oxigênio, próton de H6 de ramnose e prótons de ácidos glucurônicos e urônicos. Adicionalmente aos principais propósitos deste estudo, uma fermentação complementar utilizando hidrolisado de caldo de cana a 40 g.L⁻¹ de sacarose, por ação da invertase, teve seu desempenho voltado para a propagação celular (7,57 g.L⁻¹) em detrimento à biossíntese (13,70 g.L⁻¹) normalmente reportada.

Palavras-chaves: caldo-de-cana, biopolímeros, goma xantana, propriedades reológicas, caracterização molecular.

ABSTRACT

Xanthan gum production and its structural characterization under the conditions optimized by experimental design were the main objectives of this study. Several reports point to the sugar cane broth as an excellent raw material for the production of fermentable media, under the microbial species different action (bacteria, yeasts, fungi) in the products biosynthesis of commercial interest. In this context, the forward supply of sugarcane cultivars in Brazil, this research was motivated the development of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 using diluted sugar cane broth for experiments with during 24 h, through a sequence defined by two design, built from the *Statistica* Software. The first one selected to evaluate the effects of sucrose (12.13 to 37.87 g.L⁻¹), yeast extract (until 6.0 g.L⁻¹) and ammonium nitrate (until 1.714 g.L⁻¹) concentrations in the responses that indicate the process performance (gum concentration, conversion of substrate to product ($Y_{P/S}$), and apparent viscosity of xanthan solution). The second design complementary to the first consolidated the interactions due the agitation speed (500 to 1000 rpm) and aeration rate (0.25 to 0.75 vvm) in non-Newtonian behavior of the system. After interpretation of responses, considering the contour curves generated by the adjusted models, the costs involved in the biotransformation was selected this set of variables (27.0 g.L⁻¹ sucrose, 1.8 g.L⁻¹ yeast extract, 0.8 g.L⁻¹ NH₄NO₃, 750 rpm and 0.35 vvm) to proceed the kinetic parameters prediction of the Weiss & Ollis (1980) model, by adjusting the experimental data (cell growth, substrate consumption and product formation) and, the structural characterization of xanthan gum. This test has reached 16.40 g.L⁻¹ of gum, conversion $Y_{P/S}$ equal to 0.61 g.g⁻¹ and viscosity of 1% (w/v) 23000.0 cP at 0.75 s⁻¹. The molecular weight (MW) and total sugar content obtained for the gum, considering the polymerization carried out at the optimum point were 4.172*10⁶ Da and 85.3%, respectively, distributed in 43% glucose, 32% mannose and glucuronic acid 24% in the 1.79:1.33:1 proportion. The infrared spectrum recorded remarkable groups in the elucidation of the compound and, when the samples, commercial and optimized, subject to comparison, sent their bands in the regions of wavelength equivalent to the gum similarity has been confirmed. The gum also was evaluated using the Nuclear Magnetic Resonance Proton (¹H NMR) technique and, therefore, identified in the last stage by common chemical shifts (δ ppm) the hydrogen nucleus and the presence proton at α -anomeric and proton at β carbon of hexoses or pentoses, proton of carbon connected to oxygen, proton H6 of rhamnose and proton of glucuronic and uronic acid. Additionally to the main purposes of this study, an complementary fermentation using sugarcane broth hydrolyzate at 40 g.L⁻¹ sucrose by invertase action, had its performance to the cell growth (7.57 g.L⁻¹) over the biosynthesis (13.70 g.L⁻¹) usually reported.

Keywords: sugar cane broth, biopolymers, xanthan gum, rheological properties, molecular characterization.

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 (EPS) microbianos de valor econômico agregado, comumente encontrados, são dextrana, xantana e gelana embora outras gomas possam apresentar também importância industrial (ASHTAPUTRE & SHAH, 1995; GLAZER & NIKAIDO, 1995; KHAN *et al.*, 2007). A principal característica exibida por estes polissacarídeos é a capacidade para modificar de maneira específica a reologia das soluções.

A potencialidade do uso de biopolímeros na moderna indústria de alimentos é um consenso na literatura existente. Diversos autores, entre eles SANDERSON (1981 e 1990), RINAUDO (1993), MISAKI (1993), MARIUZZO *et al.* (1993) e SCAMPARINI (1993) concordam que, devido às suas propriedades funcionais versáteis, os biopolímeros podem se tornar uma ferramenta poderosa para se criarem novas texturas e, conseqüentemente, permitir a criação de produtos diferenciados.

A goma xantana é um biopolímero classificado como hetero-exopolissacarídeo ramificado, aniônico, produzido por fermentação, empregando a bactéria *Xanthomonas*. 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 xantomadinas (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.

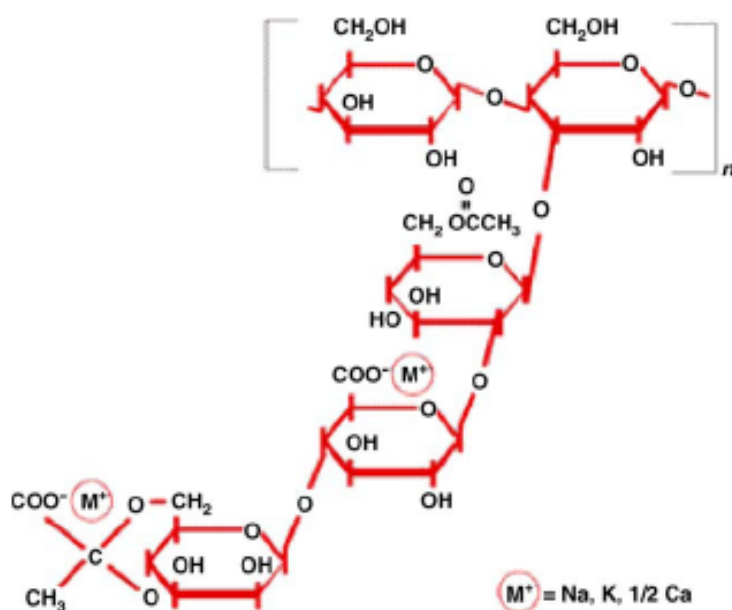


Figura 1.1 – Unidade estrutural repetitiva da goma xantana.

Fonte: Rosalam, S. & England, R. (2006)

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 nas 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; ROSALAM & ENGLAND, 2006).

Os principais produtores de xantana são Merck, Kelco, e Pfizer nos Estados Unidos; Rhône Poulenc, Mero-Rousselot-Santia e Sanofi-Elf na França; Saidy Chemical na China; e Jungbunzlauer na Áustria (García-Ochoa *et al.*, 2000; Pradella, 2006). A produção mundial de goma xantana é 30.000 tons/ano (Skaracis *et al.*, 2003; Pradella, 2006), enquanto seu consumo nos Estados Unidos tem uma taxa de crescimento anual entre 5-10% (Harcum & Yoo, 1999). A xantana tem mercado de aproximadamente US\$ 270 milhões e as projeções para 2015 superam a expectativa de US\$ 400 milhões atingindo uma produção de 80.000 tons/ano (Pradella, 2006). Vorhölter *et al.* (2008) divulgaram que atualmente 86.000 tons/ano desta goma são destinadas ao abastecimento dos mais variados setores de consumo.

As fontes de carbono mais comumente empregadas na síntese da goma xantana pelos principais países produtores são os carboidratos como amido, hidrolisado de amido, xarope de milho, glicose e sacarose. O Brasil ocupa uma posição privilegiada como produtor de cana-de-açúcar movimentando diversos setores da economia e atraindo investimentos. O caldo de cana é, sem dúvida, uma matéria-prima nobre, pois sua composição química apresenta elevado teor de sacarose, sais minerais e vitaminas, o que lhe confere um valor nutritivo excepcional. Esses aspectos, dentre outros, certamente o tornam um ótimo meio de produção de goma xantana, desde que pesquisas fossem empreendidas para dimensionar as inúmeras variáveis de processo. Se tal incentivo ganhasse destaque, o Brasil passaria de importador a produtor de goma com a vantagem de operar unidades fabris a custos comparativamente mais baixos e em condições de oferecer ao mercado preços aquém dos praticados pelo mercado internacional, uma vez que, sua matéria-prima requer mínima suplementação e dispensa processamentos onerosos.

Nesse contexto, abordar a “Produção e a Caracterização de Goma Xantana Empregando Caldo de Cana” é vincular características essenciais ao produto final, desde a definição da matéria-prima até a extração do EPS para posterior análise estrutural da biomolécula. Técnicas de otimização com base em planejamentos experimentais (Composto Central e Fatorial), modelos matemáticos fenomenológicos não-estruturados, capacidade de transferência de massa do meio selecionado, direcionaram a fase de produção para indiscutivelmente qualificar o biopolímero produzido.

Logo, baseando-se nas considerações expostas, o objetivo geral desse estudo foi: produzir e caracterizar goma xantana biossintetizada a partir de caldo de cana diluído. Em decorrência, os objetivos específicos foram: selecionar em condições definidas de processo a melhor fonte de nitrogênio; otimizar variáveis tais como, concentração de sacarose, concentração de extrato de levedura, concentração de nitrato de amônio, velocidade de agitação e aeração, por meio de planejamentos experimentais; determinar a cinética de formação do biopolímero no ponto ótimo; utilizar caldo de cana hidrolisado por ação da invertase como teste de controle para avaliar a *performance* da glicose frente à sacarose e, adicionalmente, analisar a composição química da goma quantificando seus monossacarídeos, obter informações do comportamento reológico, conhecer o mecanismo de decomposição térmica e, sobretudo, coletar dados dos espectros de infravermelho FTIR e de ressonância de próton ^1H -RMN.

Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

2.1 – Introdução a Biopolímeros

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).

Morfologicamente são três os tipos de biopolímeros encontrados: intracelular, da parede celular e extracelular. Por razões práticas, os microrganismos que produzem polissacarídeo extracelular livre são os primeiros a serem explorados, para evitar os procedimentos dispendiosos de purificação que são necessários aos outros tipos de polissacarídeos. Os polissacarídeos extracelulares têm um grande potencial industrial, porque podem ser extraídos em grandes quantidades no meio líquido (McNEELY & KANG, 1973 *apud* VENDRUSCOLO, 1995). Também, por razões óbvias, polissacarídeos extracelulares provenientes de microrganismos causadores de doenças humanas têm sido evitados. Felizmente, existem muitos microrganismos não-patogênicos ao homem, que produzem polissacarídeos extracelulares (SANDFORD, 1979).

Os biopolímeros extracelulares estão localizados fora da parede celular, sendo que alguns são encontrados ligados às células, como uma verdadeira cápsula. No entanto, outros são excretados pelas células no meio de crescimento. Provavelmente, o polissacarídeo extracelular tenha a função natural de proteger o microrganismo contra vários fatores adversos do meio ambiente. Por exemplo: quando na forma de cápsula, serviria como protetor contra ataques de fagócitos (WILKINSON, 1958 *apud* VENDRUSCOLO, 1995).

Em geral, o polissacarídeo não aparece como função de reserva de fonte de energia. A bactéria normalmente não é capaz de catabolizar o próprio polissacarídeo extracelular (WILKINSON, 1958 *apud* VENDRUSCOLO, 1995). Outros autores, como LÓPEZ & BACKING (1968) e BEKING (1974), no entanto, mostraram que a produção do biopolímero, após atingir um máximo de rendimento, diminuía drasticamente. Os autores consideraram que o biopolímero foi utilizado para o crescimento das células, visto que o nível de polissacarídeo decrescia concomitantemente com o aumento do número de células.

Os polissacarídeos extracelulares podem ser homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos e quanto à sua estrutura podem ser lineares ou ramificados (GARRET & GRISHAM, 1997). Para síntese de homopolissacarídeo, é requerido um carboidrato específico, porque polissacarídeos como a dextrana e levana, são produzidos, geralmente, por uma só

enzima ou por um sistema simples de enzimas. Por causa da simplicidade do sistema, são facilmente adaptados para produção livre de células, ou seja, por síntese enzimática. Em contraste, os heteropolissacarídeos são formados a partir de qualquer fonte de carbono utilizável, embora a eficiência varie consideravelmente, porque o sistema de enzimas é complexo. Para esse tipo de sistema, a síntese por enzimas não está ainda elucidada (WILKINSON, 1958 *apud* VENDRUSCOLO, 1995; SANDFORD, 1982).

Os polissacarídeos, as proteínas, e os ácidos nucleicos 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 pela síntese biológica *in vivo* envolve macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos 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.

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

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

Conforme Tabela 2.3 pode-se verificar que o caldo de cana é uma matéria-prima rica em sais minerais e açúcares sendo um substrato qualificado para a produção de goma xantana.

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 N°: 4, Abril 2001

2.3 – Gomas oriundas de algas e de plantas

2.3.1 – 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 *Rhodophyceae*. 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 75°C, que corresponde a um peso molecular de 100.000) demonstrou que o produto é seguro (SOLER, 1993 - www.corpoclinico.com.br).

2.3.2 – Gomas oriundas de plantas

A acemanana, extraída da babosa (*Aloe vera* L.), comercialmente conhecida como Carrysin®, Hidrogel® (NI *et al.*, 2004 *apud* CAMPESTRINI, 2007), foi aprovada pelo FDA para aplicação em ferimentos desde a década passada e, para tratamento da osteíte alveolar (TALMADGE *et al.*, 2004 *apud* CAMPESTRINI, 2007). As glucomananas são os principais polissacarídeos de *Aloe*, com destaque para a acemanana, o constituinte mais estudado. A acemanana é um polímero misto de mananas acetiladas, com cadeias de tamanhos variáveis, formadas por resíduos de manose e glucose unidos por ligações do tipo α -(1→4) e com peso molecular de aproximadamente 1×10^6 Da (TURNER *et al.*, 2004; LEE, *et al.*, 2001 *apud* CAMPESTRINI, 2007). Em média, cada manose possui um grupamento acetil em uma das três posições do anel (DIEHL & TEICHMULLER, 1998 *apud* CAMPESTRINI, 2007), característica

esta que corrobora para a denominação acemanana (ZHANG & TIZARD, 1996; NI *et al.*, 2004 *apud* CAMPESTRINI, 2007).

A despeito dessas indicações, os mecanismos de ação desta macromolécula no organismo humano permanecem não completamente elucidados, carecendo, portanto, de maiores estudos. Existe um crescente interesse comercial relacionado ao uso da babosa, tanto no setor cosmético como no farmacêutico. Nesse sentido, diversos estudos têm demonstrado a utilização da babosa como fonte de compostos com atividades farmacológicas, tais como as antraquinonas, metabólitos secundários encontrados principalmente no extrato do parênquima clorofiliano foliar, tendo a aloína como constituinte majoritário, e também os polissacarídeos do extrato do parênquima, com destaque para a acemanana.

Um dos aspectos que suscita maior interesse é o fato de que, por apresentar atividade imunomodulatória, este composto poderia atuar como um agente antitumoral. No contexto da investigação pré-clínica da acemanana, os estudos relacionados à vasculogênese e angiogênese são uma importante ferramenta no que concerne à elucidação dos efeitos desse polissacarídeo e de outros compostos isolados da babosa na geração ou inibição da formação de vasos (CAMPESTRINI, 2007).

Devido à gama de aplicações na área da saúde humana, os produtos derivados da babosa vêm apresentando forte expansão nos mercados nacional e internacional. Esse fato determina uma maior demanda por matérias-primas de qualidade e o aumento da oferta da biomassa de babosa pressupõe o incremento na produtividade e/ou expansão da área dos cultivos (CAMPESTRINI, 2007).

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 glicosídicas do tipo α (1 $\rightarrow$ 6) conforme Figura 2.1 (MURPHY & WHISTLER, 1973; KHAN *et al.*, 2007). Sua produção em larga escala teve início na Suécia, 1942 a 1944, na Inglaterra em 1947 e nos EUA em 1949. É largamente utilizada na indústria farmacêutica, tendo seu uso já consagrado com fins clínicos, porém o seu potencial de aplicação se estende às indústrias química, petroquímica, fotográfica e de alimentos (QUEIRÓZ, 1987; VILOCHE-BAZÁN, 1994). 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 e a transferência de resíduos glicosil a partir dessa clivagem para a cadeia de crescimento da dextrana. O processo envolve a utilização de 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).

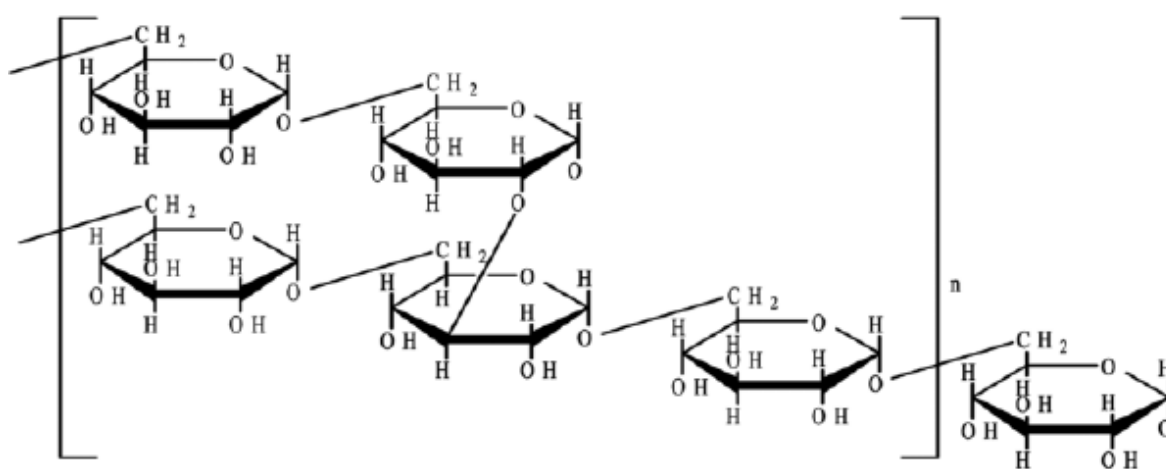


Figura 2.1 – Estrutura química da dextrana.

Fonte: Khan, T. *et al.* (2007)

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, ilustrada na Figura 2.2 (KHAN *et al.*, 2007), é um agente gelificante, produzido e comercializado com o nome de Gelrite (LOPES & ANDRADE, 1995; NAKAMURA *et al.*, 1996). Foi descoberta em 1977 e aprovada pelo FDA em 1990, para uso limitado a alguns tipos de alimentos, como geléias, coberturas para tortas e frutas, congelados, “fondant” e “marshmallow” (SANDERSON, 1990). Os géis obtidos com gelana são firmes, transparentes e brilhantes. Nesse contexto, conforme Khan *et al.* (2007), gelana polimerizada por *Pseudomonas elodea* concentra na fração polissacarídica elevado massa molecular (maior que 7×10^4 com 95% acima de 5×10^5 Da).

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). É empregada como agente de suspensão e na manutenção de fluidos de perfuração na prospecção de poços de petróleo e na mineração.

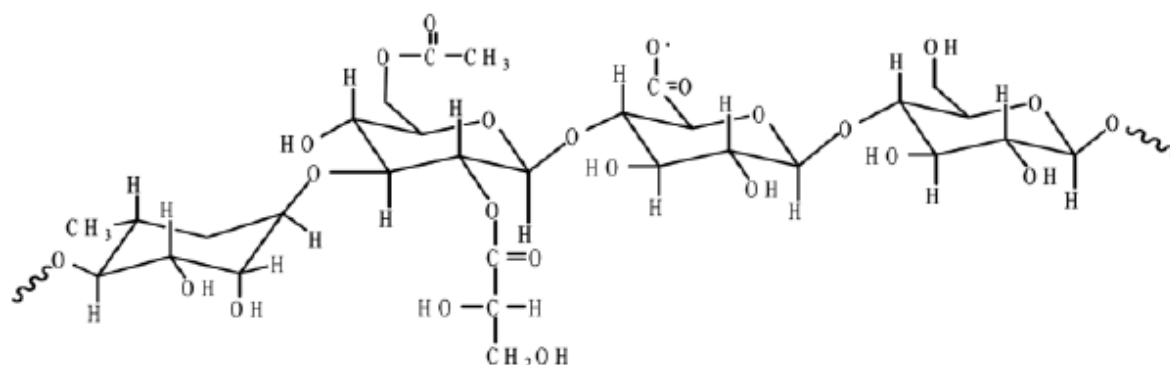


Figura 2.2 – Estrutura química da gelana.

Fonte: Khan, T. *et al.* (2007)

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. Em dezembro de 1996, tornou-se o 3º hidrocolóide aprovado pelo FDA, após a xantana e a gelana, sendo extensamente usado no Japão em diversos alimentos processados. A unidade estrutural da curdlana está representada na Figura 2.3 (KHAN *et al.*, 2007).

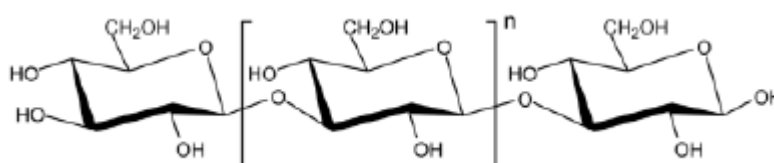


Figura 2.3 – Estrutura química da curdlana.

Fonte: Khan, T. *et al.* (2007)

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).

Khan *et al.* (2007) publicaram um estudo minucioso direcionado a alguns exopolissacarídeos microbianos de importância no mercado, entre eles, a pululana, descrita pela primeira vez por meados de 1960, originada por processo fermentativo, a partir do fungo *Aureobasidium pullulans* (Figura 2.4). Solúvel em água, possui caráter iônico neutro, consiste de unidades de maltotriose and maltotetraose, com ambas as ligações α (1 $\rightarrow$ 6) e α (1 $\rightarrow$ 4). A massa molecular média varia de 1×10^5 a 1×10^6 Da.

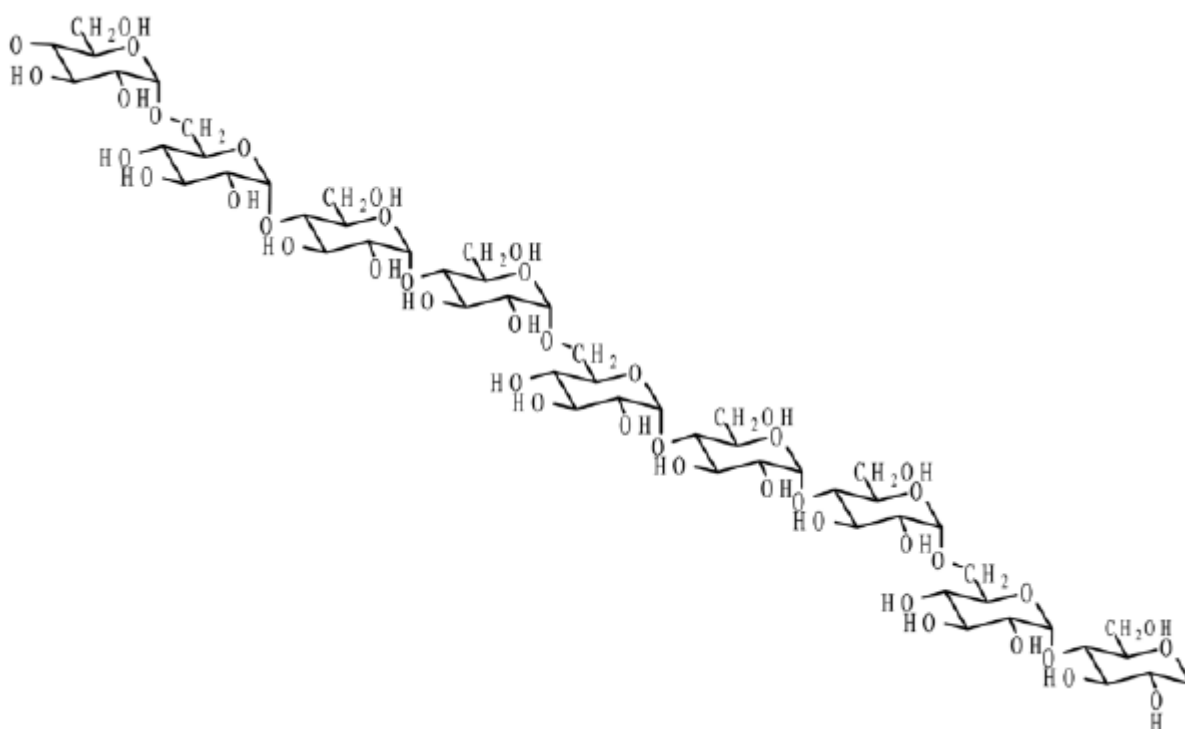


Figura 2.4 – Estrutura química da pululana.

Fonte: Khan, T. *et al.* (2007)

Escleroglucana é um polissacarídeo neutro capsular secretado por certos fungos (GRASS *et al.*, 1996). Foi desenvolvida e patenteada, em 1967, pela empresa americana Pillsbury Company, sendo produzida e comercializada pela indústria francesa Sanofi Bio-Industries (YALPANI & SANDFORD, 1987; LOPES & ANDRADE, 1995). Rezzoug *et al.* (2000) investiram na realização de experimentos batelada com duração de aproximadamente 60 h, fermentação aeróbica conduzida a 28–30°C, para obter escleroglucana (Figura 2.5) a partir de um meio elaborado à base de glicose na presença de *Sclerotium rolfsii*. No final do processo, a recuperação com álcool isopropílico, seguida da secagem garantiu 20 g.L⁻¹ de goma.

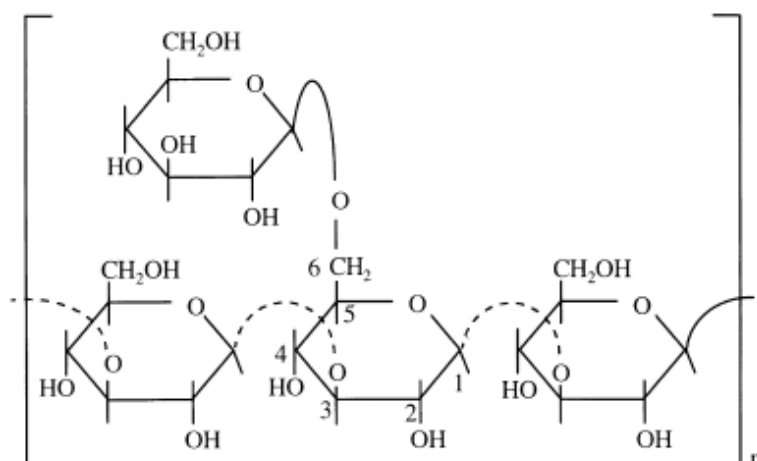


Figura 2.5 – Estrutura química da escleroglucana.

Fonte: Rezzoug, S. A. *et al.* (2000)

Pode-se ainda citar outros polissacarídeos microbianos que vêm sendo estudados: 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).

Outro exemplo que pode ser citado na lista de polissacarídeos é o zanflo, do tipo extracelular, produzido por uma bactéria Gram negativa, isolada pelo programa de “screening”, efetuado pela empresa Kelco Co., EUA. Mesmo esse polissacarídeo formando soluções de maior viscosidade que a xantana e sendo compatível com cátions, suas aplicações em alimentos ainda não foi permitida, tendo sido utilizado, até o momento, como espessante em tintas látex (SANDFORD, 1982 *apud* VENDRUSCOLO, 1995).

O biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. 7070 é denominado clairana. Pode ser utilizada 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.

CHRISTENSEN *et al.* (1985) *apud* VENDRUSCOLO (1995) relataram a capacidade biossintética da bactéria *Pseudomonas sp* NCMB 2021, encontrada na água do mar, especialmente na produção de biopolímero extracelular em duas fases: na fase exponencial de crescimento, produz um biopolímero que forma soluções muito viscosas em água, forma gel reversível em concentrações elevadas, precipita com cátions multivalentes e, no final da fase exponencial e na fase estacionária, produz outro biopolímero que, mesmo em altas concentrações, forma soluções aquosas com baixa viscosidade.

MANRESA *et al.* (1987) *apud* VENDRUSCOLO (1995) estudaram a produção de um biopolímero extracelular por *Pseudomonas sp* GSP-910, isolada do solo. Este biopolímero forma soluções altamente viscosas em baixas concentrações, estáveis na faixa de temperatura de 25 a 45° C e na faixa de pH de 2 a 12, na presença de sais monovalentes. Na presença de cátions divalentes, como Ca^{+2} , as soluções contendo 1% deste polissacarídeo gelificaram. Os autores sugeriram as mesmas aplicações da xantana para este biopolímero.

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. A massa molecular encontrada para este biopolímero foi na ordem de $1,1 \times 10^6$ Da.

A Tabela 2.4 apresenta resumidamente gomas de origem microbiana com 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	<i>Xanthomonas campestris</i>	β -D-glicose, manose e ácido glucurônico	Espessante, emulsificante, estabilizante, agente de suspensão
Dextrana	<i>Acetobacter sp.</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Streptococcus mutans</i>	α -D-glicose	Expansor sangüíneo
Alginato	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Azotobacter vinelandii</i>	Ácidos D-manurônico e L-gulurônico	Agente gelificante
Curdiana	<i>Alcaligenes faecalis</i>	β -D-glicose	Agente gelificante
Gelana	<i>Sphingomonas elodea</i>	D-glicose, ramnose e ácido glucurônico	Agente gelificante
Escleroglucana	<i>Sclerotium glutanicum</i>	β -D-glicose	Recuperação de petróleo
Pululana	<i>Aureobasidium pullulans</i>	α -D-glicose e maltotriose	Material plástico

Fonte: ASHTAPUTRE & SHAH, 1995; GLAZER & NIKAIDO, 1995

2.4.1 – 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 massa molecular na faixa de $1,5 \cdot 10^7$ Da 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* contemplam a via de Entner-Doudoroff, que cataboliza cerca de 80% da glicose disponível até piruvato, o qual segue para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e a via das pentoses-

fosfato que metaboliza a glicose remanescente (Figura 2.6) (ZAGALLO & WANG, 1967; ROSEIRO *et al.*, 1993; ROSALAM & ENGLAND, 2006).

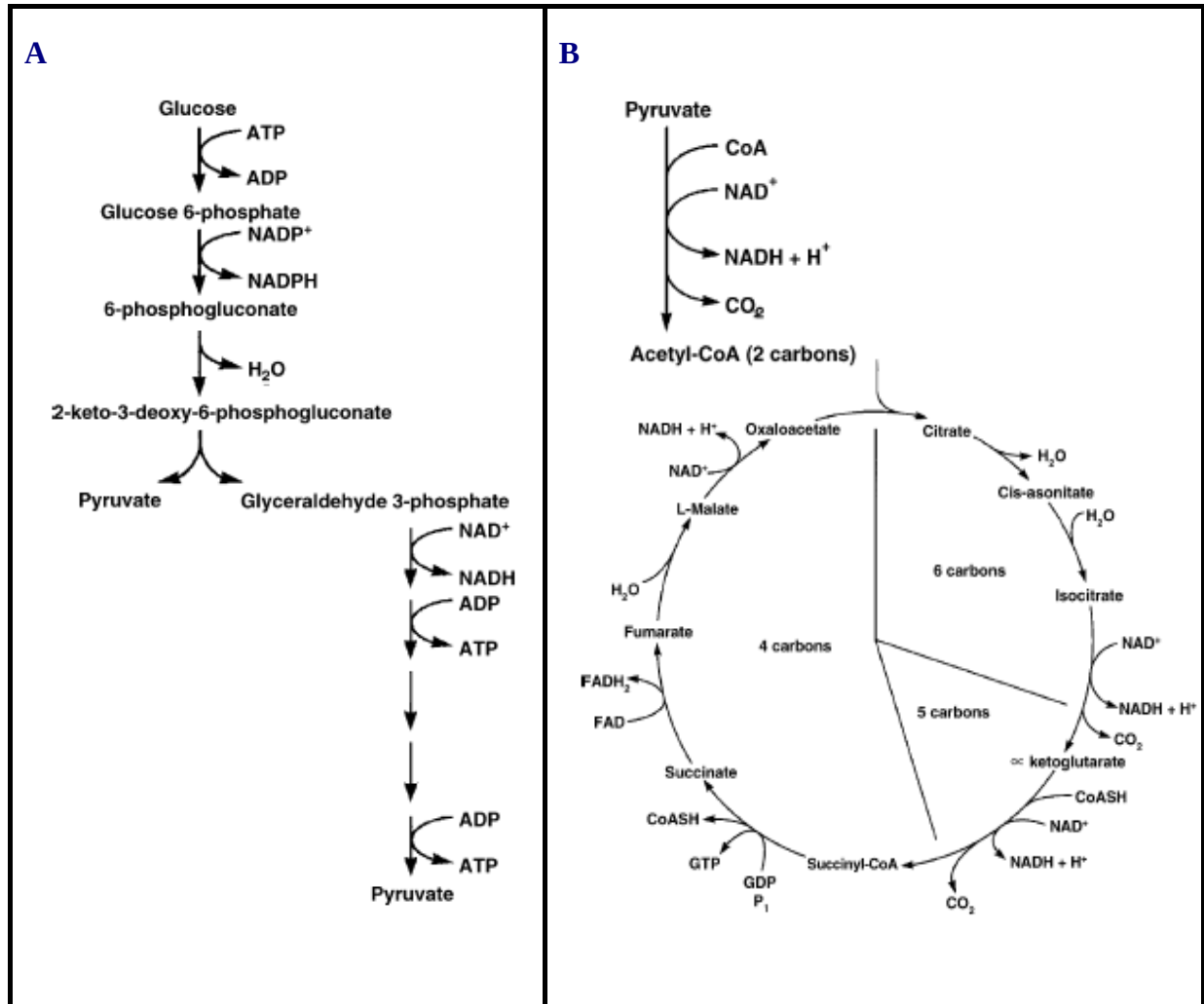
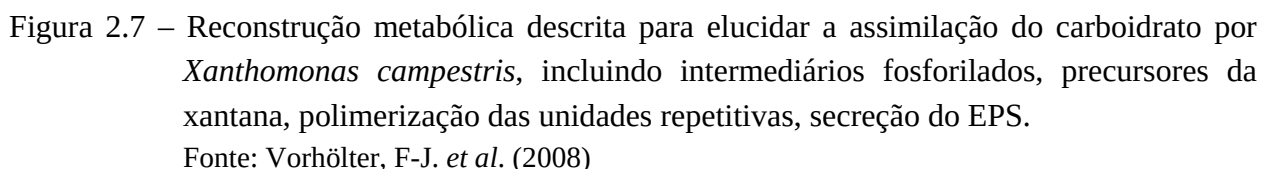


Figura 2.6 – (A) Via Entner-Doudoroff; (B) Ciclo do ácido tricarboxílico.

Fonte: Rosalam, S. & England, R. (2006)

Estudos mostram que a biossíntese da xantana em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* é controlada por um *cluster* de doze genes (*gumBCDEFGHIJKLM*) (VOJNOV *et al.*, 1998; VORHÖLTER *et al.*, 2008). As Figuras 2.7 e 2.8 correspondem a rotas propostas para utilização de carboidratos na síntese do EPS.



A xantana 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; VORHÖLTER *et al.*, 2008). Alguns autores consideram que primeiro ocorre a polimerização das unidades

pentassacarídicas no interior da célula, e na sequência 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 posteriormente polimerizadas.

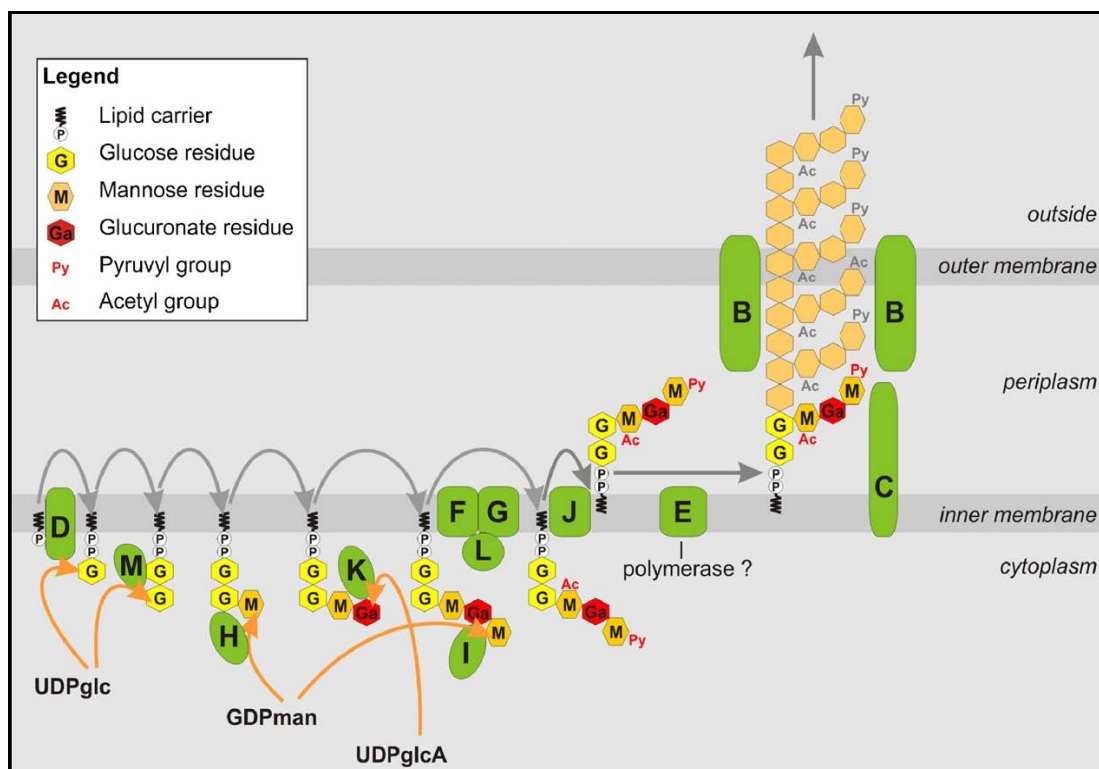


Figura 2.8 – Modelo para a biossíntese da goma xantana por *Xanthomonas campestris*.

Fonte: Vorhölter, F-J. *et al.* (2008)

A Tabela 2.5 lista diversas aplicações da goma xantana na área de alimentos desempenhando diferentes funções (SUTHERLAND, 1990; KHAN *et al.*, 2007).

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 sinéresis	Queijo, alimentos congelados
Agente espessante	Geléias, molhos

Fonte: SUTHERLAND, 1990

2.5 – 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* pigmentadas, cujas colônias apresentam coloração amarela conforme ilustra a Figura 2.9 (RAMIREZ *et al.*, 1988; BECKER *et al.*, 1998).



Figura 2.9 – 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, celulasas, 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 2.10 mostra a lesão causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em folhas de couve.

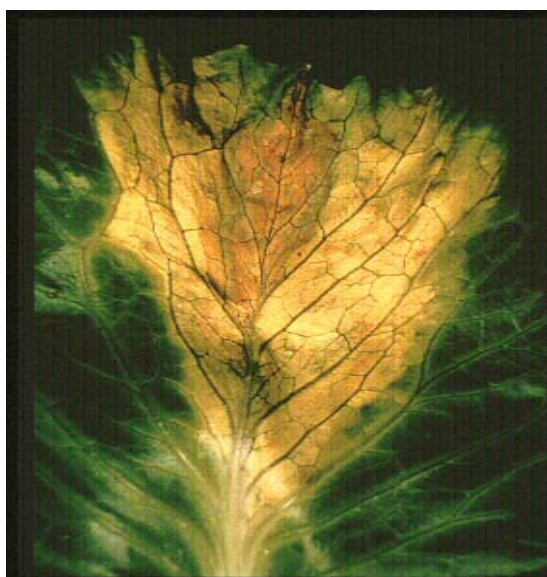


Figura 2.10 – Lesão causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em folhas de couve.

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* 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 2.11 mostra a lesão causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em repolho.



Figura 2.11 – 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) relataram 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*).

2.6 – 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, quais os substratos estão sendo preferencialmente 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 (BORZANI, 2001).

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.

2.7 – Processo Fermentativo

2.7.1 – Cinética do processo fermentativo

Nos processos de fermentação aeróbica, o microrganismo desenvolvendo sua atividade vital em meios de elevada complexidade, transforma certas substâncias em outras, podendo conduzir a resultados de interesse econômico. A célula viva é o agente responsável pela transformação, ela assimila diversos materiais, se reproduz e produz outras substâncias, alterando a composição do meio em que vive. Segundo BORZANI (1986), o problema para fazer um estudo cinético reside em reconhecer dentre as diversas substâncias consumidas e produzidas pelo microrganismo, quais devem ser objeto de estudo. Durante a fermentação, variam as concentrações de nutrientes, de produtos e de células. Partindo-se da hipótese de que a concentração de células é uma medida adequada da concentração do sistema enzimático, é óbvio que o estudo inicial seja feito em relação à produção de células. BORZANI (1986) sugere ainda que seja determinada, inicialmente, a velocidade específica de crescimento do microrganismo, e,

em estudos mais completos, a velocidade específica de formação do produto e a velocidade específica de consumo do substrato para avaliação de um processo fermentativo.

A fermentação em batelada para a produção de goma xantana exhibe 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:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} + K_e X \quad (2.1)$$

em que o último termo desta Equação corresponde ao substrato usado para atividades como motilidade celular, trabalho osmótico, estocagem de nutrientes e outros processos relacionados a funções de manutenção (MULCHANDINI *et al.*, 1988).

2.7.1.1 – Modelagem matemática de processos fermentativos

A modelagem matemática de processos fermentativos pode ser definida como a tentativa de representar, por equações matemáticas, os balanços de massa para cada componente no biorreator, associados às complexas transformações bioquímicas que ocorrem no processo e às velocidades com que essas transformações se processam. Em razão da complexidade do processo real, somada às limitações matemáticas, os modelos são baseados, na grande maioria, na idealidade e, em geral, fornecem uma representação fiel de apenas algumas das propriedades do processo.

Do ponto de vista da engenharia bioquímica, o desenvolvimento da modelagem matemática dos processos fermentativos permite atingir, entre outros, os seguintes objetivos: organizar informações desconexas a respeito dos fenômenos biológicos num conjunto coerente; pensar (e calcular) logicamente a respeito de quais componentes e interações são importantes num sistema complexo; descobrir novas estratégias para explicar o comportamento das células submetidas a determinados ambientes e, finalmente, entender as características qualitativamente essenciais de alguns processos.

O objetivo principal da modelagem matemática e simulação, como ferramenta do desenvolvimento tecnológico de processos fermentativos, é prever o comportamento dinâmico e estacionário do processo, inclusive em condições não testadas empiricamente, possibilitando a determinação das condições operacionais economicamente ótimas do sistema, auxiliando no projeto e ajuste de algoritmos de controle, no qual o modelo matemático formulado passa a ser parte integrante do mesmo (BORZANI, 2001).

Os processos fermentativos incorporam uma série de características que os diferenciam dos processos químicos, o que pode explicar as dificuldades encontradas na formulação de modelos matemáticos que representem adequadamente estes processos, ao contrário do que ocorre com os processos químicos convencionais. Entre essas características podem ser citadas as seguintes: baixas concentrações e baixas velocidades de reação, como resultado da utilização de um meio diluído; complexidade da mistura reagente e capacidade do sistema (células microbianas) de sintetizar seu próprio catalisador; conhecimento insuficiente de vários dos fenômenos limitantes das velocidades de produção e falta de sensores para automação *on-line*; problemas de esterilidade, segurança e eventualmente da toxicidade dos processos fermentativos (BORZANI, 2001).

2.7.1.2 – Modelos fenomenológicos

Baseiam-se na formulação de hipóteses e correlações teóricas ou empíricas para explicar os fenômenos e o comportamento das variáveis do processo observadas experimentalmente. Um modelo fenomenológico é constituído por um conjunto de relações matemáticas entre as variáveis de interesse do sistema em estudo.

É desejável que os modelos sejam, na medida do possível, fundamentais, ou seja, baseados nas equações de conservação de massa, energia e quantidade de movimento e em princípios físico-químicos, uma vez que isto confere maior confiança em interpolações e extrapolações, quando comparado com modelos puramente empíricos. Entretanto, mesmo em modelos fundamentais, é freqüente que o cálculo de um ou mais parâmetros seja baseado em equações empíricas (BORZANI, 2001).

Na formulação de um modelo matemático fenomenológico convencional são normalmente, utilizadas equações que podem ser classificadas em:

- ✓ equações de balanço ou de conservação;
- ✓ equações de velocidade;
- ✓ equações termodinâmicas.

Enquanto as equações de balanço, de velocidade de transporte e termodinâmicas são passíveis de padronização, as equações de velocidade de transformação, ou equações cinéticas, são específicas para os processos fermentativos e constituem os chamados modelos cinéticos.

Os modelos cinéticos de processos fermentativos podem ser classificados, quanto ao número de componentes usados na representação celular, em dois tipos, conforme se detalha a seguir.

- ✓ *Modelos não estruturados*: o material celular é representado por uma única variável, por exemplo, a massa celular ou o número de células, sem considerar variações de componentes intracelulares, ou usar tais variações na previsão do comportamento cinético do processo;
- ✓ *Modelos estruturados*: as células são descritas com maiores detalhes, considerando, por exemplo, componentes intracelulares, permitindo descrever o estado das células e sua adaptação às mudanças do meio ambiente.

Quanto à heterogeneidade da população microbiana, os modelos cinéticos também são classificados em duas categorias, descritas a seguir.

- ✓ *Modelos não segregados*: a população celular é considerada homogênea, isto é, todas as células apresentam o mesmo comportamento;
- ✓ *Modelos segregados*: as células são consideradas discretas, como indivíduos de uma população heterogênea, com distribuição de idade, de tamanho e de propriedades celulares.

Obviamente, os modelos segregados e estruturados oferecem uma descrição mais detalhada do comportamento cinético do processo fermentativo que os não segregados e os não estruturados, mas à custa de maior complexidade e maior esforço computacional requerido (BORZANI, 2001).

Um exemplo de modelo cinético do tipo não-estruturado é o de Weiss & Ollis (1980), composto por equações de Verhulst-Pearl e Luedeking-Piret dado por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \quad (2.2)$$

$$\frac{dP}{dt} = m \frac{dX}{dt} + \lambda X \quad (2.3)$$

sendo $m = \frac{1}{Y_{X/P}}$

$$-\frac{dS}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

$$\text{sendo } \alpha = \frac{1}{Y_{X/S}} \quad (2.4),$$

sendo que, X, S e P referem-se à célula, substrato e produto;

$\mu_{max.}$ – velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1});

$X_{max.}$ – concentração celular máxima (g/L);

m – produto associado ao crescimento celular (gP/gX);

λ – produto não-associado ao crescimento celular gP/(gX.h);

α – consumo de substrato devido ao crescimento celular (gS/gX); e

β – consumo de substrato para manutenção celular gS/(gX.h).

Note que, a partir das equações 2.2, 2.3 e 2.4, torna-se fundamental conhecer dados experimentais de (X, S e P) em função do tempo, para que seja possível a determinação dos parâmetros ($\mu_{max.}$, $X_{max.}$, m , λ , α e β) por meio de um algoritmo de resposta múltipla, com auxílio de métodos numéricos. Finalmente, o fator de conversão de substrato a produto $Y_{P/S}$ calculado pelo modelo é dado pela relação (m/α), conforme equações descritas acima.

2.7.2 – Condições de produção da Goma Xantana

O efeito das condições ambientais sobre a produção de polissacarídeo extracelular tem sido estudado, e, como regra geral, para fornecer os nutrientes necessários ao crescimento e produção do biopolímero, o meio deve ter carboidrato, sais de amônio ou aminoácidos e um número de sais inorgânicos que servem também como fonte de íons e atuam como cofatores na síntese do polissacarídeo (BRETSCHER & KAISER, 1978; MIAN *et al.*, 1978 *apud* VENDRUSCOLO, 1995).

Desde 1961, quando Rogovin *et al.* publicaram o primeiro trabalho sobre produção de goma xantana, muitos outros se seguiram, nos quais foram estudados 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 consequência 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. Os autores sugeriram 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 & DEMAINE, 1979), e citrato (SOUW & DEMAINE, 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) relataram 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.

SUTHERLAND (1982), em uma extensa revisão, com mais de 150 trabalhos, mostrou a influência da composição do meio de cultura, especialmente quanto à fonte de carbono, nitrogênio e íons, na produção de polissacarídeo extracelular. A composição do biopolímero independe da natureza ou do tipo de carboidrato selecionado como fonte de carbono (LILLY *et al.*, 1958; UHLINGER & WHITE, 1983; SUTHERLAND, 1982 e MANRESA *et al.*, 1987 *apud* VENDRUSCOLO, 1995). No entanto, a composição global do meio e as concentrações de seus constituintes podem influenciar o rendimento do biopolímero. A maioria dos meios de produção é baseada na alta relação entre carbono e nitrogênio, a qual favorece a produção de biopolímero, segundo DUGUID & WILKINSON, 1958 e CORPE, 1964. Nutrientes limitantes, como enxofre, magnésio, potássio e fósforo, foram empregados em substituição ao nitrogênio (WILKINSON, 1958). De acordo com SUTHERLAND (1983), foi observado que, em culturas contínuas, o

polissacarídeo difere nas propriedades reológicas como no grau de acilação, conforme o nutriente limitante utilizado.

CADMUS *et al.* (1976), em estudos pesquisando meio sintético na produção de goma xantana, concluíram que baixos teores de nitrogênio (0,1%) e ar (0,25 litro/min) favoreceram a formação de xantana com baixo teor de piruvato, enquanto que, o aumento de nitrogênio (1,5%) e fluxo de ar (1,5 litro/min), juntamente com a adição de K_2HPO_4 , proporcionou a formação da xantana com alto teor de piruvato.

As fontes de carbono mais exploradas na produção de biopolímero são a glicose e a sacarose. Na biossíntese da xantana suas concentrações variam de 2 a 7% (CHEN *et al.*, 1975; CHEN & TSOU, 1976; JEANES *et al.*, 1976 e 1977, CADMUS *et al.*, 1976 e 1978; SOUW & DEMAIN, 1979; GARCIA-CRUZ, 1983 e MOCHI & SCAMPARINI, 1993). 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 biopolímero é altamente dependente da concentração inicial de açúcar, enquanto o crescimento do microrganismo não. Foi relatada uma produção decrescente de biopolímero à medida que a concentração inicial de glicose foi aumentada, caindo rapidamente a razão biopolímero/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 de 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 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.

A aeração, ao contrário do que se pensa, não tem nenhum efeito no tempo de geração do microrganismo, mas aumenta consideravelmente o total da massa bacteriana. A oxigenação, além de manter a cultura por mais tempo em metabolismo oxidativo, gerando, portanto, mais ATP para a biossíntese, parece promover a oxidação de certos produtos que se acumulam no meio de cultura, resultantes do próprio metabolismo celular, e que são tóxicos para as bactérias (CASTRO, 1993 *apud* VENDRUSCOLO, 1995).

A agitação e a aeração são fatores fundamentais a serem considerados nas fermentações que utilizam microrganismos aeróbicos, principalmente em processos contínuos; no entanto, em produções descontínuas, a agitação e o volume de ar são também importantes, pois os processos de reprodução dos microrganismos ocorrem em presença de oxigênio, e em determinadas fermentações a necessidade de oxigênio não é só para produzir células, mas também para aumentar o rendimento dos seus produtos (BRUNELLO & CONCONE, 1986).

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 melão 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 de 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 do produto (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), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (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.

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.

Em termos de estrutura química, a presença dos 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
<i>X. campestris</i>	30,1	27,3	14,9	7,1	6,5
<i>X. fragaria</i> 1822	24,6	26,1	14,0	4,9	5,5
<i>X. gummisudans</i> 2182	34,8	30,7	16,5	4,7	10,0
<i>X. juglandis</i> 411	33,2	30,2	16,8	6,9	6,4
<i>X. phaseoli</i> 1128	30,9	28,6	15,3	1,8	6,4
<i>X. vasculorum</i> 702	34,9	30,2	17,9	6,6	6,3

Fonte: García-Ochoa *et al.* (2000)

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

^aValores 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% K₂HPO₄, 0,01% MgSO₄, 0,003% MnCl₂); (Soro de leite B: 2% soro, 0,5% K₂HPO₄, 0,01% MgSO₄, 0,003% MnCl₂, 0,2% ácido cítrico); e (Soro de leite C: 2% soro, 0,5% K₂HPO₄, 0,01% MgSO₄, 0,003% MnCl₂, 0,2% ácido cítrico, 0,25% extrato de levedura).

Garcia-Cruz & Eto (2007) realizaram estudos visando à produção de goma xantana empregando *Xanthomonas campestris* por fermentação submersa e em estado sólido. Segundo os autores, a técnica por fermentação em estado sólido (FES) vem sendo explorada para a produção de antibióticos, alcalóides, biocombustível, enzimas, ácidos orgânicos, entre outros. Para a fermentação em estado sólido, seus experimentos foram conduzidos usando como substratos resíduos agro-industriais de casca de citrus e farelo de trigo (1%, 2%, 3%, 4% e 5% P/P), enquanto, glicose e sacarose, ambas na concentração de 1%, 2%, 3%, 4% e 5%, foram utilizadas em fermentação submersa para estabelecer critérios comparativos quando da avaliação dos dois tipos de processos. Sendo assim, os resultados mostraram que a glicose promoveu o maior crescimento microbiano (1,012 g/L) e a sacarose, forneceu uma maior produção de goma (19,73 g/L). Analisando o aproveitamento dos resíduos agro-industriais, observaram para o farelo de trigo que, tanto o crescimento microbiano (10,62 g/L) quanto à produção de goma (80,23 g/L) foram significativamente maiores em relação à casca de citrus. Garcia-Cruz & Eto (2007) mencionaram ainda outro aspecto importante na distinção dos processos, o formato apresentado pela goma. Na fermentação submersa, a goma obtida era em forma de grânulos, enquanto que, na fermentação em estado sólido, esta se apresentava na forma fibrosa, sendo semelhante em todas as concentrações.

Mediante o exposto, observa-se que muitos são os trabalhos científicos publicados na literatura abordando a produção de biopolímeros, em especial a goma xantana, investigando desde o seu surgimento até os dias atuais, condições ótimas para se alcançar elevadas produtividades, haja vista a sua grande utilização. Soma-se a esses fatores a alternativa de explorar, de maneira estratégica, o caldo de cana como matéria-prima na obtenção deste biopolímero, uma vez que, seu uso nos mais variados segmentos da indústria é consequência direta das suas propriedades funcionais, as quais estão intrinsecamente relacionadas à forma de condução do processo em estudo.

2.7.3 – 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 pela 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 por meio 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 polieletrólítico 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 por 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 pela 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).

2.8 – Reologia de Compostos Poliméricos

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 da massa molecular e de sua distribuição, da possibilidade de formação de ligações intermoleculares, da conformação 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).

Nos fluidos não-newtonianos, a tensão de cisalhamento é uma função não linear da taxa de deformação e depende ainda da temperatura, da pressão, da massa molecular, da conformação 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 2.5 (MANO, 1985):

$$\eta_{rel.} = \frac{\eta}{\eta_0} \quad (2.5),$$

sendo que, η é a viscosidade aparente da solução do polímero em (Pa.s); η_0 a viscosidade aparente do solvente, em (Pa.s). A η_{rel} é, portanto, adimensional.

A Figura 2.12 apresenta a classificação dos fluidos com seus reogramas (curvas de escoamento) típicos, bem como suas equações reológicas de estado.

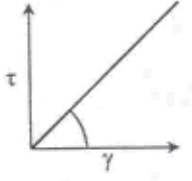
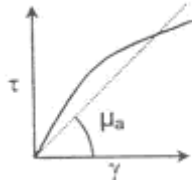
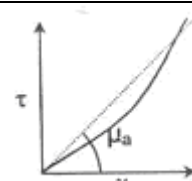
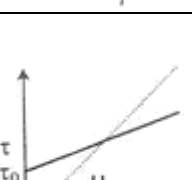
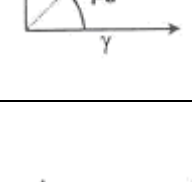
Descrição	Reograma	Equação Constitutiva	Viscosidade Aparente ($\mu_a = \tau\gamma^{-1}$)
Newtoniano		$\tau = \mu\gamma$	Constante $\mu_a = \mu$
Pseudoplástico (Lei de potência)		$\tau = K\gamma^n$ $n < 1$	Decresce com o aumento da taxa de cisalhamento $\mu_a = K\gamma^{n-1}$
Dilatante (Lei de potência)		$\tau = K\gamma^n$ $n > 1$	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 2.12 – Classificação dos fluidos de acordo com o seu comportamento reológico.

Fonte: (Atkinson & Mavituna, 1991).

A viscosidade específica é definida pela Equação 2.6 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.

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_{solução} - \eta_{solvente}}{\eta_{solvente}} = \eta_{rel.solução} - 1 \quad (2.6)$$

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 2.7.

$$\eta_{red.} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad (2.7)$$

sendo 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 2.8 como o limite da viscosidade reduzida quando a concentração do soluto tende para zero.

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right) \quad (2.8)$$

A viscosidade intrínseca de uma solução polimérica pode ser determinada pelas 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 consequência 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 ligação glicosídica em virtude do impedimento estérico entre unidades monossacarídicas adjacentes. Em geral, além da restrição rotacional em torno das ligações covalentes no caso de polieletrólitos, 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).

2.9 – Termogravimetria

2.9.1 – Introdução: Origens e Fundamentos

Ao se estudar o desenvolvimento dos métodos termoanalíticos, chama a atenção o fato desta evolução ter sido lenta, embora os fundamentos teóricos já se encontravam solidamente estabelecidos desde os fins do século XIX (Termodinâmica Clássica), só se acelerando a partir da segunda metade do século XX (IONASHIRO, 2004).

As técnicas termoanalíticas começaram a ser inventadas e estudadas desde o início do século passado; os trabalhos iniciais foram resultado do esforço isolado de alguns grupos de pesquisadores que empregavam a instrumentação rudimentar idealizada e construída em seus próprios laboratórios.

Nos dias atuais a instrumentação termoanalítica atingiu elevadíssimo grau de sofisticação, popularizou-se em função de uma aplicação prática crescente e vem sendo tratada como importante ferramenta de trabalho em todos os setores de vanguarda que se dedicam à pesquisa, ao desenvolvimento de novos produtos e ao controle de qualidade da produção.

A definição aceita de Análise Térmica, como dada por Mackenzie (1979) e a Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria (ICTAC) é: “Um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida como função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura” (IONASHIRO & GIOLITO, 1980; GIOLITO & IONASHIRO, 1988 *apud* IONASHIRO, 2004). Esta definição implica que uma técnica térmica para que possa ser considerada como termoanalítica, três critérios devem ser satisfeitos: 1- Uma propriedade física tem que ser medida, 2-A medida deve ser expressa (direta ou indiretamente) como função da temperatura, 3- A medida tem que ser feita sob um programa controlado de temperatura.

Dentre as técnicas difundidas e utilizadas estão: Termogravimetria, Termogravimetria Derivada (TG, DTG), Análise Térmica Diferencial (DTA), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Detecção de gás desprendido (EGA), Análise termomecânica (TMA), etc. Estas técnicas permitem obter informações com respeito à: variação de massa, estabilidade térmica, água livre e ligada, pureza, ponto de fusão, ponto de ebulição, calores de transição, calores específicos, diagramas de fase, cinética da reação, estudos de catalisadores, transições vítreas, etc (IONASHIRO, 2004).

Datam de muitos anos as tentativas para se chegar a um conhecimento detalhado sobre as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, a fim de se poder estabelecer a faixa de temperatura em que se começa a decompor, bem como para dar seqüência

às reações de desidratação, oxidação, decomposição, etc. Neste sentido, desde o início do século passado, inúmeros pesquisadores se empenharam na laboriosa construção, ponto a ponto das curvas de perda de massa em função da temperatura, aquecendo as amostras até uma dada temperatura e a seguir, após o resfriamento, pesando-as em balanças analíticas.

A primeira termobalança foi sem dúvida o instrumento descrito pelo pesquisador japonês Kotara Honda, em 1915, tendo sido também o criador da palavra termobalança. Este instrumento idealizado e construído por ele, foi empregado para estudar as curvas de decomposição térmica do sulfato manganoso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), do gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e do anidrido crômico (CrO_3).

O trabalho de Honda direcionou as bases de todos os trabalhos futuros em termogravimetria, pois a sua balança permitiu pela primeira vez a pesagem contínua da amostra à medida que ia sendo aquecida. Além disso, empregava sistemas de aquecimento quase isotérmicos, pois, além de usar uma razão de aquecimento bastante lenta (10-14 horas para atingir 1000°C), tão logo se iniciasse uma transição com perda de massa, mantinha a temperatura constante até a transição se completar (cerca de 1-4 horas).

Como cita Wendlandt (1972), Honda (1915) concluiu modestamente este trabalho escrevendo: “Todos os resultados relatados não são totalmente originais; este trabalho com a termobalança revelou, todavia, as posições exatas de mudança de estruturas, bem como a velocidade com que se processaram nas respectivas temperaturas em que ocorreram. Estas investigações demonstram também a grande conveniência em se utilizar esta balança em investigações químicas similares”. Posteriormente, outros pesquisadores japoneses modificaram a termobalança de Honda e desenvolveram outros instrumentos (IONASHIRO, 2004).

Dois outros marcos significativos no desenvolvimento da Termogravimetria moderna ocorreram em 1958 e em 1964. Paulik *et al.* (1958) descreveram um instrumento multifuncional capaz de registrar simultaneamente curvas TG, DTG e DTA que denominaram Derivatograph.

Wiedemann (1964) descreveu o sistema termoanalisador Mettler que era capaz de registrar simultaneamente as curvas TG, DTG, DTA e T versus t, em atmosferas estáticas ou dinâmicas ou ainda sob vácuo.

2.9.2 – Termobalanças Modernas

As termobalanças são instrumentos que permitem a pesagem contínua de uma amostra em função da temperatura, ou seja, à medida que ela é aquecida ou resfriada.

As curvas de variação de massa (em geral perda, mais raramente ganho de massa) em função da temperatura, permitem tirar conclusões sobre a estabilidade térmica da amostra, sobre a composição e estabilidade dos compostos intermediários e sobre a composição de resíduo.

Com relação à balança, grande parte dos aparelhos comerciais utiliza um dos modelos de balança elétrica da Cahn Instruments Co, por se tratar de balanças exatas, reproduzíveis e de custo relativamente baixo. Outros sistemas utilizam balanças do tipo de deflexão de espirais ou feixes, cujos deslocamentos são acusados por um transformador diferencial de tensão linear (LVDT) ou outros transdutores (IONASHIRO, 2004).

Os fornos via de regra, são construídos para operar até temperaturas de 100-1200°C, sendo também disponíveis, fornos que podem ser utilizados até 1600°C ou mesmo 2400°C.

2.9.3 – Fatores que afetam as Curvas TG

Os fatores que podem influenciar o aspecto das curvas TG, pertencem a dois grandes grupos: Fatores instrumentais e fatores ligados às características da amostra.

- ✓ Fatores instrumentais: Razão de aquecimento do forno, atmosfera do forno, geometria do suporte de amostras e do forno.
- ✓ Características da amostra: Tamanho de partículas, quantidade de amostra, solubilidade dos gases liberados na própria amostra, calor de reação, compactação da amostra, natureza da amostra, condutividade térmica da amostra.

Convém salientar que muitos fatores acima mencionados ainda continuam sendo estudados, porque se de um lado boa parte deles é constante para uma dada termobalança (geometria do suporte de amostra, sensibilidade da balança, empuxo do ar), por outro lado muitos são variáveis e difíceis de serem controlados (tamanho de partícula da amostra, compactação, solubilidade na amostra dos gases liberados, etc.) (IONASHIRO, 2004).

2.9.4 – Termogravimetria Derivada

Na termogravimetria, a massa da amostra (m), é continuamente registrada como função da temperatura (T) ou tempo (t).

$$M = f(T \text{ ou } t)$$

Portanto, nas curvas TG, os desníveis em relação ao eixo das ordenadas correspondem às variações de massa sofridas pela amostra e permitem obter dados que podem ser utilizados com finalidades quantitativas.

Na termogravimetria derivada (DTG), a derivada da variação de massa em relação ao tempo (dm/dt) é registrada em função da temperatura ou tempo.

$$dm/dt = f(T \text{ ou } t)$$

Portanto, neste método são obtidas curvas que correspondem à derivada primeira da curva TG e nos quais os degraus são substituídos por picos que delimitam áreas proporcionais às alterações de massa sofridas pela amostra (IONASHIRO, 2004).

Esta técnica foi sugerida por Keyser (1953). No sistema idealizado por ele, a balança suspende duas amostras idênticas sobre dois fornos idênticos, aquecidos linearmente, mas um deles sendo mantido cerca de 5 °C mais quente que o outro. Estabelece-se um diferencial de massa que é proporcional à razão de aquecimento dos fornos.

Logo em seguida Erdey *et. al.* (1954) descreveram o Derivatograph, sistema capaz de registrar simultaneamente as curvas TG-DTG e DTA. Este aparelho baseia-se, fundamentalmente, na análise dos movimentos que um magneto permanente suspenso por um dos pratos da balança realiza no interior de uma bobina. As variações de massa sofridas pela amostra provocam a movimentação do magneto e conseqüentemente, uma variação da corrente que circula pela bobina (IONASHIRO, 2004).

Posteriormente, Campbell *et. al.* (1959), idealizaram um circuito RC para a diferenciação do sinal de saída de termobalanças comerciais. Atualmente este sistema eletrônico é o mais utilizado para se obter as curvas DTG.

2.9.4.1 – Vantagens da Termogravimetria Derivada.

- 1- As curvas DTG indicam com exatidão, as temperaturas correspondentes ao início e ao instante em que a velocidade de reação é máxima;
- 2- Os picos agudos permitem distinguir claramente uma sucessão de reações que muitas vezes não podem ser claramente distinguidas nas curvas TG;
- 3- As áreas dos picos correspondem exatamente à perda ou ganho de massa e podem ser utilizadas em determinações quantitativas, etc (IONASHIRO, 2004).

2.9.4.2 – Aplicações da termogravimetria.

As aplicações da termogravimetria podem ser assim descritas:

- 1- Estudo da decomposição térmica de substâncias orgânicas, inorgânicas e dos mais variados tipos de materiais como: minerais, minérios, carvão, petróleo, madeira, polímeros, alimentos, materiais explosivos etc.
- 2- Estudos sobre corrosão de metais em atmosferas controladas, em faixas muito amplas de temperatura.
- 3- Estudos sobre a velocidade de destilação e evaporação de líquidos, e de sublimação de sólidos (IONASHIRO, 2004).

2.9.5 – Análise Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

2.9.5.1 – Introdução

A análise térmica diferencial (DTA) é uma técnica térmica de medição contínua das temperaturas da amostra e de um material de referência termicamente inerte, à medida que ambos vão sendo aquecidos ou resfriados em um forno. Estas medições de temperatura são diferenciais, pois registra-se a diferença entre a temperatura da referência T_r , e a da amostra T_a , ou seja ($T_r - T_a = \Delta T$), em função da temperatura ou do tempo, dado que o aquecimento ou resfriamento são sempre feitos em ritmo linear ($dT/dt = Cte$).

Calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica na qual mede-se a diferença de energia fornecida à substância e a um material referência, em função da temperatura enquanto a substância e o material referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura. De acordo com o método de medição utilizado, há duas modalidades: calorimetria exploratória diferencial com compensação de potência e calorimetria exploratória diferencial com fluxo de calor (IONASHIRO & GIOLITO, 1980; GIOLITO & IONASHIRO, 1988 *apud* IONASHIRO, 2004).

Através dessas técnicas, podem-se acompanhar os efeitos de calor associados com alterações físicas ou químicas da amostra, tais como transições de fase (fusão ebulição, sublimação, congelamento, inversões de estruturas cristalinas) ou reações de desidratação, de dissociação, de decomposição, de oxidação-redução, etc. capazes de causar variações de calor. Em geral, transições de fase, desidratações, reduções e certas reações de decomposição produzem efeitos endotérmicos, enquanto que cristalizações, oxidações, algumas reações de decomposição produzem efeitos exotérmicos (IONASHIRO, 2004).

Essas técnicas permitem também, estudar transições que envolvem variações de entropia (transições de segunda ordem), das quais, as mais comuns são transições vítreas que certos polímeros podem sofrer.

2.9.5.2 – Fatores que afetam as curvas DTA

Como o método térmico diferencial é essencialmente um método empírico que depende de inúmeros parâmetros experimentais relacionados com a instrumentação utilizada com determinadas características da amostra, as curvas de uma mesma amostra, obtidas em aparelhos diferentes, podem apresentar entre si diferenças mais ou menos acentuadas.

Um dos primeiros estudos, bastante minucioso e detalhado sobre esses aspectos empíricos da Análise Térmica Diferencial, foi realizado por Arens (1951). Segundo esse autor, a forma das curvas DTA, pode ser modificada pela ação dos seguintes fatores:

- 1) Razão de aquecimento do forno;
- 2) Natureza do suporte de amostras;
- 3) Profundidade do raio do orifício de suporte no qual é colocada a amostra;
- 4) Localização, natureza e dimensões dos termopares diferenciais;
- 5) Natureza da substância inerte, utilizada como referência;
- 6) Compactação da amostra e referência nos orifícios do bloco de suporte;
- 7) Efeito de colocação de tampa sobre o orifício da amostra;
- 8) Influência da atmosfera do forno (IONASHIRO, 2004).

2.9.5.3 – Aplicação da Análise Térmica Diferencial

Todas as aplicações da Análise Térmica Diferencial se baseiam na interpretação adequada dos picos endo e exotérmico que aparecem nas curvas DTA (Tabela 2.8). O número, a forma e a posição destes picos permitem interpretações qualitativas e as áreas após a medição adequada, permitem determinação quantitativa. Os dados experimentais, após o tratamento matemático, permitem também, chegar-se a importantes conclusões sobre a cinética das transformações (IONASHIRO, 2004).

A Análise Térmica Diferencial, a semelhança da termogravimetria, é um método afetado por inúmeros parâmetros experimentais, logo as curvas de uma dada amostra obtidas em diferentes aparelhos, podem apresentar ligeiras diferenças entre si, com respeito à temperatura e a forma dos picos. Entretanto, as curvas obtidas por meio de qualquer instrumento moderno são perfeitamente reproduzíveis, de modo que se utilizando várias substâncias padrões, as áreas dos picos das curvas DTA podem ser relacionadas com os calores de reação, transição, fusão, polimerização, etc (Tabela 2.9). Reciprocamente, caso o calor da reação seja conhecido, pode-se determinar a quantidade de substância que reagiu (IONASHIRO, 2004).

Qualquer fenômeno físico ou químico que por ocasião de sua ocorrência provoque variações de entalpia pode ser detectado por estas curvas, e à medida que a sensibilidade destes instrumentos foi sendo aumentada, a aplicabilidade do método foi também sendo consideravelmente ampliada.

Em primeira aproximação, pode-se afirmar que a forma dos picos é determinada pela cinética de reação, embora possa sofrer simultaneamente, as influências de vários parâmetros experimentais. Fato idêntico ocorre com as áreas dos picos embora dependam fundamentalmente das variações de entalpia, podem ser modificadas pela ação de vários fatores instrumentais. A origem dos picos endo e exotérmico são provocadas por fenômenos físicos ou químicos (Tabela 2.8).

Tabela 2.8 – Variação de entalpia para fenômenos físicos e químicos.

Fenômeno	Variação de Entalpia	
	Endotérmico	Exotérmico
Físico		
Transição Cristalina	+	+
Fusão	+	-
Vaporização	+	-
Sublimação	+	-
Adsorção	-	+
Desadsorção	+	-
Absorção	+	-
Químico		
Desolvatação	+	-
Desidratação	+	-
Degradação Oxidativa	-	+
Oxidação em Atmosfera gasosa	-	+
Redução em atmosfera gasosa	+	-
Reações e Óxido redução	+	+
Reações no estado sólido	+	+

Fonte: Ionashiro, M. (2004)

Nas primeiras décadas que sucederam a descoberta da análise térmica diferencial, suas aplicações praticamente se restringiram à solução de problemas relacionados com cerâmica, metalurgia, edafologia (estudo dos solos com vistas ao cultivo) e geologia. Só a partir de 1923 é

que esta técnica passou a ser cada vez mais utilizada na resolução de problemas químicos. Atualmente a lista de aplicações cresceu rapidamente, de modo que hoje se pode afirmar que a análise térmica diferencial constitui valiosa fonte de informações em todos os setores da química (Tabela 2.9) (IONASHIRO, 2004).

2.9.5.4 – Aplicações da Análise Térmica em Química

Tabela 2.9 – Tipos de estudos, substâncias empregadas na Análise Térmica.

Substâncias	Tipos de Estudo
Catalisadores	Reações de decomposição
Polímeros	Diagrama de fase
Graxas Lubrificantes	Cinética de reação
Óleos e gorduras	Reações em estado sólido
Compostos de Coordenação	Catálise
Carboidratos	Calores de adsorção
Aminoácidos e proteínas	Calores de reação
Sais Hidratados	Calores de polimerização
Óxidos de metais e não metais	Calores de Sublimação
Carvão e petróleo	Calores de transição
Fibras Têxteis naturais e artificiais	Reações de Solvatação
Produtos Naturais	Reações Gás-Sólido
Substâncias orgânicas	Danos provocados por radiação

Fonte: Ionashiro, M. (2004)

2.9.6 – Diferenças entre DTA e DSC

Na DTA, é medida a diferença de temperatura entre a amostra e o material inerte de referência ($\Delta T = T_a - T_r$).

Na DSC com compensação de potência a amostra e o material referência são mantidas isotermicamente pelo uso de aquecedores individuais. O Parâmetro medido é a diferença na potência de entrada dos aquecedores, d ($\Delta Q/dt$ ou dH/dt).

Watson *et. al.* (1964) aparentemente foram os primeiros a usar o termo “Differential Scanning Calorimetry” (DSC) para descrever a técnica instrumental desenvolvido em 1963, pela Perkin Elmer Corporation. Nessa técnica a amostra e o material referência, ambos são mantidos isotermicamente pela aplicação de energia elétrica quando eles são aquecidos ou resfriados a

uma razão linear. A curva obtida é o registro do fluxo de calor dH/dt em mcal s^{-1} como função da temperatura.

No verdadeiro sentido termodinâmico, um pico endotérmico é indicado no sentido ascendente (aumento na entalpia), enquanto que um pico exotérmico é registrado na direção oposta. Em todos os aspectos a curva DSC parece muito semelhante à curva DTA, exceto a unidade do eixo da ordenada. Como na DTA, a área do pico da curva DSC é diretamente proporcional à mudança de entalpia.

$A = \Delta H(m/k)$, exceto que, k é independente da temperatura.

As principais vantagens das técnicas DTA ou DSC sobre a calorimetria clássica são:

1. Rapidez nas determinações,
2. Pouca massa de amostra,
3. Amostra pode ser sólida ou líquida,
4. Aplicável a processo de resfriamento e medidas sob alta pressão, e
5. Estudar diferentes tipos de reações químicas (IONASHIRO, 2004).

As desvantagens da técnica são:

1. Precisão e exatidão relativamente baixas (5% - 10% em muitos casos),
2. Não permitem determinar a entalpia de reações sobrepostas,
3. No caso da DTA, existe a necessidade de calibração em todo o intervalo de temperatura de interesse por que K ; é uma função da temperatura, e
4. Inexatidão na determinação da área do pico devido à mudança de linha base durante a transição ou reação.

É importante ressaltar que nenhuma grande precisão pode ser obtida sem um rígido controle das variáveis que afetam as curvas DTA ou DSC, alias que em muitos casos é extremamente difícil (IONASHIRO, 2004).

2.10 – Caracterização Estrutural por Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR), ^{13}C -RMN e Análise Quimiométrica.

A chamada radiação infravermelha corresponde aproximadamente à região do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. O segmento da janela espectral de utilidade para a análise de compostos orgânicos situa-se entre 4000 e 400 cm^{-1} , sendo que as regiões do infravermelho próximo ($14290 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) e do infravermelho distante

(700 – 200 cm^{-1}) também têm atraído a atenção (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000 *apud* CAMPESTRINI, 2007).

A espectroscopia de infravermelho é considerada um método de análise rápido e não destrutivo da amostra, que necessita o mínimo de preparação do material amostral e que encontra as mais diversas aplicações, desde fármacos até a indústria do petróleo, passando pela aplicação na área de alimentos e no auxílio a diagnósticos em medicina. Mais recentemente, trabalhos publicados revelam o uso da espectroscopia de infravermelho na distinção entre plantas transgênicas e até mesmo entre plantas clonadas e não clonadas (PETIBOIS *et al.*, 2001; PURCELL *et al.*, 2006; SMALL, 2006; VLACHOS *et al.*, 2006; XIE *et al.*, 2006 *apud* CAMPESTRINI, 2007).

Tendo surgido na década de 30, a técnica de espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) ganhou maior interesse somente durante a Segunda Guerra Mundial, a qual teve papel decisivo em dois grandes projetos, a síntese da penicilina e o desenvolvimento da borracha sintética (KATON, 1996). O FT-IR tem se mostrado um método globalmente aceito devida à sua alta reprodutibilidade físico-química, permitindo a análise estrutural de biomoléculas em função de suas características peculiares e únicas, que são exibidas no espectro de FT-IR e que constituem a impressão digital do composto em análise (DÉLÉRIS & PETIBOIS, 2003 *apud* CAMPESTRINI, 2007).

A Figura 2.13 ilustra exemplos de dois espectros FTIR de xantana e xantana esterificada reportados por Hamcerencu *et al.* (2007), na região compreendida de 1800 a 1200 cm^{-1} , cujas modificações foram mais significativas. Naturalmente, as bandas características de absorção do éster para a xantana foram registradas ($\nu_{\text{C=O}} = 1715\text{-}1730 \text{ cm}^{-1}$) e, em particular, a 1723 cm^{-1} ocorrem grupos piruvato ou acetato. O deslocamento do pico correspondente à carbonila, (1736 cm^{-1}) na xantana esterificada, e as demais variações observadas quando se compara os espectros confirmaram a mudança estrutural promovida pelo processo de esterificação.

Atualmente, a espectroscopia vibracional tem encontrado importantes aplicações na indústria alimentícia, principalmente no que se refere à análise e identificação de propriedades físicas e interações entre carboidratos, no estudo de óleos e gorduras comestíveis e no controle de qualidade de produtos industrializados, como sucos e refrigerantes (FERREIRA *et al.*, 2002; ČERNÁ *et al.*, 2003; VLACHOS *et al.*, 2006 *apud* CAMPESTRINI, 2007).

Com a crescente sofisticação das técnicas instrumentais de análise química, como o FT-IR, a ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H , impulsionada pelo avanço da tecnologia computacional, tem havido um aumento da necessidade de utilização de técnicas de tratamento

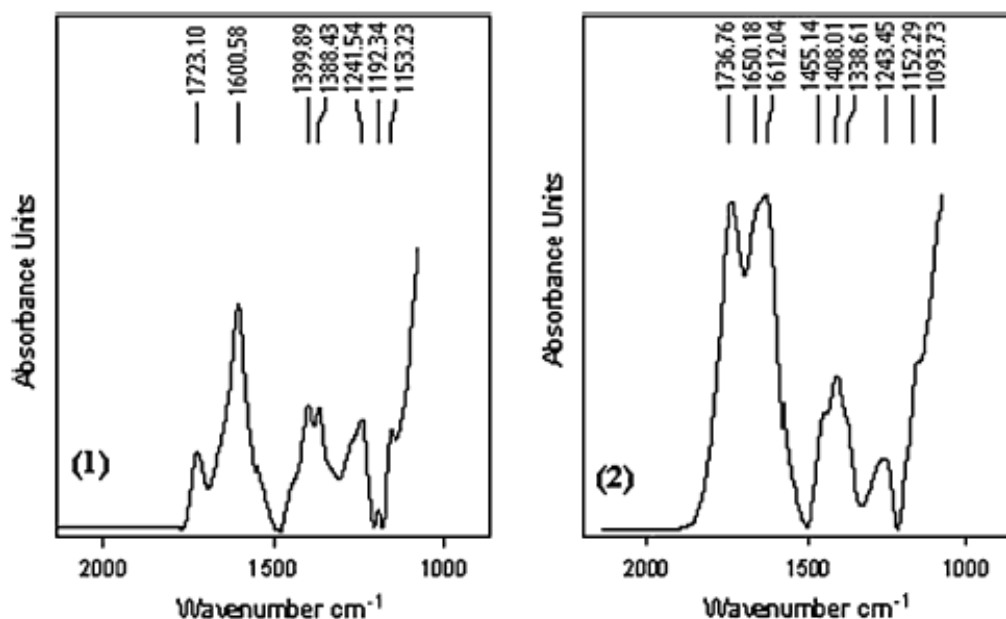


Figura 2.13 – Espectro FTIR de: (1) Xantana; (2) Xantana esterificada com AC – Acryloyl chloride (condições da reação: $T = 2 - 4^{\circ}\text{C}$; $t_r = 24 \text{ h}$).

Fonte: Hamcerencu *et al.* (2007)

de dados mais complexas do ponto de vista matemático. Nas últimas décadas, a análise multivariada foi introduzida no tratamento de dados químicos e vem, rapidamente, ganhando popularidade, dando origem a uma nova disciplina denominada quimiometria, uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada. Os métodos multivariados consideram a correlação entre muitas variáveis analisadas simultaneamente, permitindo a extração de uma quantidade maior de informações, muitas vezes impossível de ser obtida, quando analisadas variável a variável (FERREIRA *et al.*, 1999; SENA *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 2004 *apud* CAMPESTRINI, 2007).

Recentemente têm-se enfatizado os sistemas de análise multivariados, com destaque para a análise de componentes principais (PCA), que consiste em uma manipulação de uma matriz de dados com o objetivo de representar as variações presentes em diversas variáveis, pelo menor número de “fatores”. Trata-se de um método utilizado para projetar dados n -dimensionais em um espaço de menor dimensão. Isso é feito pelo cálculo de componentes principais e de combinações lineares das variáveis originais. PCA é um método exploratório, porque auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados, contrastando com estudos direcionados nos quais hipóteses prévias são testadas. É também capaz de separar informações importantes das redundantes e aleatórias (FERREIRA *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 2002 *apud* CAMPESTRINI, 2007).

A combinação de PCA e ^1H -RMN ou ^{13}C -RMN, permite, por exemplo, realizar estudos de metabolômica vegetal e análises de misturas complexas, como em alimentos, onde existe a possibilidade de discriminar a variedade dos frutos que dão origem a sucos e estabelecer seus parâmetros de qualidade, por exemplo (BELTON *et al.*, 1998; LE GALL *et al.*, 2001; CHOI *et al.*, 2004 *apud* CAMPESTRINI, 2007).

A Figura 2.14 ilustra espectros de ressonância (^1H -RMN em estado líquido) reportados por Hamcerencu *et al.* (2007), para uma amostra de xantana comercial, em três temperaturas (35, 60 e 85°C). A melhor resolução identificada, entre os espectros, visando à determinação dos grupamentos acetila e piruvato, foi para a maior temperatura (85°C) quando a xantana assume conformação desordenada. As gomas em geral, devido o histórico reológico incomum, formam soluções viscosas mesmo a baixas concentrações e, por conseqüência, têm o escoamento facilitado em temperaturas mais elevadas. Os autores seguiram avaliando também diferentes tempos de relaxação (2, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 s) entre os pulsos para verificar sua influência na definição das condições operacionais (Figura 2.15). Concluíram que a 85°C, 30 s, empregando padrão externo de acetato de sódio (3×10^{-3} M) e concentração do polissacarídeo em solução por volta de 3 g.L^{-1} atenuariam as dificuldades inerentes ao processo de interpretação.

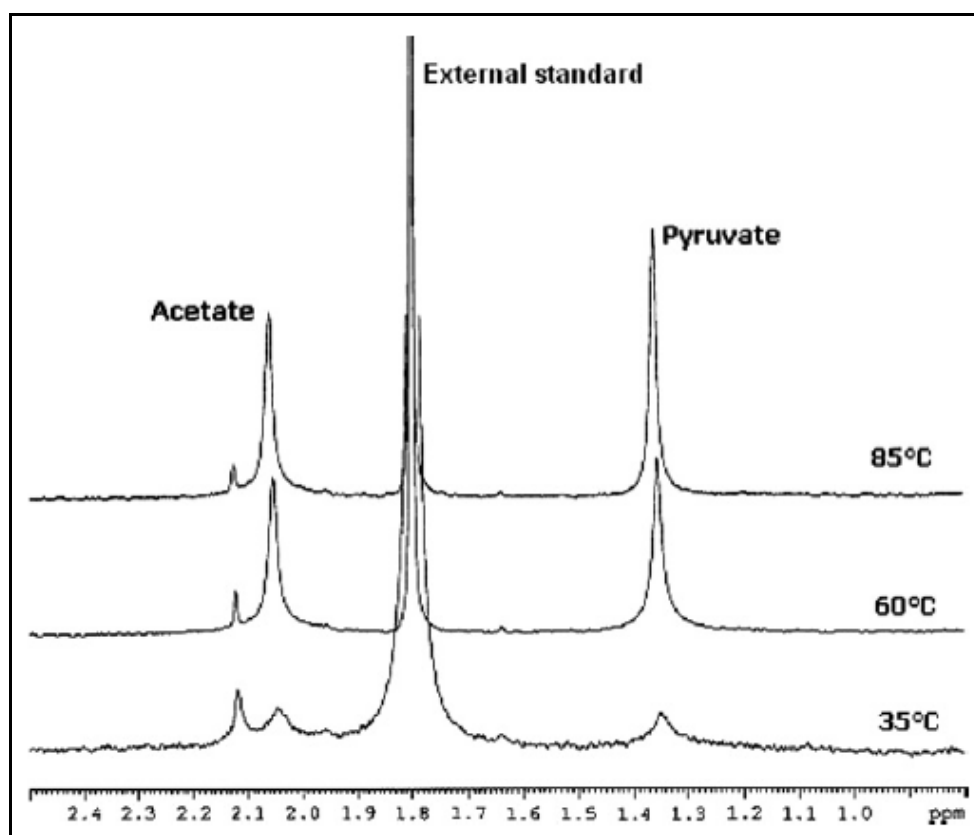


Figura 2.14 – Perfil da resolução do espectro ^1H -RMN da xantana em diferentes temperaturas ($C_P = 2,92 \text{ g.L}^{-1}$ em D_2O – acetato de sódio 3×10^{-3} M).

Fonte: Hamcerencu *et al.* (2007)

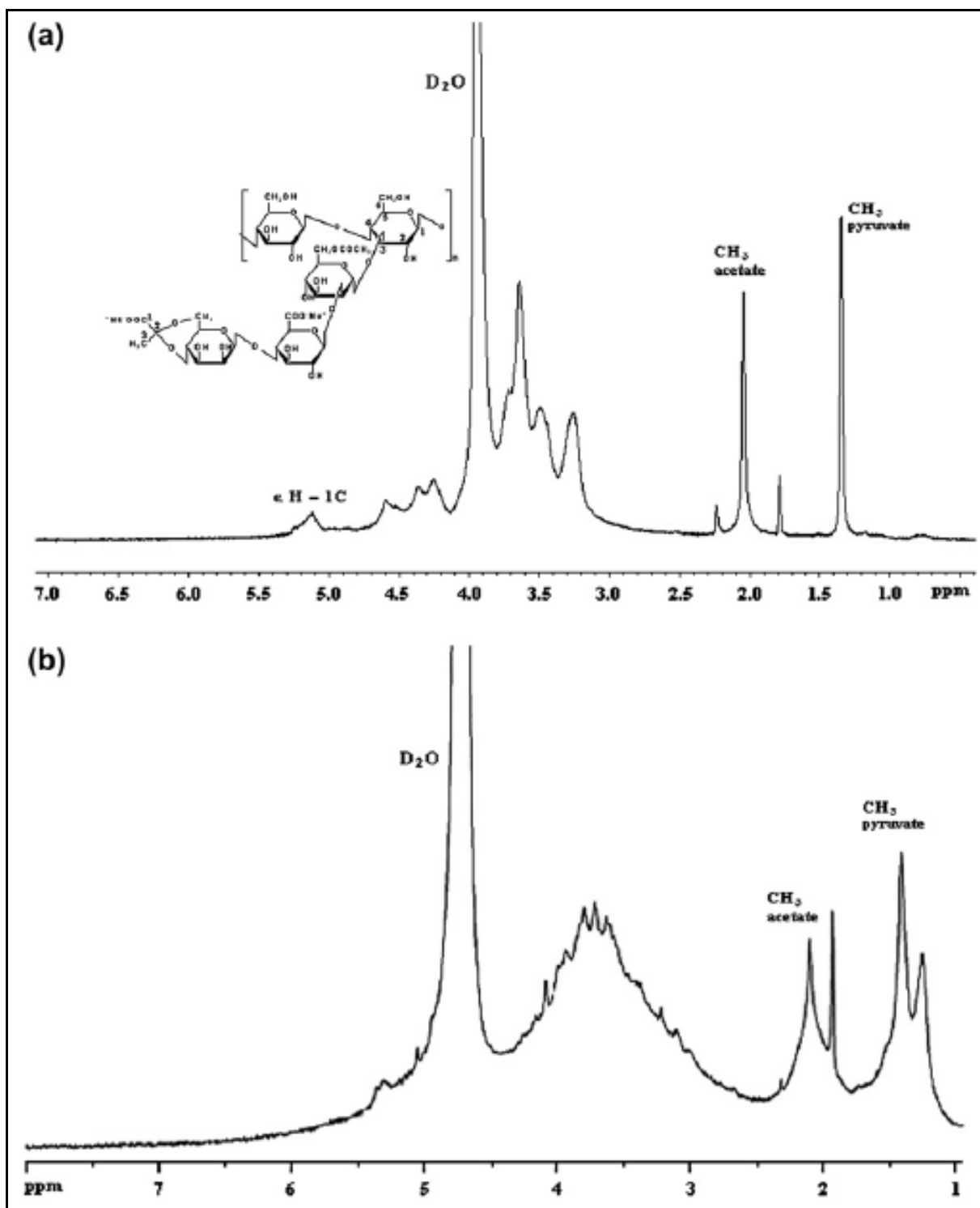


Figura 2.15 – Espectro RMN comparativo da *performance* da xantana em D₂O: (a) ¹H-RMN líquido ($C_p = 2,92 \text{ g.L}^{-1}$, $T = 85^\circ\text{C}$, $D_1 = 30 \text{ s}$); (b) ¹H HRMAS ($T = 25^\circ\text{C}$, $D_1 = 30 \text{ s}$).
Fonte: Hamcerencu *et al.* (2007)

Adicionalmente aos objetivos propostos, aos resultados alcançados pelos inúmeros autores citados, acrescenta-se o resgate essencial do conhecimento no campo da biotecnologia pela busca das diretrizes que impulsionaram a condução deste trabalho.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

Este capítulo visa, de forma sistemática e sequencial, à apresentação da metodologia analítica empregada, bem como, especifica o microrganismo e a matéria-prima utilizados, relata os testes preliminares efetuados objetivando a seleção da fonte de nitrogênio para efeito de suplementação do sistema de cultivo, descreve os planejamentos experimentais adotados e suas variáveis, relaciona os reagentes e equipamentos necessários ao desenvolvimento experimental. Uma vez definidas as condições de processo otimizadas, a etapa posterior foi realizar o estudo cinético, a fim de determinar parâmetros referentes ao modelo aplicado. Contudo, a finalização deste trabalho culmina com a caracterização estrutural da xantana em Laboratórios internos e externos à UFU (Universidade Federal de Uberlândia).

3.1 – Microrganismo e Meios de Manutenção

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.

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 18,0. O pH do meio foi ajustado para 6,0 e a esterilização foi a 110°C por 20 min. Os cultivos eram feitos a cada quinze dias e após crescimento a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas, a cultura era estocada sob refrigeração.

3.2 – Matéria-Prima

Os experimentos foram conduzidos empregando caldo de cana como fonte de sacarose. A cana utilizada foi gentilmente cedida pelos proprietários Srs. Ronaldo Sandre e Artur Lourenço Borges, cujas fazendas situam-se no Município de Araporã-MG. A cana foi coletada, moída, e o caldo filtrado foi armazenado em baixa temperatura (-5°C) durante toda a fase experimental sob condições assépticas.

3.3 – Composição dos Meios de Produção para os testes preliminares

Com base nos resultados alcançados por FARIA (2005) a partir de caldo de cana diluído a 25,0 g/L de sacarose; 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 (0,5 mL/L), outras fontes de nitrogênio foram avaliadas preliminarmente nesse estudo. Na situação relatada, FARIA (2005) realizou os ensaios em fermentador Biostat-B com 2 L de capacidade, contendo 1800 mL de meio de produção. Durante o processo, as condições de agitação e aeração foram mantidas em 800 rpm e 0,5 vvm (AMANULLAH *et al.* 1998; LIMA, 1999), a temperatura foi de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e o tempo de 24 horas.

Os meios de produção correspondentes aos ensaios preliminares foram constituídos por caldo de cana (sacarose), extrato de levedura, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 e antiespumante nas concentrações mencionadas anteriormente (FARIA, 2005). Cada fonte de nitrogênio foi avaliada separadamente nas seguintes concentrações em g/L: (NH_4NO_3 0,86; NaNO_3 1,82; citrato de amônio 2,42 ou glutamato de sódio 3,62). Durante o processo, a agitação e a aeração foram mantidas em 800 rpm e 0,5 vvm (ALVES, 1991; AMANULLAH *et al.*, 1998; LIMA, 1999; FARIA, 2005), a temperatura foi de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e o tempo de 24 horas. Os ensaios foram realizados em fermentador Biostat-B com 6,0 L de capacidade, contendo 4,0 L de volume útil. Para a condição pesquisada por FARIA (2005), o *scale-up* reproduziu resultados com pequenas variações consideradas desvio padrão.

3.4 – Planejamentos Experimentais

Após selecionar a fonte de nitrogênio mais apropriada, a etapa posterior consistiu no delineamento de projetos experimentais visando à minimização dos ensaios e proporcionando maior confiabilidade nos resultados obtidos para que análises estatísticas fossem executadas com sucesso. As Tabelas 3.1 e 3.3 mostram os níveis e as variáveis referentes à execução do primeiro

e segundo planejamento, sendo previamente definidos como composto central e fatorial, respectivamente. Nas Tabelas 3.2 e 3.4 pode-se conferir as matrizes planejamento experimental para valores reais e codificados das variáveis sob investigação. Para ambos, as respostas de interesse monitoradas durante o processo foram: concentração de goma (C_G) em g/L, rendimento relativo à formação de produto $Y_{p/s}$ (g.g^{-1}), e viscosidade aparente da solução de xantana a 1% (p/v) ($\mu_{G1\%}$) em cP.

Tabela 3.1 – Variáveis estudadas e seus níveis no primeiro planejamento experimental.

Variáveis	Níveis das variáveis				
	$-\alpha$ (1,287)	-1,0	0	+1,0	$+\alpha$ (1,287)
X_1	12,13	15,0	25,0	35,0	37,87
X_2	0,0	0,669	3,0	5,331	6,0
X_3	0,0	0,191	0,86	1,523	1,714

X_1 - Conc. sacarose [g/L]; X_2 - Conc. extrato de levedura [g/L]; X_3 - Conc. nitrato de amônio [g/L]

Tabela 3.2 – Matriz planejamento experimental para valores reais e codificados das variáveis X_1 , X_2 e X_3 .

Experimentos	X_1 valor codificado (valor real em g/L)	X_2 valor codificado (valor real em g/L)	X_3 valor codificado (valor real em g/L)
1	-1,0 (15,0)	-1,0 (0,669)	-1,0 (0,191)
2	-1,0 (15,0)	-1,0 (0,669)	+1,0 (1,523)
3	-1,0 (15,0)	+1,0 (5,331)	-1,0 (0,191)
4	-1,0 (15,0)	+1,0 (5,331)	+1,0 (1,523)
5	+1,0 (35,0)	-1,0 (0,669)	-1,0 (0,191)
6	+1,0 (35,0)	-1,0 (0,669)	+1,0 (1,523)
7	+1,0 (35,0)	+1,0 (5,331)	-1,0 (0,191)
8	+1,0 (35,0)	+1,0 (5,331)	+1,0 (1,523)
9	-1,287 (12,13)	0,0 (3,0)	0,0 (0,86)
10	+1,287 (37,87)	0,0 (3,0)	0,0 (0,86)
11	0,0 (25,0)	-1,287 (0,0)	0,0 (0,86)
12	0,0 (25,0)	+1,287 (6,0)	0,0 (0,86)
13	0,0 (25,0)	0,0 (3,0)	-1,287 (0,0)
14	0,0 (25,0)	0,0 (3,0)	+1,287 (1,714)
15	0,0 (25,0)	0,0 (3,0)	0,0 (0,86)
16	0,0 (25,0)	0,0 (3,0)	0,0 (0,86)

X_1 - Conc. sacarose [g/L]; X_2 - Conc. extrato de levedura [g/L]; X_3 - Conc. nitrato de amônio [g/L]

As equações de codificação abaixo representam a conversão das variáveis sob estudo, X_1 , X_2 e X_3 , na sua forma real e codificada, quando da idealização do primeiro planejamento.

$$\text{Concentração de sacarose } (X_1): C_{sac.} (adm.) = \frac{C_{sac. real} - 25,0}{10,0}$$

$$\text{Concentração de Extrato de Levedura } (X_2): C_{E.L} (adm.) = \frac{C_{E.L. real} - 3,0}{2,331}$$

$$\text{Concentração de Nitrato de amônio } (X_3): C_{N.A} (adm.) = \frac{C_{N.A. real} - 0,86}{0,666}$$

Com relação à faixa de valores estabelecidos para as variáveis X_1 , X_2 e X_3 no primeiro planejamento experimental foram atribuídos intervalos de $-\alpha$ a $+\alpha$ com base na literatura (ALVES, 1991; DE VUYST & VERMEIRE, 1994; UMASHANKAR *et al.*, 1996; LIMA, 1999; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; LETISSE *et al.*, 2003). Para o nível $-\alpha$ (-1,287 codificado) correspondente à concentração de extrato de levedura e nitrato de amônio adotou-se zero como valor real para verificar se tal condição influenciaria ou não as respostas estudadas. Os tratamentos estatísticos dos dados revelaram uma composição ótima para o meio de produção da goma xantana e apontou para a necessidade de se investigar, por exemplo, agitação e aeração, pois elas estão associadas a custos consideráveis no decorrer do processo. Surgiu, então, o 2º planejamento experimental fatorial com o objetivo de estimar a redução nos níveis de agitação e aeração empregados até então.

Tabela 3.3 – Variáveis estudadas e seus níveis no segundo planejamento experimental.

Variáveis	Níveis das variáveis		
	-1	0	+1
Agitação (rpm) - (X_4)	500	750	1000
Aeração (vvm) - (X_5)	0,25	0,50	0,75

Para o segundo planejamento, as equações de codificação abaixo representam a conversão das variáveis sob estudo, X_4 e X_5 , na sua forma real e codificada.

$$\text{Agitação } (X_4): \text{Agitação} (adm.) = \frac{\text{Agitação}_{real} - 750}{250}$$

$$\text{Aeração } (X_5): \text{Aeração} (adm.) = \frac{\text{Aeração}_{real} - 0,5}{0,25}$$

Tabela 3.4 – Matriz planejamento experimental para valores reais e codificados das variáveis X_4 , X_5 .

Experimentos	X_4 valor codificado (valor real em rpm)	X_5 valor codificado (valor real em vvm)
1	-1,0 (500)	-1,0 (0,25)
2	-1,0 (500)	0,0 (0,5)
3	-1,0 (500)	+1,0 (0,75)
4	0,0 (750)	-1,0 (0,25)
5	0,0 (750)	0,0 (0,5)
6	0,0 (750)	+1,0 (0,75)
7	+1,0 (1000)	-1,0 (0,25)
8	+1,0 (1000)	0,0 (0,5)
9	+1,0 (1000)	+1,0 (0,75)
10	0,0 (750)	0,0 (0,5)
11	0,0 (750)	0,0 (0,5)

X_4 - Agitação (rpm); X_5 - Aeração (vvm)

Tal como no primeiro planejamento experimental, a faixa de valores estabelecida para as variáveis X_4 e X_5 foram com base na literatura (SERRANO-CARREÓN *et al.*, 1998; LIMA, 1999; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; BORZANI, 2001; LETISSE *et al.*, 2003). Um processo biológico aeróbio necessita um correto dimensionamento do sistema de transferência de oxigênio, sem o qual dificilmente será competitivo. Por isso, houve uma particular preocupação na escolha dos valores de agitação e aeração para compor o segundo planejamento. Esse tratamento especial dado na execução deste projeto experimental deve-se ao fato de ocorrerem mudanças reológicas significativas ao longo da fermentação, motivo pelo qual o sistema requer agitação vigorosa.

Para a análise estatística das respostas, em ambos os planejamentos, os parâmetros com nível de significância maior que 10 %, num teste de hipótese utilizando t de Student, foram considerados não relevantes.

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

A determinação de nitrogênio e fósforo no caldo de cana bruto foi realizada, em laboratório terceirizado (SENAI-CETAL) empregando os métodos Kjeldahl e NBR 12772

(1992), respectivamente. O caldo bruto da cana apresentou 270 ± 20 ppm de nitrogênio total e $103,2 \pm 5,0$ ppm de fósforo total.

3.6 – Produção de Goma Xantana em Fermentador

Utilizou-se como inóculo, 10% (v/v) de um cultivo crescido sob agitação (150 rpm) em mesa agitadora, a temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, por 16 horas. O meio utilizado para preparação do inóculo era constituído em g/L: sacarose 20,0; extrato de levedura 3,0; NH_4NO_3 0,86 ; Na_2HPO_4 2,5; KH_2PO_4 2,5 (ALVES, 1991; SERRANO-CARREÓN *et al.*, 1998; LIMA, 1999). A concentração celular média do inóculo foi de $0,29 \pm 0,05$ g/L. Vale ressaltar que para qualquer ensaio realizado, procedeu-se ao desenvolvimento do inóculo conforme descrito acima.

Os ensaios foram realizados em fermentador Biostat-B com 6,0 L de capacidade, contendo 4,0 L de meio de produção.

O meio de produção correspondente ao primeiro planejamento composto central era constituído em g/L por: sacarose (12,13; 15,0; 25,0; 35,0 e 37,87), extrato de levedura (sem extrato; 0,669; 3,0; 5,331 e 6,0), NH_4NO_3 (sem NH_4NO_3 ; 0,191; 0,86; 1,523 e 1,714), Na_2HPO_4 (2,5), KH_2PO_4 (2,5) e antiespumante (0,5 mL/L). 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 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e o tempo de 24 horas.

Para o segundo planejamento fatorial o meio de produção era constituído em g/L por: sacarose 27,0; extrato de levedura 1,8; NH_4NO_3 0,8, Na_2HPO_4 (2,5 g/L), KH_2PO_4 (2,5 g/L) e antiespumante (0,5 mL/L). Durante o processo, a agitação e a aeração foram 500, 750 e 1000 rpm e 0,25, 0,5 e 0,75 vvm. A temperatura foi de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e o tempo de processo 24 horas.

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e com controle de pH pela adição de NaOH 1N. O *set point* da variável foi mantido no decorrer da fermentação igual a 7,5.

A esterilização da fonte de carbono e da solução mineral foi efetuada em separado sob condições diferenciadas de pressão e temperatura.

Ao longo das fermentações foram feitas observações microscópicas usando preparações coradas pelo método de Gram conforme Figura 3.2 visando investigar a presença de prováveis contaminantes. A Figura 3.2 mostra exclusivamente a presença de bastonetes Gram (-) com morfologia semelhante, não sendo observada outros tipos de células.

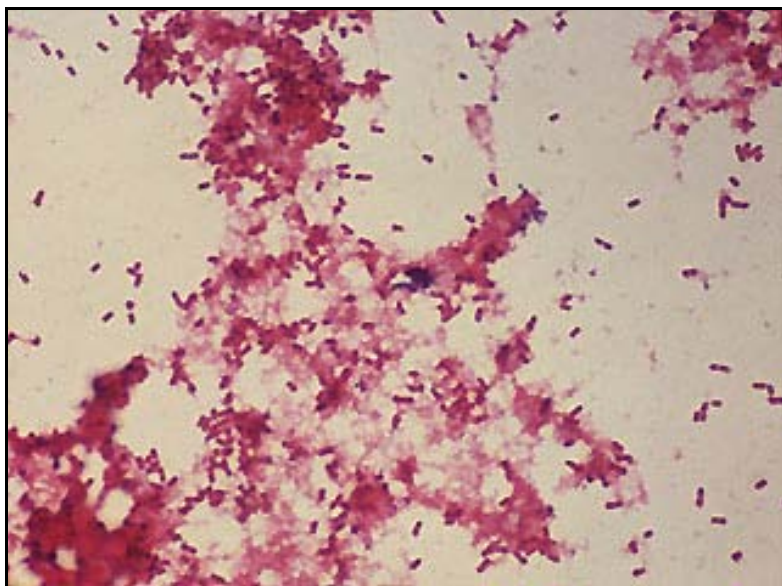


Figura 3.2 – Forma apresentada pela lâmina quando visualizada por meio de observação microscópica.

Fonte: google / imagens / *Xanthomonas maltophilia* (01/07/2005).

A Figura 3.3 representa a seqüência analítica percorrida pelas amostras retiradas do reator na forma de fluxograma.

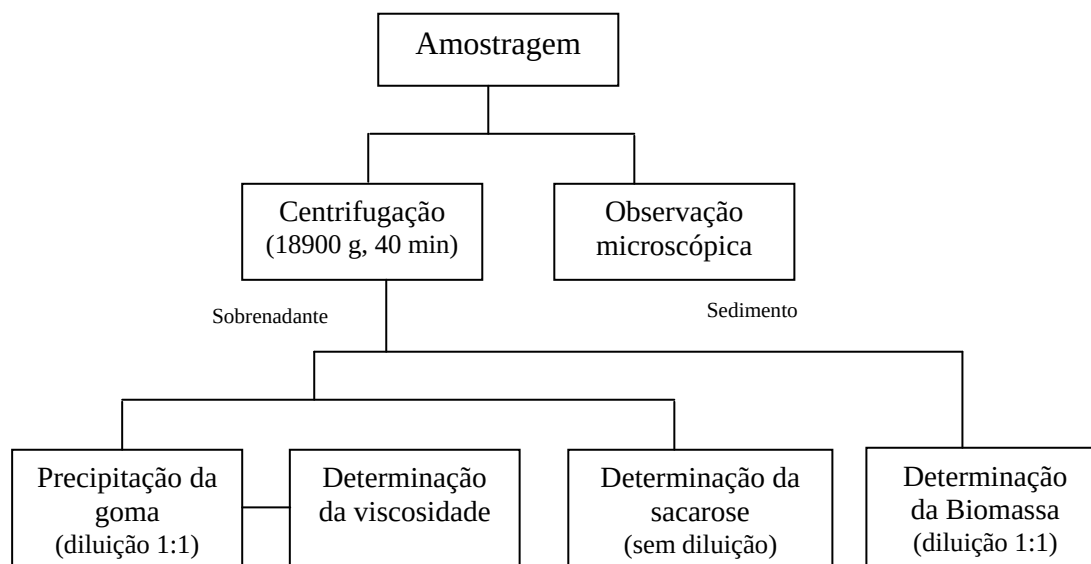


Figura 3.3 – Esquema simplificado do procedimento analítico para monitoramento das amostras após retiradas do fermentador.

Seguindo a metodologia adotada nas fermentações anteriores que originaram os dois planejamentos, para encerrar a fase experimental, verificou-se então a utilização de caldo de cana

hidrolisado por ação enzimática. A princípio, disponibilizar glicose ao invés de sacarose sugere redução no tempo de fermentação, ou possibilita elevar a concentração de substrato para valores maiores que os investigados sem, contudo, inviabilizar o sistema de produção da goma xantana. Inicialmente, caldo de cana diluído a 40 g/L de sacarose foi hidrolisado na presença de invertase (0,5 g/L) por um período de aproximadamente 40 minutos em banho termostatizado a 32°C. Não foi necessário correção de pH, pois o valor medido ($\cong 5,5$) encontrava-se dentro da faixa ótima de atuação da enzima. Posterior à hidrólise, procedeu-se separadamente à esterilização tanto da fonte de carbono quanto da solução contendo os nutrientes em g/L: extrato de levedura 3,0; NH_4NO_3 0,86; Na_2HPO_4 2,5; KH_2PO_4 2,5 e antiespumante 0,5 mL/L.

3.6.1 – Determinação dos Parâmetros Cinéticos.

Os parâmetros cinéticos foram determinados após conhecer o ponto ótimo estabelecido nos dois planejamentos experimentais. A coleta de dados (X, S e P) necessários para a construção das curvas de ajuste dos perfis $X=X(t)$, $S=S(t)$ e $P=P(t)$ ocorreu a cada 3 h durante um período de 24 h. Vale lembrar que X, S e P referem-se à concentração de célula, substrato e produto.

O modelo cinético investigado nesse estudo para a formação de produto e consumo de substrato foi proposto pelas equações de Luedeking-Piret [Eqs. (2) e (3)] (LUEDEKING & PIRET, 1959). A identificação dos parâmetros (μ_{max} , X_{max} , m , λ , α e β) foi realizada com auxílio do modelo de Weiss & Ollis (1980) composto por equações de Verhulst-Pearl e Luedeking-Piret dado por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \quad (1)$$

$$\frac{dP}{dt} = m \frac{dX}{dt} + \lambda X$$

sendo $m = \frac{1}{Y_{X/P}}$ (2)

$$-\frac{dS}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

sendo $\alpha = \frac{1}{Y_{X/S}}$ (3)

3.6.1.1 – Modelagem da Produção de Goma Xantana: Identificação de Parâmetros e Constantes.

A identificação dos parâmetros cinéticos (μ_{max} , X_{max} , m , λ , α e β) foi realizada a partir dos resultados experimentais da condição otimizada nos planejamentos, por regressão não-linear, usando um algoritmo de resposta múltipla (MARQUARDT, 1963). A integração do conjunto de equações diferenciais para o cálculo dos parâmetros por ajuste dos dados experimentais foi efetuada com auxílio de um algoritmo de Runge-Kutta de quarta-ordem. Os resíduos entre os valores calculados pelo modelo e os experimentais foram determinados pela minimização da soma dos quadrados dos resíduos (SRS) definida pela Equação (4).

$$SRS = \sum_{i=1}^N (y_{exp} - y_{theor})^2 \quad (4)$$

3.7 – Determinação do Coeficiente de Transferência de Oxigênio - $K_L a$

As medições de oxigênio dissolvido para determinação do Coeficiente de Transferência de Oxigênio ($K_L a$) foram realizadas para os experimentos pertencentes ao segundo planejamento experimental. O procedimento adotado para coleta de dados de oxigênio dissolvido no meio de produção ocorreu na ausência do inóculo, com prévia aferição do eletrodo seguida de medições sucessivas até atingir a saturação do meio (BORZANI, 2001). Os dados foram tratados por meio de regressão múltipla usando o Software *OriginPro* 7.5. A Equação (5) abaixo descreve a variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo:

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C^* - C) \quad (5)$$

Sendo: C^* – concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mmol/L), e

C – concentração de oxigênio dissolvido no instante t (mmol/L);

A solução do sistema fornece:

$$\int_{C=0}^{C=C^*} \frac{dC}{(C^* - C)} = \int_{t=0}^{t=t} K_L a dt$$

Rearranjando e integrando a Equação acima, tem-se:

$$\ln\left(\frac{C^* - C}{C^*}\right) = -K_L a.t$$

$$\ln\left(1 - \frac{C}{C^*}\right) = -K_L a.t$$

A Equação acima mostra a relação linear entre $\ln\left(1 - \frac{C}{C^*}\right)$ e o tempo. O coeficiente angular da reta fornece o valor de $K_L a$.

3.8 – Determinação da Biomassa Por 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, por três vezes, em solução salina 0,85% para completa eliminação dos componentes do meio e dos metabólitos. A quantificação celular foi feita por massa seca a $90 \pm 1^\circ\text{C}$, 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.

3.10 – 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 um campo centrífugo relativo de 18900 g por 40 minutos. O sobrenadante foi filtrado a vácuo em sucessivas membranas de acetato de celulose (Millipore) com porosidades de 5, 3, 1,2 e 0,8 μm , tratado com solução de KCl e o polímero recuperado por precipitação com etanol conforme Figura 3.4. Para 10 mL do

mosto diluído centrifugado, adicionam-se 3 mL de solução saturada de KCl e 30 mL de etanol absoluto, obtendo dessa forma, sob agitação, a goma (RAMÍREZ & 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 mantida em estufa à temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$.



Figura 3.4 – Formato apresentado pela goma momentos após sua precipitação.

3.11 – Avaliação do Comportamento Reológico

A caracterização reológica de soluções aquosas do biopolímero foi determinada com o auxílio do Viscosímetro Brookfield LVDV-III Ultra. Para tal, foram utilizados os dados de tensão cisalhante (τ), medidos a partir de taxas de deformação (γ), 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 obteve-se K (índice de consistência) e n (índice de comportamento) para as soluções de xantana, comercial (origem: Saporiti do Brasil) e otimizada neste trabalho, nas concentrações de 0,75% (m/v). Assim, a viscosidade aparente para um fluido do tipo “power-law” foi determinada a partir da Equação 6.

$$\mu_a = \frac{\tau}{\gamma} = K(\gamma)^{n-1} \quad (6)$$

* A caracterização reológica a 1% (m/v) não foi realizada por limitações existentes e, previamente averiguadas, em função da indisponibilidade de sensores de cisalhamento que contemplassem amplas faixas de viscosidade.

3.11.1 – Preparo das Soluções de Goma Xantana para Análise Reológica

Após secagem em estufa a 30°C, a goma foi acondicionada sob vácuo em dessecador para posterior preparo das suas soluções a 0,75% (m/v). Triturada na forma de pó, a goma possui aspecto semelhante ao amido de milho. O procedimento para hidratação das soluções ocorreu sob agitação magnética durante um período de aproximadamente 10 horas segundo López *et al.* (2003).

Todas as soluções do biopolímero foram preparadas em peso, considerando a umidade aproximadamente igual a 15%, para as gomas de origem comercial e a produzida neste trabalho.

3.11.2 – Determinação da viscosidade intrínseca das amostras de goma xantana

Soluções do polissacarídeo a 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025 e 0,01 g.L⁻¹ foram preparadas em solução aquosa de KCl 10⁻¹ M. A solução original (0,5 g.L⁻¹) foi mantida sob agitação a 150 rpm, a 25°C, por 18 horas. Para uma completa dissolução das amostras (xantana comercial e produzida em condições otimizadas), a solução foi ainda submetida a 60°C por 40 minutos, e após esta etapa, procedeu-se as demais diluições (LIMA, 1999).

Como a viscosimetria pode fornecer informações importantes a respeito da morfologia da partícula hidrodinâmica, os termos viscosimétricos concernem principalmente à contribuição do soluto no incremento de viscosidade do solvente.

O primeiro termo refere-se à relação entre a viscosidade do soluto e do solvente puro, portanto $\eta_{rel} > 1$ é adimensional. As medidas foram em viscosímetro capilar AVS 350 Schott e a η_{rel} foi obtida pela relação entre o tempo de fluência da solução e o tempo do solvente.

Viscosidade Relativa:

$$\eta_{rel.} = \frac{\eta}{\eta_0}$$

Viscosidade específica:

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

Viscosidade reduzida:

$$\eta_{red.} = \frac{\eta_{sp}}{C}$$

Viscosidade Intrínseca:

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right)$$

A viscosidade intrínseca é obtida pela extrapolação gráfica da relação da viscosidade reduzida com a concentração. Sua unidade é cm³/g (CGI) ou m³/Kg (SI). $[\eta]$ exprime o efeito de uma partícula isolada (sem influências de interações intermoleculares) sobre a viscosidade do solvente. Utilizou-se o Software *Statistica* 7.0 para efetuar as regressões lineares e obter os gráficos (η_{sp}/C) em função de C.

3.12 – Determinação do conteúdo de açúcar total do produto

Açúcares totais foram determinados pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), leitura efetuada em comprimento de onda de 490 nm, utilizando como padrão solução de glucose nas concentrações de 20-100 µg.mL⁻¹. As dosagens foram feitas em triplicatas.

* O perfil monossacarídico e a determinação da massa molecular da xantana produzida em condições otimizadas foram análises efetuadas no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

3.12.1 – Determinação da composição de açúcares neutros

Amostras de goma contendo 2 mg foram submetidas à hidrólise ácida total. A hidrólise foi realizada com ácido trifluoracético (TFA) 2 mol.L⁻¹ em tubo hermeticamente fechado, a 100°C, durante 5 horas. Após a hidrólise, o excesso de ácido foi removido por evaporação (BIERMANN, 1989). O material hidrolisado foi lavado duas vezes com água destilada, e esta evaporada.

Os monossacarídeos resultantes da hidrólise ácida total foram reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH₄) em temperatura ambiente por 16h em meio aquoso (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Os íons hidreto (H⁻) fornecidos pelo agente redutor (NaBH₄) promovem redução dos grupamentos carbonila dos monossacarídeos, formando alditóis.

Em seguida adicionou-se resina Lewatit S-100 (resina trocadora de cátions na forma ácida) para decompor o excesso de agente redutor e remover os cátions Na⁺.

A solução foi filtrada em algodão e o filtrado evaporado até a secura. Lavagens sucessivas com 3 mL de metanol (3 vezes) foram feitas para remover o ácido bórico remanescente por co-distilação, na forma de borato de trimetila.

Os alditóis secos resultantes foram acetilados com piridina (agente catalisador) - anidrido acético (agente acetilante) (1:1 v/v), em tubo de hidrólise hermeticamente fechado, por 16 h a 25° C (WOLFROM; THOMPSON, 1963a).

Este processo foi interrompido por adição de gelo moído ao sistema, e os acetatos de alditóis foram extraídos com 1 mL de clorofórmio. A piridina residual foi complexada com solução aquosa de sulfato de cobre (CuSO_4) a 5%, sendo assim separada da fase clorofórmica e eliminada por sucessivas e intercaladas lavagens com água destilada e CuSO_4 .

A fase clorofórmica contendo os acetatos de alditóis foi coletada, e após secura, a amostra foi ressolubilizada em acetona para ser analisada por cromatografia líquido-gasosa (GLC).

As análises por GLC foram efetuadas em cromatógrafo gasoso Hewlett Packard modelo 5890 A Série II, com detector de ionização de chama (FID) e injetor à temperatura de 250°C, coluna capilar DB-210 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno), com espessura de filme de 0,25µm a 220°C, e nitrogênio como gás de arraste em um fluxo de 2,0 mL.min⁻¹.

3.12.2 – Determinação de açúcares ácidos

A dosagem de ácidos urônicos foi realizada pelo método de Filisetti-Cozzi & Carpita (1991), tendo como solução padrão ácido glucurônico nas concentrações de 20-100 µg.mL⁻¹ e leitura em 525 nm. As dosagens foram feitas em triplicatas.

3.13 – Análise por cromatografia de exclusão estérica de alta pressão e determinação da massa molecular

A amostra foi solubilizada em solução de nitrito de sódio (NaNO_2) 0,1 mol.L⁻¹ contendo azida de sódio (NaN_3) 200 ppm, em concentração de 1 a 3 mg.mL⁻¹, e filtrada em membrana de acetato de celulose (Millipore) com porosidade de 0,2 µm.

A amostra foi injetada em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) Waters, equipado com um detector de índice de refração diferencial (RI) Waters modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz a laser em multiângulos (MALLS) Wyatt Technology modelo Dawn DSP com 18 canais, acoplados em série. Utilizou-se 4 colunas de gel permeação Waters em série, com limites de exclusão de 7.10⁶, 4.10⁵, 8.10⁴ e 5.10³ g.mol⁻¹. As análises

foram efetuadas a 25°C utilizando como eluente uma solução de NaNO_2 0,1 mol.L⁻¹ contendo NaN_3 200 ppm, com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, monitorado através de bomba peristáltica Waters 515.

A taxa de variação do índice de refração com a concentração (dn/dc) foi determinada utilizando cinco concentrações diferentes. Para isto, foi preparada uma solução na concentração de 1 mg.mL⁻¹ em NaNO_2 0,1 mol.L⁻¹ contendo NaN_3 (200 ppm), filtrada em membrana de 0,22 µm, sendo então diluída. A massa molecular foi determinada a partir do perfil de eluição e do valor de dn/dc através de cálculos efetuados pelo software ASTRA.

3.14 – Análises Térmicas (TGA/DTA)

Experimentos não-isotérmicos para obtenção das curvas TGA/DTA foram efetuados pelo Instituto de Química (UFU), em módulo termogravimétrico Shimadzu (detector 60H), acoplado a um analisador térmico, utilizando-se razão de aquecimento de 20°C min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, com vazão da ordem de 30 mL.min⁻¹. As massas de amostras requeridas (xantana comercial e xantana isolada a partir de condições otimizadas) foram da ordem de 5,5 mg. A temperatura máxima foi de 600°C, em suporte de amostra de alumínio.

3.15 – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises espectroscópicas de infravermelho foram executadas na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia. Amostras de xantana comercial, xantana isolada a partir de condições otimizadas e obtida a partir do caldo de cana hidrolisado foram analisadas em equipamento Bruker Equinox 55, operando em janela espectral de 400 a 4000 ondas.cm⁻¹, com 32 varreduras/amostra, resolução de 4 ondas.cm⁻¹ e velocidade de escaneamento do detector DTGS igual a 10 KHz. Foram adquiridos sequencialmente três espectros para cada amostra, os quais foram processados e analisados com auxílio do Software *OriginPro* 7.5.

3.16 – Determinação por RMN ¹H

Os espectros de RMN ¹H da goma xantana, produzida em condições otimizadas, foram determinados em Espectrômetro Bruker 250 MHz no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. As análises foram realizadas nas seguintes temperaturas 25°C, 50°C, 70°C e 90°C. O procedimento adotado, pela Central Analítica, na obtenção dos espectros disponíveis no relatório de resultados consta que aproximadamente 20 mg de amostra foi solubilizada em 0,6 mL de água deuterada (D₂O).

Capítulo 4 - Resultados e Discussões

4.1 – Testes Preliminares

Como se sabe, os processos fermentativos, na sua grande maioria, requerem suplementação de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, além daqueles freqüentemente adicionados em concentrações menores, como: Na, K, Ca, Fe, Cu, Mg, Mn e Co (BORZANI, 2001). Nessa direção, anteriormente ao estudo da otimização das variáveis, concentração de sacarose, concentração de extrato de levedura, concentração de nitrato de amônio, agitação e aeração, optou-se pela verificação do desempenho de outras fontes de nitrogênio no meio de produção. Dentre elas, destaca-se: nitrato de amônio, citrato de amônio, glutamato de sódio e nitrato de sódio.

Os valores obtidos para a conversão de substrato a produto ($Y_{P/S}$) avaliando como fontes de nitrogênio nitrato de amônio, citrato de amônio, glutamato de sódio e nitrato de sódio foram 0,579; 0,461; 0,270; 0,500, respectivamente.

O nitrogênio por ser efetivamente necessário como fator de crescimento celular e até mesmo importante durante a fase de produção, tem atraído a atenção dos pesquisadores no que se refere à sua origem inorgânica ou orgânica e quanto a concentração ótima a ser empregada. Alves (1991), a partir de um meio sintético utilizando 20,0 g/L de glicose como substrato, testou como fontes nitrogenadas, nitrato de amônio, sulfato de amônio, peptona e ácido glutâmico, de forma que a concentração de nitrogênio no meio correspondesse a 0,7 g/L. Os melhores resultados comparativamente alcançados por Alves (1991), em termos de produtividade e viscosidade do meio fermentado, foram para o meio no qual o nitrato de amônio era a fonte nitrogenada. Posteriormente, observou também a influência determinante da concentração inicial de nitrogênio presente no meio de cultivo sobre a produção de goma xantana. Testando várias concentrações de nitrogênio, concluiu-se que, adotando 0,3 g/L inicialmente obter-se-ia um efeito benéfico sobre a qualidade do produto e fator de rendimento $Y_{P/S}$ igual a 0,59 g.g⁻¹.

Souw & Demain (1979) *apud* Alves (1991) ao comparar diferentes aminoácidos, uréia, sais de amônio e nitrato de sódio como fontes nitrogenadas, para a formação de goma xantana por *X. campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459, obtiveram melhores resultados, em termos de concentração final de produto e viscosidade do mosto, quando nitrato de amônio e glutamato foram avaliados. Este último, inclusive, com resultados ligeiramente superiores.

A avaliação das fontes de nitrogênio revelou pela conversão de substrato a produto que o nitrato de amônio é realmente uma opção vantajosa para suplementação do sistema de cultivo empregado neste trabalho.

4.2 – Análise do 1º Planejamento Experimental

Acerca dos resultados apresentados na Tabela 4.1 referente ao projeto experimental constituído de três variáveis (concentração de sacarose X_1 , concentração de extrato de levedura X_2 e concentração de nitrato de amônio X_3) totalizando dezesseis experimentos, algumas considerações relacionadas à influência destas variáveis nas respostas (concentração de goma, conversão de substrato a produto e viscosidade da goma na concentração de 1% a $0,75\text{ s}^{-1}$) foram relevantes. Como pode ser observado, os experimentos 3 e 16 quando comparados, forneceram, a menor e a maior concentração de goma, respectivamente, num conjunto de condições operacionais adversas, onde o esperado seria obter maiores concentração de goma, $Y_{P/S}$ e viscosidade para experimentos os quais a concentração da fonte de carbono, ou seja, a concentração de sacarose estivesse presente no seu nível ($+\alpha$) correspondente a 37,87 g/L. No entanto, sabe-se que esse raciocínio linear, cartesiano não deve ser aplicado para processos fermentativos complexos pois, uma série de fatores interligados determinam o comportamento do sistema. Ainda com relação aos experimentos 3 e 16, X_1 ao passar do nível -1,0 (15,0 g/L) para 0,0 (25,0 g/L) produziu ganhos reais em todas as respostas, porém, esse aumento não foi constatado em termos de concentração celular, haja visto que, o crescimento microbiano alcançado foi 2,435 g/L e 2,659 g/L, respectivamente. Ao que tudo indica, parece evidente a existência de um limite para o aumento da concentração inicial da fonte de carbono, principalmente, quando analisamos e comparamos os ensaios 10 e 16, pois, um salto expressivo na concentração de sacarose (25,0 para 37,87) não foi capaz de gerar respostas mais significativas.

Os experimentos 11 e 13 possuem uma função especial dentro do planejamento, pois têm como finalidade averiguar os efeitos provocados nas respostas pela ausência de extrato de levedura e nitrato de amônio, respectivamente. Processos fermentativos que utilizam caldo de cana-de-açúcar como matéria-prima, em geral, são menos onerosos e requerem mínima suplementação do meio, tendo em vista o número de constituintes disponíveis para atender às necessidades nutricionais do microrganismo, a fim da biossíntese do produto. Em relação ao extrato de levedura, seu custo é dos maiores e pode tornar-se inviável, particularmente para instalações de grande porte, a menos que isto signifique um enorme ganho econômico na

recuperação do produto, ou preserve alguma característica fundamental, necessariamente de alto valor agregado (BORZANI, 2001). Quanto à presença de nitrogênio no caldo de cana, sua concentração pode oscilar e com frequência sais de nitrogênio são adicionados ao meio de cultura. Nesse estudo, tanto o ensaio 11 quanto o 13 foram realizados na ausência de extrato de levedura ou nitrato de amônio e, ainda assim, produziram resultados expressivos para C_G , $Y_{P/S}$, $\mu_{1\%}$. No entanto, se comparados, ao ensaio 16 (ponto central), verifica-se que, a concentração de extrato de levedura e a concentração de nitrato de amônio ao passar do nível codificado (-1,287 para 0,0) elevaram significativamente as respostas, deixando claro o benefício da adição de tais constituintes.

A Tabela 4.1 traz ainda informações importantes com relação ao ponto central das variáveis, X_1 (25,0 g/L), X_2 (3,0 g/L) e X_3 (0,86 g/L), representado em duplicata pelos ensaios 15 e 16, sendo, sem dúvida, a melhor condição obtida para as respostas, C_G (15,8 g/L de biopolímero), $Y_{P/S}$ (0,632 g.g⁻¹), $\mu_{1\%}$ (22800 cP), no contexto definido pelo primeiro planejamento. As análises estatísticas utilizando a técnica da superfície de resposta confirmaram um ponto ótimo em torno do ponto central. Vale salientar que todos os 16 ensaios foram realizados em duplicata e os valores apresentados na Tabela 4.1 são médios.

Tabela 4.1 – Variáveis independentes X_1 , X_2 e X_3 e suas respostas C_G , $Y_{P/S}$, $\mu_{1\%}$.

Experimentos	X_1	X_2	X_3	Conc.Goma [g/L]	$Y_{P/S}$ [g.g ⁻¹]	Viscosidade [cP] a 0,75 s ⁻¹
1	15,0	0,669	0,191	3,1	0,218	8125
2	15,0	0,669	1,523	3,3	0,223	8965
3	15,0	5,331	0,191	2,7	0,180	6654
4	15,0	5,331	1,523	3,0	0,200	7296
5	35,0	0,669	0,191	14,1	0,403	7789
6	35,0	0,669	1,523	14,5	0,414	8259
7	35,0	5,331	0,191	13,1	0,374	6789
8	35,0	5,331	1,523	13,9	0,397	7245
9	12,13	3,0	0,86	3,0	0,247	7125
10	37,87	3,0	0,86	15,5	0,409	7896
11	25,0	0,0	0,86	13,5	0,540	19500
12	25,0	6,0	0,86	11,9	0,476	17562
13	25,0	3,0	0,0	10,5	0,420	19123
14	25,0	3,0	1,714	13,9	0,556	16587
15	25,0	3,0	0,86	15,2	0,608	22800
16	25,0	3,0	0,86	15,8	0,632	22350

X_1 - Conc. sacarose [g/L]; X_2 - Conc. extrato de levedura [g/L]; X_3 - Conc. nitrato de amônio [g/L]

Alves (1991) constatou a partir de seus experimentos a inexistência de uma relação carbono/nitrogênio ótima, aplicável a todos os casos, visto que, para cada concentração inicial de substrato utilizada, há uma melhor relação, consequência de uma concentração ótima de nitrogênio, que favorece inclusive a formação do biopolímero.

As Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4 mostram os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância (p) menores que 10% para as seguintes respostas: concentração de goma, conversão de substrato a produto e viscosidade da goma na concentração de 1% a 0,75 s⁻¹.

Tabela 4.2 – Regressão múltipla para a Concentração de Goma considerando o 1º planejamento.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	Desvio	t(9)	p
Termo independente	15,331	0,409	37,458	0,000000
X ₁	5,267	0,210	25,079	0,000000
(X ₁) ²	-3,594	0,301	-11,923	0,000001
X ₂	-0,385	0,210	-1,835	0,099736
(X ₂) ²	-1,512	0,301	-5,016	0,000723
X ₃	0,537	0,210	2,557	0,030819
(X ₃) ²	-1,814	0,301	-6,017	0,000198
$R^2 = 0,989$				

As Equações 4.1, 4.2 e 4.3 representam os modelos ajustados para a concentração de goma, conversão de substrato a produto e viscosidade da goma na concentração de 1%, respectivamente. Analisando a Equação 4.1 pode-se verificar que as variáveis isoladas X₁, X₂ e X₃ compõem o modelo matemático para a concentração de goma, e dentre elas, X₁ contribui consideravelmente para o aumento desta resposta, desde que, assumam valores codificados superiores ao nível central (0,0). O sinal negativo atribuído ao coeficiente da variável X₂ diminui a concentração de goma, a menos que assumam valores codificados inferiores ao nível (0,0). Para X₃, valores inferiores ao nível central, diminuem a concentração de goma e valores superiores ao nível central, aumentam a concentração de goma. A Tabela 4.1 confirma a interpretação dada ao modelo deixando evidente que maiores concentrações de sacarose (X₁) produzem maiores concentrações de goma. É claro também que há um limite para esse aumento de X₁, determinado pelo custo/benefício.

$$C_g = 15,331 + 5,267X_1 - 3,594(X_1)^2 - 0,385X_2 - 1,512(X_2)^2 + 0,537X_3 - 1,814(X_3)^2 \quad (4.1)$$

O ponto de otimização obtido por meio do *Software Maple V Release 4* para maximizar a concentração de goma foi:

$X_1 = 0,7370$ (32,370 g/L sacarose)

$X_2 = -0,1514$ (2,647 g/L extrato de levedura)

$X_3 = 0,1632$ (0,969 g/L NH_4NO_3)

Substituindo o ponto ótimo na Equação 4.1, a concentração de goma otimizada alcançou 17,324 g/L. A Figura 4.1 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_1 e X_2 para a concentração de goma. Por se tratar de um planejamento que visa otimizar três variáveis de processo, elas serão apresentadas graficamente duas a duas junto à resposta avaliada. Sendo assim, a Figura 4.2 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_1 e X_3 , e a Figura 4.3 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_2 e X_3 . A região de otimização pode ser visualizada pela cor marrom tanto na superfície quanto no contorno. Nas curvas de contorno ainda é possível delimitar a região que produz as máximas respostas e explorar experimentalmente situações em torno do ponto ótimo visando minimizar custos. No final desta seção, será apresentada a Tabela 4.5 mostrando a região de otimização por meio de intervalos obtidos a partir das curvas de contorno (X_1)x(X_2), (X_1)x(X_3) e (X_2)x(X_3) para cada resposta.

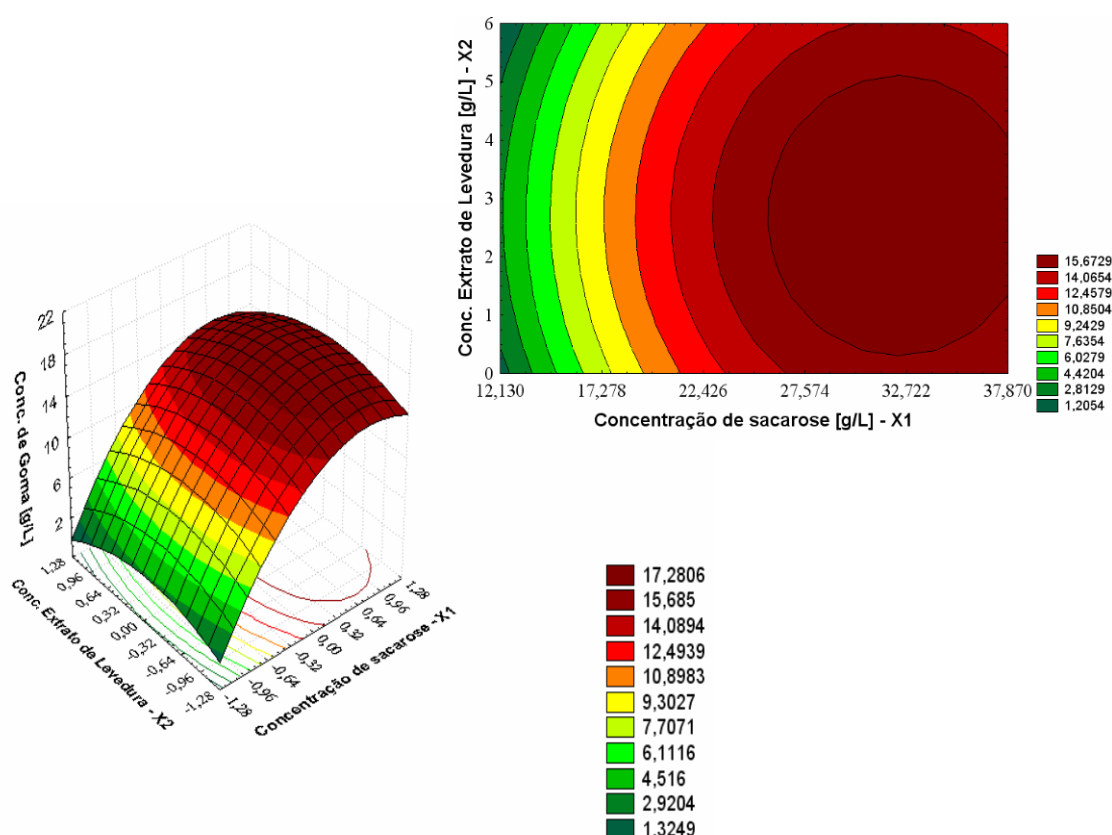


Figura 4.1 – Superfície de resposta e curva de contorno para a Concentração de Goma em função de X_1 e X_2 .

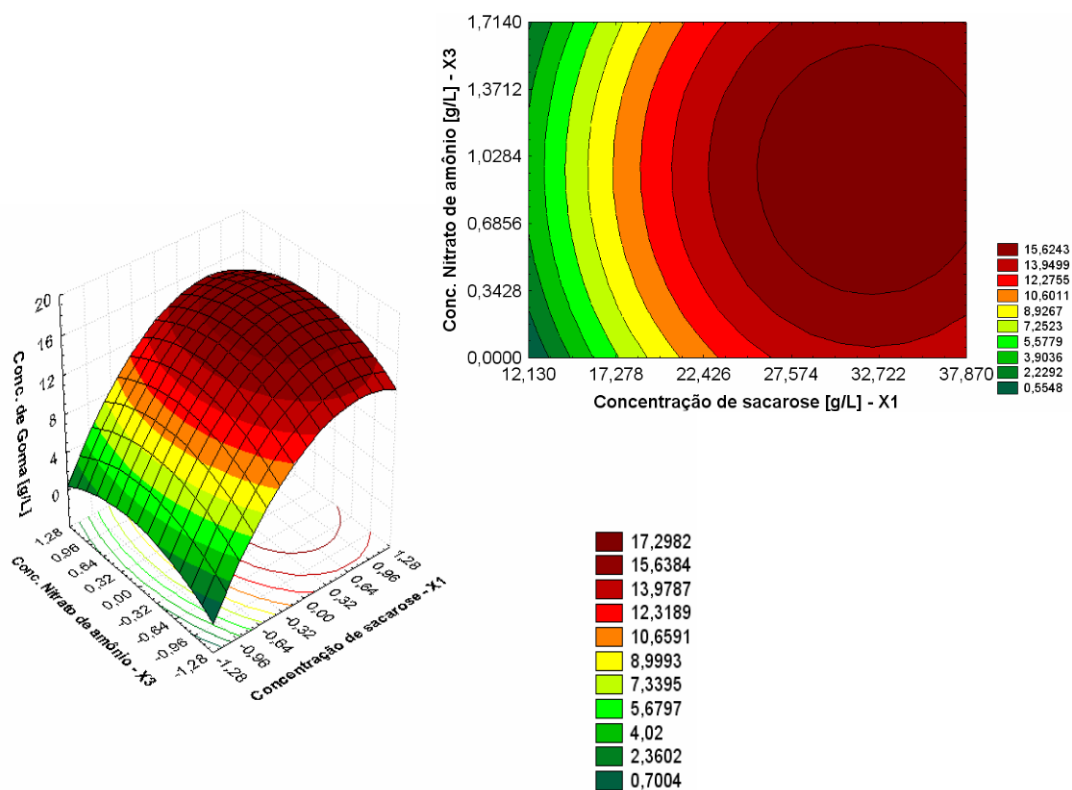


Figura 4.2 – Superfície de resposta e curva de contorno para a Concentração de Goma em função de X_1 e X_3 .

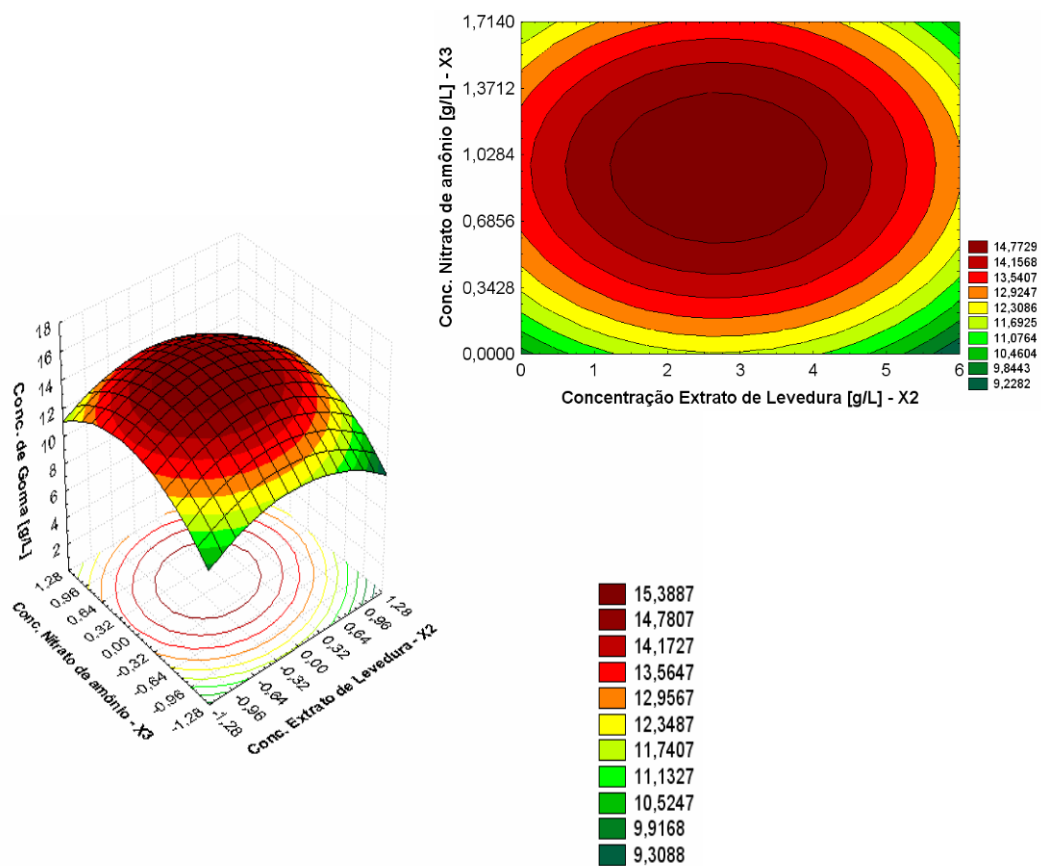


Figura 4.3 – Superfície de resposta e curva de contorno para a Concentração de Goma em função de X_2 e X_3 .

A Tabela 4.3 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância menores que 10% para a conversão de substrato a produto.

Tabela 4.3 – Regressão múltipla para a Conversão $Y_{P/S}$ considerando o 1º planejamento.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	Desvio	t(9)	p
Termo independente	0,6181	0,01742	35,487	0,000000
X_1	0,08622	0,00894	9,648	0,000005
$(X_1)^2$	-0,1743	0,01283	-13,583	0,000000
X_2	-0,01674	0,00894	-1,873	0,093864
$(X_2)^2$	-0,06562	0,01283	-5,115	0,000632
X_3	0,0207	0,00894	2,315	0,045879
$(X_3)^2$	-0,07769	0,01283	-6,056	0,000189
$R^2 = 0,975$				

A conversão $Y_{P/S}$ é uma resposta derivada da concentração de goma, sendo assim, um raciocínio similar será também aplicado para a Equação 4.2 com relação aos efeitos das variáveis isoladas X_1 , X_2 e X_3 que compõem o modelo matemático ajustado. As variáveis X_1 e X_3 possuem coeficientes de regressão com sinais positivos, logo, para aumentar a resposta conversão, basta apenas, utilizar os seus níveis acima do ponto central conforme a faixa de valores especificada para o planejamento. Em se tratando de X_2 (concentração de extrato de levedura), o sinal negativo do coeficiente associado a níveis abaixo do ponto central gera aumento na conversão. A Tabela 4.1 confirma a interpretação dada ao modelo deixando evidente que maiores concentrações de sacarose (X_1) produzem maiores conversões.

$$Y_{P/S} = 0,6181 + 0,08622X_1 - 0,1743(X_1)^2 - 0,01674X_2 - 0,06562(X_2)^2 + 0,0207X_3 - 0,07769(X_3)^2 \quad (4.2)$$

O ponto de otimização obtido pelo *Software Maple V Release 4* para maximizar a conversão $Y_{P/S}$ foi:

$X_1 = 0,2472$ (27,472 g/L sacarose)

$X_2 = -0,1206$ (2,720 g/L extrato de levedura)

$X_3 = 0,1323$ (0,948 g/L NH_4NO_3)

A conversão $Y_{P/S}$ otimizada a partir da Equação 4.2 forneceu um valor de $0,631 \text{ g.g}^{-1}$ quando da substituição do ponto ótimo. As Figuras 4.4, 4.5 e 4.6 exibem as superfícies de resposta e as curvas de contorno para X_1 e X_2 , X_1 e X_3 , X_2 e X_3 , que por sua vez, comprovam o ponto encontrado.

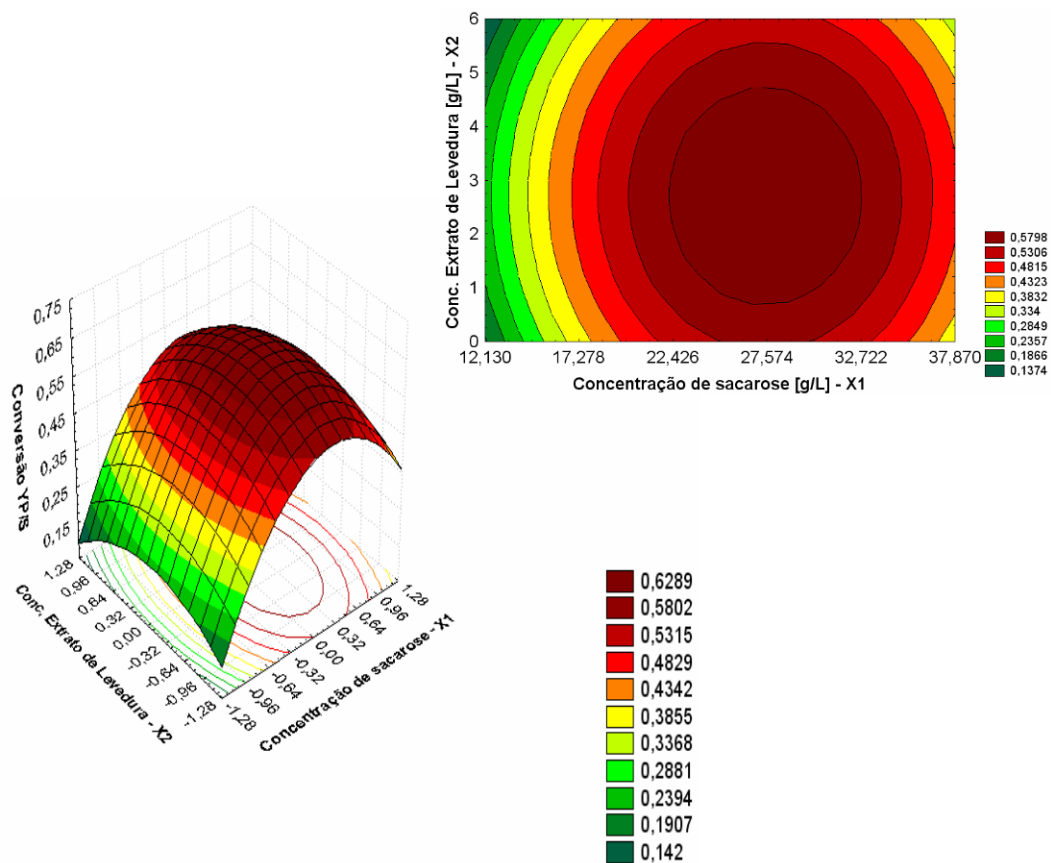


Figura 4.4 – Superfície de resposta e curva de contorno para $Y_{p/s}$ em função de X_1 e X_2 .

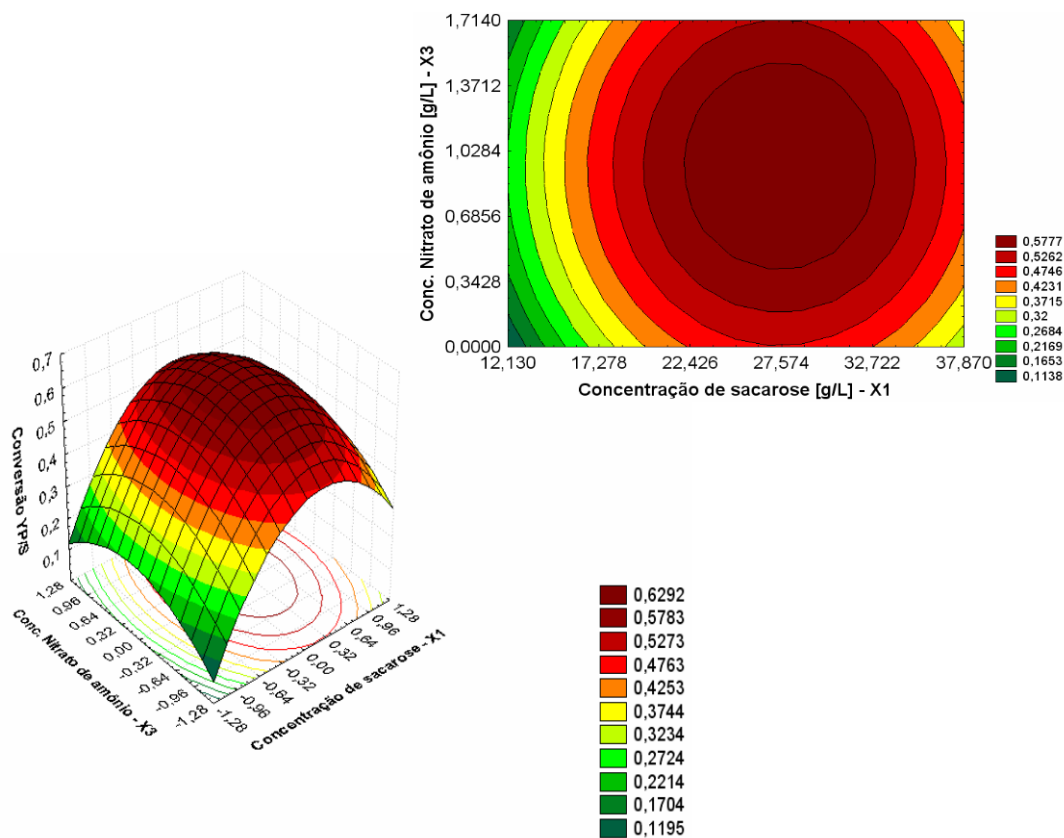


Figura 4.5 – Superfície de resposta e curva de contorno para $Y_{p/s}$ em função de X_1 e X_3 .

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.

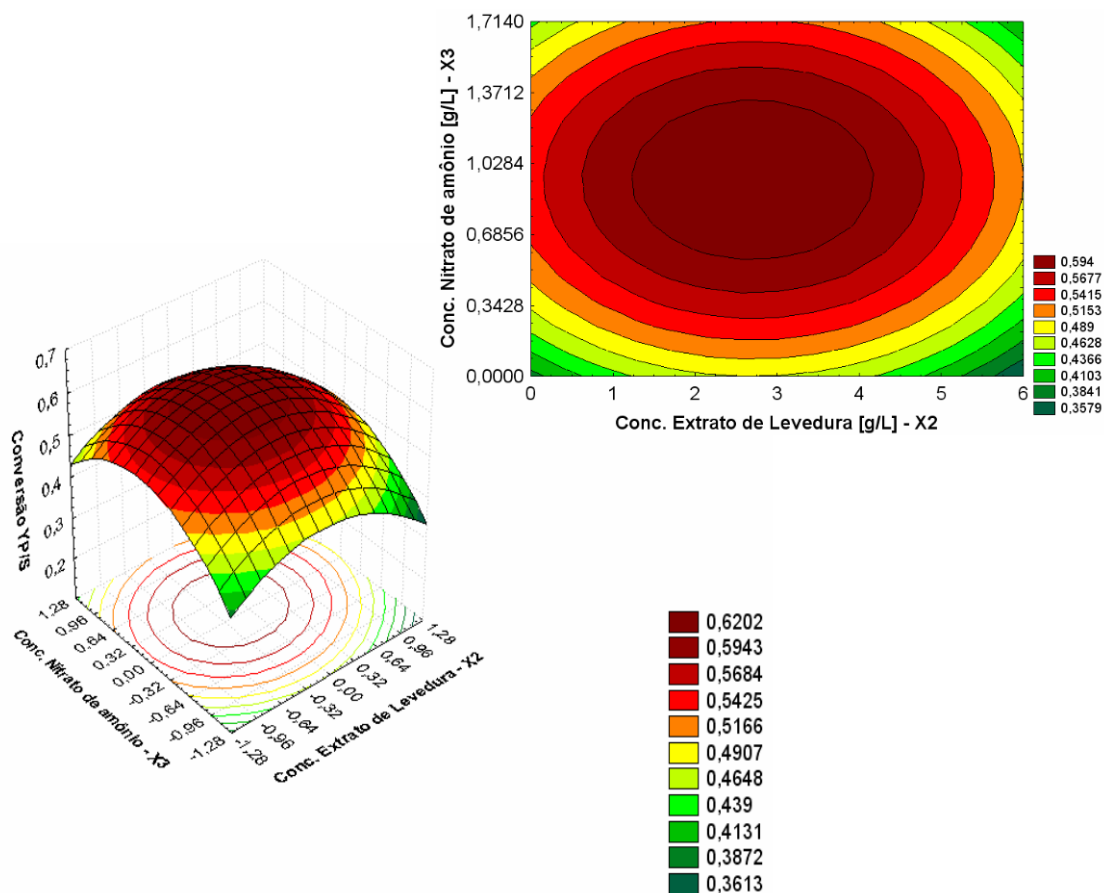


Figura 4.6 – Superfície de resposta e curva de contorno para $Y_{p/s}$ em função de X_2 e X_3 .

A Tabela 4.4 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância menores que 10% para a viscosidade da goma em solução na concentração de 1%.

Tabela 4.4 – Regressão múltipla para a Viscosidade da Goma (solução 1%) considerando o 1º planejamento.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	Desvio	t(11)	p
Termo independente	22799,14	390,399	58,399	0,000000
$(X_1)^2$	-9328,23	287,561	-32,439	0,000000
X_2	-676,04	200,321	-3,375	0,006199
$(X_2)^2$	-2676,77	287,561	-9,308	0,000002
$(X_3)^2$	-3084,77	287,561	-10,727	0,000000
$R^2 = 0,991$				

Os valores de viscosidade para polissacarídeos são geralmente bastante elevados quando comparados à maioria dos polímeros sintéticos de mesma massa molecular, como consequência direta da baixa flexibilidade das cadeias de natureza glicídica presentes (ALVES, 1998).

Szczesniak, (1985) *apud* Vendruscolo (1995) afirmou que altas viscosidades obtidas com baixas taxas de deformação, e baixas viscosidades com altas taxas de deformação conferem a substâncias excelentes características de suspensão e sensação bucal não pegajosa, como apresenta a goma xantana.

Vendruscolo, (1990) *apud* Vendruscolo (1995) relatou que os resultados da viscosidade aparente das soluções a 1%, 3% e 6% do biopolímero B-27, em pH 7 foram 160 cP a 1%, 5700 cP a 3% e 78000 cP a 6% na taxa de deformação de $0,3 \text{ s}^{-1}$, confirmando que há, usualmente, uma relação direta e não-linear entre viscosidade e a concentração do polissacarídeo. A não-linearidade entre viscosidade de soluções e concentrações do biopolímero indica ser este um colóide linear cujas partículas interagem em solução.

Vendruscolo (1995) constatou a influência da temperatura de fermentação e do pH na viscosidade aparente das soluções dos biopolímeros produzidos. Sugeriu ainda que provavelmente, o tipo de açúcar bem como a temperatura influi na produção da enzima de polimerização, resultando em polímeros com diferentes massas moleculares.

Com base nesses relatos, observou-se a complexidade para tratar os aspectos reológicos de uma forma geral, especificamente, quando a propriedade envolvida é a viscosidade de fluidos pseudoplásticos, como, no caso da goma xantana.

Frente a essas questões operacionais comuns ligadas aos bioprocessos em que variações na composição do meio de produção, temperatura, pH e a cepa utilizada determinam o mecanismo envolvendo a biotransformação do carboidrato a produto, é certo que, esse conjunto de fatores pode causar mudanças estruturais no biopolímero desejado refletindo diretamente na viscosidade de suas soluções.

A resposta referente à viscosidade da solução de goma xantana na concentração de 1% para este estudo está representada pela Equação 4.3 e a única variável isolada que faz parte do modelo ajustado é X_2 . Seu coeficiente de regressão é negativo, dessa forma, para se atingir altas viscosidades é necessário substituí-la por valores codificados negativos. Por outro lado, observa-se na Tabela 4.1 que ensaios utilizando concentrações de extrato de levedura menores não apresentaram valores elevados de viscosidade, isto mostra a importância do efeito conjunto das variáveis X_1 , X_2 e X_3 .

$$\mu_{1\%} = 22799,14 - 9328,23(X_1)^2 - 676,04X_2 - 2676,77(X_2)^2 - 3084,77(X_3)^2 \quad (4.3)$$

O ponto de otimização obtido pelo *Software Maple V Release 4* para maximizar a viscosidade da goma em solução 1% foi:

$X_1 = -0,0007458$ (24,992 g/L sacarose)

$X_2 = -0,1262$ (2,706 g/L extrato de levedura)

$X_3 = -0,01172$ (0,852 g/L NH_4NO_3)

A viscosidade da solução otimizada a partir da Equação 4.3 forneceu um valor de 22841,40 cP quando da substituição do ponto ótimo. As Figuras 4.7, 4.8 e 4.9 exibem as superfícies de resposta e as curvas de contorno para X_1 e X_2 , X_1 e X_3 , X_2 e X_3 , que por sua vez, confirmam o ponto encontrado.

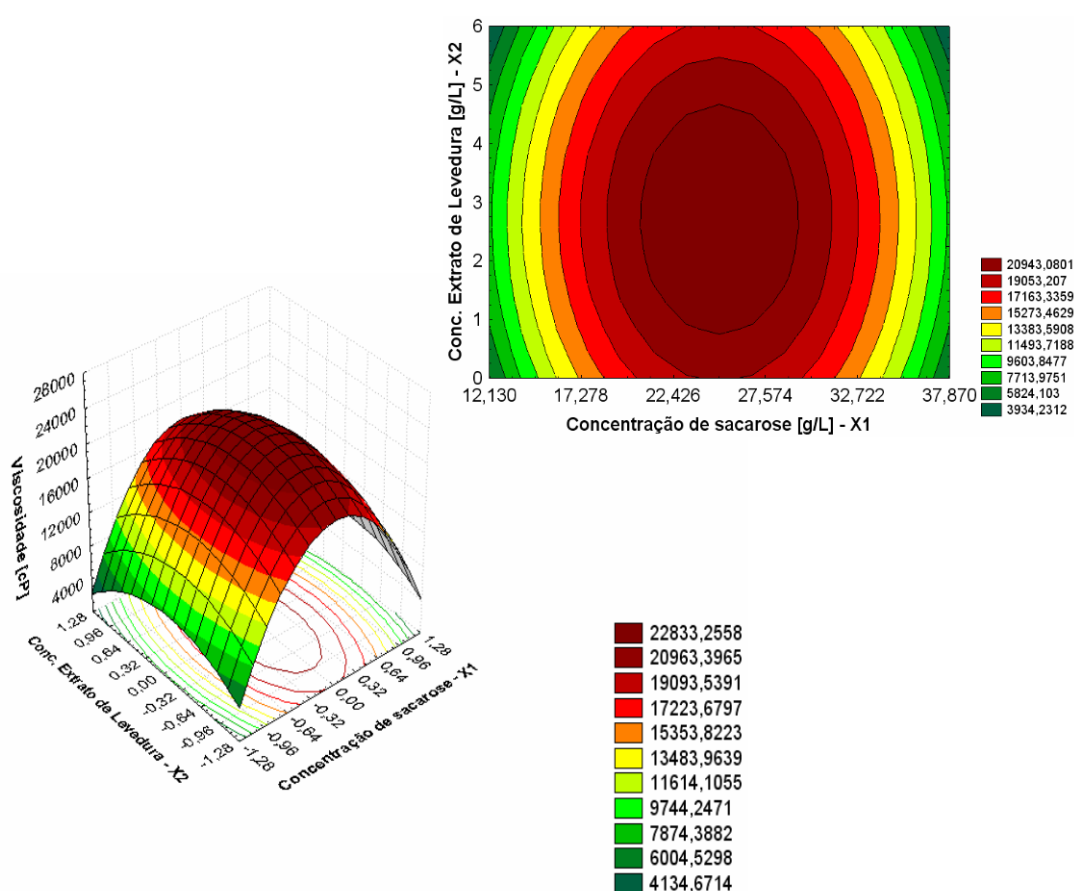


Figura 4.7 – Superfície de resposta e curva de contorno para a Viscosidade da Goma (solução 1%) em função de X_1 e X_2 .

As Equações 4.4, 4.5 e 4.6 representam a superfície ajustada na forma canônica. Os sinais negativos das raízes características λ_1 , λ_2 e λ_3 são indicativos de ponto máximo nos três casos.

$$Y_{Cg} = 17,324 - 3,597W_1^2 - 1,816W_2^2 - 1,508W_3^2 \quad (4.4)$$

$$Y_{Y/S} = 0,631 - 0,174W_1^2 - 0,0779W_2^2 - 0,0654W_3^2 \quad (4.5)$$

$$Y_{\mu_{1\%}} = 22841,40 - 9329,17W_1^2 - 3085,03W_2^2 - 2675,57W_3^2 \quad (4.6)$$

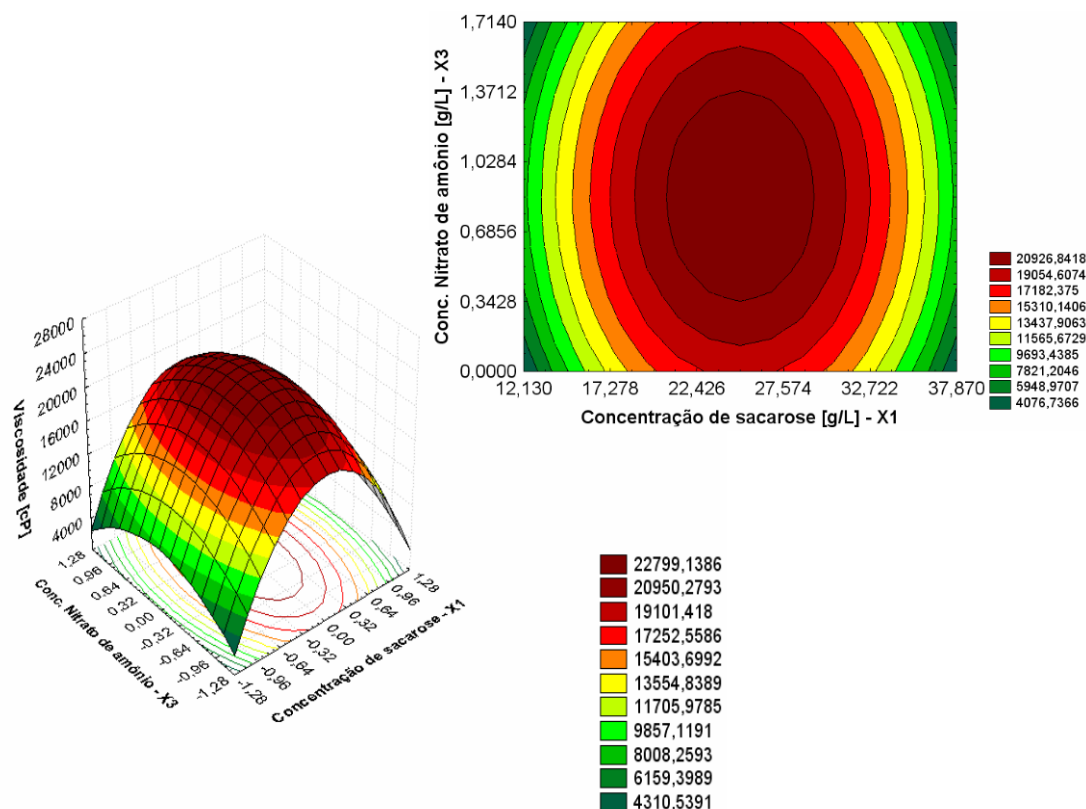


Figura 4.8 – Superfície de resposta e curva de contorno para a Viscosidade da Goma (solução 1%) em função de X₁ e X₃.

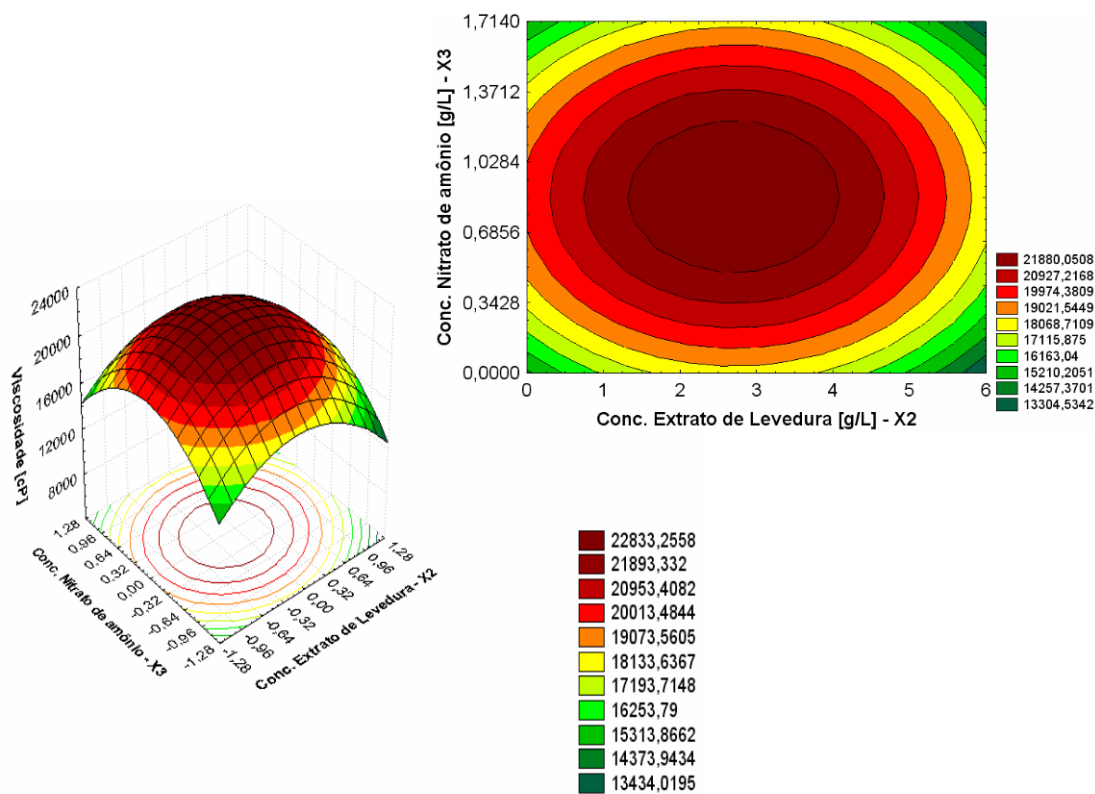


Figura 4.9 – Superfície de resposta e curva de contorno para a Viscosidade da Goma (solução 1%) em função de X₂ e X₃.

A Tabela 4.5 foi planejada como recurso para facilitar o entendimento da escolha de um ponto ótimo que atendesse as três respostas estudadas no primeiro planejamento. A região de otimização visualizada pelas superfícies de resposta possui concavidades diferentes e quando projetadas no plano XY geram curvas de contorno que assumem diversas geometrias. Sendo assim, a Tabela 4.5 mostra a região de otimização por meio de intervalos obtidos a partir das curvas de contorno $(X_1) \times (X_2)$, $(X_1) \times (X_3)$ e $(X_2) \times (X_3)$ para cada resposta. A leitura desses intervalos se deu através da projeção dos extremos, esquerdo/direita, na horizontal, e dos extremos inferior/superior, na vertical, e do deslocamento interno à região ótima. Com isto, o risco iminente de atingir as vizinhanças e originar respostas indesejáveis foi eliminado.

Tabela 4.5 – Limites inferiores e superiores dos intervalos representativos das variáveis X_1 , X_2 e X_3 , dentro da região de otimização, obtidos a partir das curvas de contornos $(X_1) \times (X_2)$, $(X_1) \times (X_3)$ e $(X_2) \times (X_3)$ para cada resposta.

	Respostas (variáveis dependentes)		
Curvas de Contorno	Concentração de Goma [g/L]	Conversão $Y_{P/S}$ [g.g ⁻¹]	Viscosidade da Goma (solução 1%) [cP]
$(X_1) \times (X_2)$	(27,0 a 37,8) e (0,76 a 4,51)	(23,5 a 31,5) e (1,14 a 4,49)	(23,0 a 29,0) e (1,14 a 4,16)
$(X_1) \times (X_3)$	(27,0 a 37,8) e (0,43 a 1,50)	(23,5 a 31,5) e (0,59 a 1,39)	(23,0 a 29,0) e (0,43 a 1,29)
$(X_2) \times (X_3)$	(1,51 a 3,93) e (0,65 a 1,29)	(1,51 a 3,93) e (0,65 a 1,19)	(1,51 a 3,93) e (0,59 a 1,13)

Leituras obtidas a partir das curvas de contorno na região de otimização representada pela cor marrom.

Conhecidos o ponto ótimo para cada resposta C_G ($X_1 = 32,370$; $X_2 = 2,647$; $X_3 = 0,969$), $Y_{P/S}$ ($X_1 = 27,472$; $X_2 = 2,720$; $X_3 = 0,948$), $\mu_1\%$ ($X_1 = 24,992$; $X_2 = 2,706$; $X_3 = 0,852$) e os intervalos que delimitam X_1 , X_2 e X_3 , procedeu-se à intersecção dos mesmos. Os valores encontrados resultantes da intersecção definiram um único intervalo representado por: **X_1 (27,0 a 29,0 g/L de sacarose), X_2 (1,51 a 3,93 g/L de extrato de levedura) e X_3 (0,65 a 1,13 g/L de nitrato de amônio).** Nessa etapa, a seleção do ponto ótimo a partir da superfície de resposta no primeiro planejamento experimental envolveu critérios técnicos e econômicos, enfim, optou-se por investigar duas situações distintas, uma delas empregando **2,70 g/L de extrato de levedura** e a outra **1,8 g/L de extrato de levedura**, ambas, utilizando **X_1 (27,0 g/L de sacarose) e X_3 (0,8 g/L de nitrato de amônio).** Esta escolha, ao que tudo indica, satisfaz plenamente o domínio de validade da região de otimização e a alternativa de reduzir o extrato de levedura sem comprometimento à formação do produto e às suas propriedades é um ganho extraordinário.

Os experimentos realizados nas condições descritas acima revelaram pequena variação nos valores de viscosidade como consequência direta da diminuição do extrato de levedura, porém perfeitamente aceitável, tendo em vista, seu alto custo no mercado. Dessa forma, obteve-

se para C_G , $Y_{P/S}$ e $\mu_{1\%}$ resultados iguais a (16,0 e 15,8 g/L de goma), (0,592 e 0,585 g.g⁻¹) e (22500,0 e 22101,0 cP) para 2,7 g/L e 1,8 g/L de extrato de levedura, respectivamente.

A execução do primeiro planejamento experimental comprovou a eficiência da técnica de otimização de variáveis de processo usando a metodologia da superfície de resposta e as curvas de contorno correspondentes e, ainda, confirmou a reprodutibilidade dos experimentos nos ensaios fermentativos. Nessa direção, um segundo projeto experimental fatorial avaliando os efeitos da velocidade de agitação e aeração foi idealizado para encerrar o estudo de otimização.

4.3 – Análise do 2º Planejamento Experimental

No sentido de minimizar custos inerentes à biossíntese da goma xantana, principalmente em relação à energia, o segundo projeto experimental considerou as variáveis agitação e aeração, designadas por X_4 e X_5 , respectivamente. É interessante ressaltar para esse tipo de processo as alterações reológicas significativas que ocorrem no caldo, motivo pelo qual o sistema necessita de agitação contínua. Os objetivos de uma operação de mistura podem ser tornar ou manter homogêneo o meio considerado para que a transferência de massa, ou melhor dizendo, a transferência de oxigênio no interior do reator seja uniforme.

A Tabela 4.6 mostrou que as respostas C_G , $Y_{P/S}$ e $\mu_{1\%}$ não aumentaram significativamente em relação ao primeiro planejamento, mas foi possível reduzir o nível de X_4 e X_5 tornando o processo economicamente mais viável. Esses ensaios com agitação mecânica e injeção de ar em diferentes níveis permitiram através das medições de oxigênio dissolvido do meio a determinação do Coeficiente de Transferência de Oxigênio (K_{La}) (Figura 4.14).

Tabela 4.6 – Variáveis independentes do 2º planejamento, X_4 e X_5 , e suas respostas C_G , $Y_{P/S}$, $\mu_{1\%}$.

Experimentos	X_4 (rpm)	X_5 (vvm)	K_{La} [h ⁻¹]	Conc.Goma [g/L]	$Y_{P/S}$ [gg ⁻¹]	Viscosidade [cP] a 0,75 s ⁻¹
1	500	0,25	24,978	14,2	0,526	19800
2	500	0,50	30,966	14,0	0,519	20100
3	500	0,75	41,034	13,1	0,485	19500
4	750	0,25	40,614	16,2	0,600	23470
5	750	0,50	58,650	17,1	0,633	24000
6	750	0,75	66,660	15,6	0,577	23400
7	1000	0,25	51,858	16,6	0,615	22900
8	1000	0,50	69,678	16,4	0,607	23100
9	1000	0,75	78,558	14,7	0,544	21680
10	750	0,50	57,921	17,2	0,637	24300
11	750	0,50	59,235	17,3	0,641	24500

Os experimentos 1 e 9 forneceram o menor e o maior valor para K_{La} iguais a 24,978 e 78,558 h^{-1} , respectivamente. Verificou-se que fixando a velocidade de agitação ou a taxa de aeração, os valores de K_{La} elevam-se para ambas as situações, porém, a contribuição de X_4 em relação a X_5 , considerando os efeitos estimados (Equação 4.10) através do coeficiente de regressão, foi ligeiramente pronunciada.

Chaves (2000) pesquisou a produção e a caracterização de exopolissacarídeo sintetizado por *Rhizobium tropici* e de acordo com os seus dados experimentais, os melhores resultados foram obtidos utilizando temperatura de 28°C, aeração de 1,0 vvm e agitação igual a 800 rpm. Nessas condições, a máxima produção de goma foi 6,1 g/L e a conversão $Y_{P/S}$ 0,61 $g.g^{-1}$.

As Tabelas 4.7, 4.8 e 4.9 mostram os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância menores que 10% para as seguintes respostas: concentração de goma, conversão de substrato a produto e viscosidade da goma na concentração de 1% a 0,75 s^{-1} .

Tabela 4.7 – Regressão múltipla para a Concentração de Goma considerando o 2º planejamento.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	Desvio	t(6)	p
Termo independente	17,042	0,1940	87,820	0,000000
X_4	1,0667	0,1544	6,907	0,000455
$(X_4)^2$	-1,605	0,2377	-6,754	0,000514
X_5	-0,600	0,1544	-3,885	0,008122
$(X_5)^2$	-0,905	0,2377	-3,809	0,008875
$R^2 = 0,959$				

As Equações 4.7, 4.8 e 4.9 representam os modelos ajustados em função da agitação e da aeração para a concentração de goma, conversão de substrato a produto e viscosidade da goma na concentração de 1%, respectivamente. Analisando a Equação 4.7 pode-se verificar que as variáveis isoladas X_4 e X_5 compõem o modelo matemático para a concentração de goma, e dentre elas, X_4 contribui para o aumento desta resposta, desde que, assuma valores codificados superiores ao nível central (0,0). O efeito associado a X_4 ao passar do nível -1,0 para +1,0 gera um acréscimo de goma equivalente a 2,133 g/L, ao passo que, para X_5 , o efeito é contrário provocando uma queda na concentração de goma igual a 1,200 g/L. O sinal negativo atribuído ao coeficiente de regressão da variável X_5 diminui a concentração de goma, a menos que assuma valores codificados inferiores ao nível (0,0). A Tabela 4.6 confirmou a interpretação dada ao modelo deixando claro que elevada agitação (X_4) e menor aeração (X_5) produziu maior concentração de goma. É obvio também que há um limite para esse aumento de X_4 , determinado pela relação custo/benefício.

$$C_g = 17,042 + 1,0667X_4 - 1,605(X_4)^2 - 0,600X_5 - 0,905(X_5)^2 \quad (4.7)$$

O ponto de otimização obtido no *Software Maple V Release 4* para maximizar a concentração de goma foi:

$$X_4 = 0,3553 \text{ (839 rpm)}$$

$$X_5 = -0,3706 \text{ (0,4073 vvm)} \approx 0,41 \text{ vvm}$$

Substituindo o ponto ótimo na Equação 4.7, a concentração de goma otimizada alcançou 17,316 g/L. A Figura 4.10 exibe a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_4 e X_5 para a concentração de goma. A região de otimização pode ser visualizada pela cor marrom tanto na superfície quanto no contorno. Na curva de contorno ainda é possível delimitar a região que produz as máximas respostas e explorar experimentalmente valores de X_4 e X_5 nas vizinhanças do ponto ótimo com o intuito de reduzir custos operacionais.

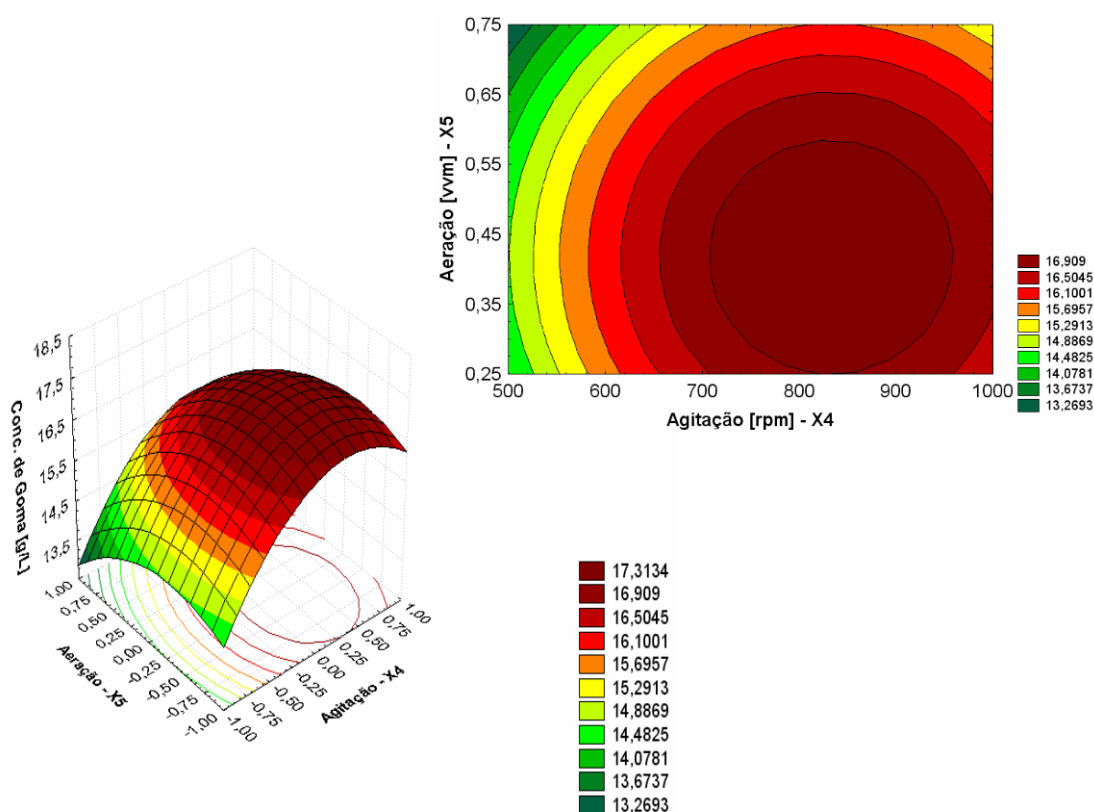


Figura 4.10 – Superfície de resposta e curva de contorno para a Concentração de Goma em função de X_4 e X_5 .

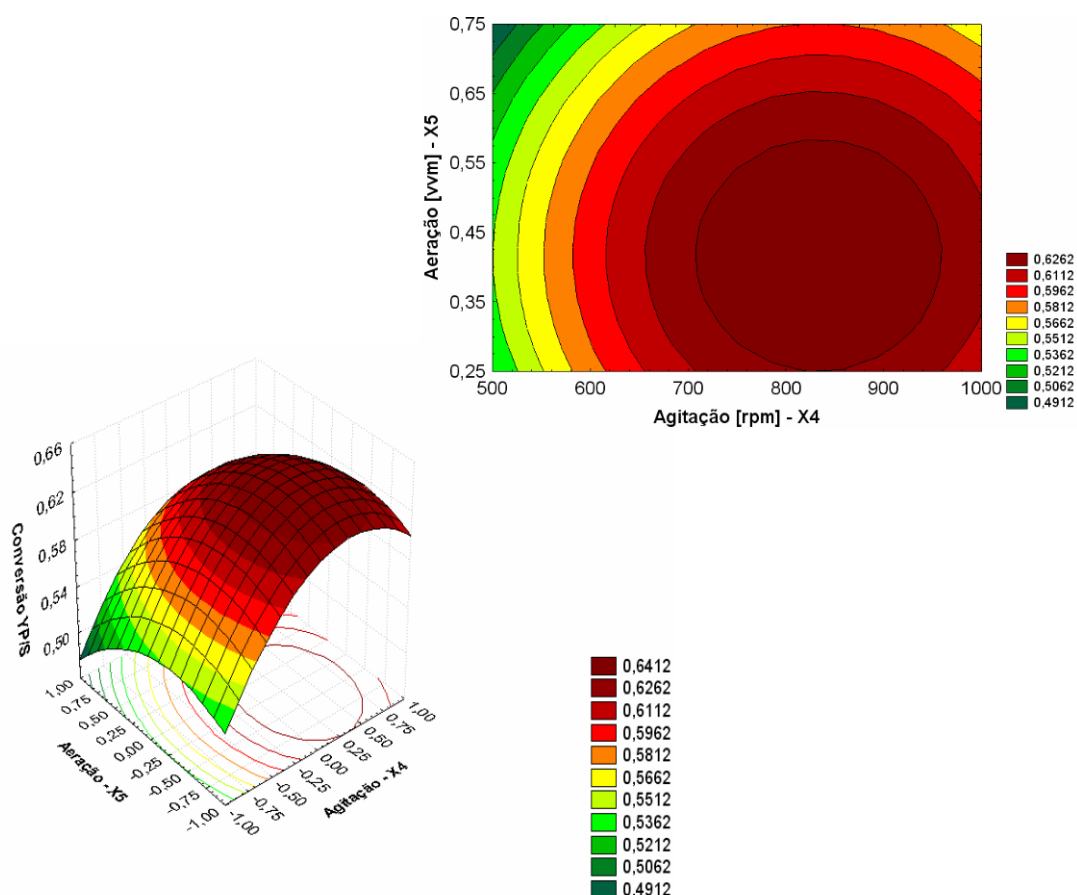
A Tabela 4.8 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância menores que 10% para a conversão de substrato a produto.

Tabela 4.8 – Regressão múltipla para a Conversão $Y_{P/S}$ considerando o 2º planejamento.

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Desvio	t(6)	p
Termo independente	0,6311	0,007165	88,075	0,000000
X_4	0,03953	0,005702	6,933	0,000446
$(X_4)^2$	-0,05927	0,008776	-6,754	0,000514
X_5	-0,02238	0,005702	-3,925	0,007755
$(X_5)^2$	-0,03372	0,008776	-3,843	0,008531
$R^2 = 0,960$				

A conversão $Y_{P/S}$ dada pela Equação 4.8 tem comportamento semelhante àquele apresentado para a concentração de goma. Portanto, um raciocínio similar foi também aplicado para correlacionar os efeitos pouco significativos das variáveis isoladas X_4 e X_5 que compõem o modelo matemático ajustado. As variáveis X_4 e X_5 possuem coeficientes de regressão com sinais contrários, logo, para aumentar a resposta conversão, basta utilizar os seus níveis acima e abaixo do ponto central conforme a faixa de valores especificada para o planejamento, respectivamente. A Tabela 4.6 comprova a interpretação dada ao modelo.

A conversão $Y_{P/S}$ otimizada a partir da Equação 4.8 forneceu um valor teórico de $0,641 \text{ g.g}^{-1}$ quando da substituição do ponto ótimo. A Figura 4.11 exibe a superfície de resposta e a curva de contorno para X_4 e X_5 , que por sua vez, comprova a existência do ponto encontrado.

Figura 4.11 – Superfície de resposta e curva de contorno para $Y_{P/S}$ em função de X_4 e X_5 .

$$Y_{p/S} = 0,6311 + 0,03953X_4 - 0,05927(X_4)^2 - 0,02238X_5 - 0,03372(X_5)^2 \quad (4.8)$$

O ponto de otimização obtido no *Software Maple V Release 4* para maximizar a conversão $Y_{p/S}$ foi:

$$X_4 = 0,3565 \text{ (839 rpm)}$$

$$X_5 = -0,3708 \text{ (0,4073)} \approx 0,41 \text{ vvm}$$

A Tabela 4.9 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância menores que 10% para a viscosidade da goma em solução na concentração de 1%.

Tabela 4.9 – Regressão múltipla para a Viscosidade da Goma (solução 1%) considerando o 2º planejamento.

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Desvio	t(6)	p
Termo independente	24224,21	157,537	153,768	0,000000
X_4	1380,00	125,372	11,007	0,000033
$(X_4)^2$	-2560,53	192,943	-13,271	0,000011
X_5	-265,00	125,372	-2,114	0,078967
$(X_5)^2$	-725,53	192,943	-3,760	0,009395
$R^2 = 0,983$				

O efeito das variáveis X_4 e X_5 foi mais pronunciado na viscosidade do que na concentração de goma e na conversão. Através da Equação 4.9 verificou-se, por meio dos sinais dos coeficientes de regressão, que a agitação e aeração têm efeitos contrários, uma aumentou em 2760,0 cP e a outra diminuiu em 530,0 cP a viscosidade, respectivamente, ao passar do nível -1,0 para +1,0. A Tabela 4.6 comprova a interpretação matemática dada ao modelo.

$$\mu_{1\%} = 24224,21 + 1380,00X_4 - 2560,53(X_4)^2 - 265,00X_5 - 725,53(X_5)^2 \quad (4.9)$$

O ponto de otimização obtido através do *Software Maple V Release 4* para maximizar a viscosidade da goma em solução 1% foi:

$$X_4 = 0,2797 \text{ (820 rpm)}$$

$$X_5 = -0,2269 \text{ (0,4433 vvm)} \approx 0,44 \text{ vvm}$$

A viscosidade da goma xantana em solução 1% otimizada a partir da Equação 4.9 forneceu um valor de 24432,65 cP quando da substituição do ponto ótimo. A superfície de resposta e a curva de contorno para X_4 e X_5 ilustrada pela Figura 4.12 confirmam o ponto encontrado.

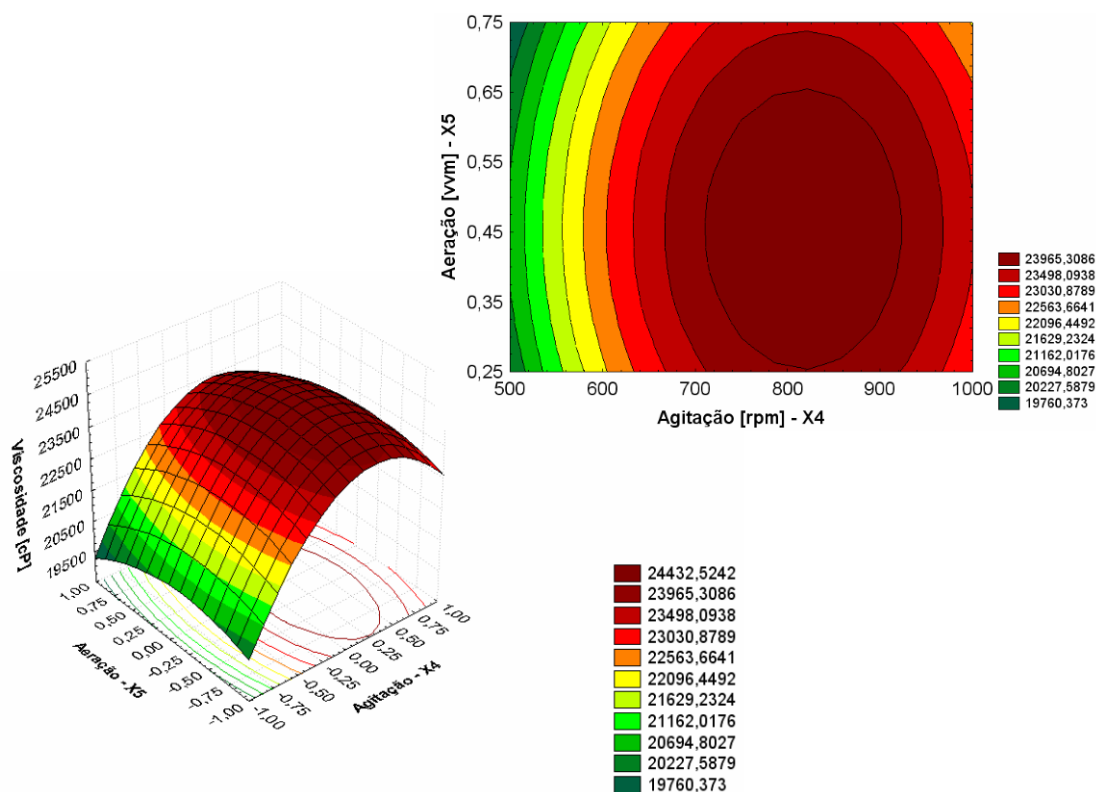


Figura 4.12 – Superfície de resposta e curva de contorno para a Viscosidade da Goma (solução 1%) em função de X_4 e X_5 .

Determinado o ponto ótimo para cada resposta C_G ($X_4 = 839$; $X_5 = 0,41$), $Y_{P/S}$ ($X_4 = 839$; $X_5 = 0,41$), $\mu_{1\%}$ ($X_4 = 820$; $X_5 = 0,44$) e os intervalos que delimitam X_4 e X_5 , facilmente identificados nas curvas de contorno das Figuras 4.10, 4.11 e 4.12, procedeu-se à intersecção dos mesmos. Os valores encontrados resultantes da intersecção definiram um único intervalo representado por: **X_4 (750 a 850 rpm) e X_5 (0,30 a 0,55 vvm)**. Nessa etapa, eleger um ponto ótimo a partir da superfície de resposta no segundo planejamento experimental envolveu novamente critérios técnicos e econômicos, enfim, optou-se por avaliar duas situações distintas, uma delas investigando **(830 rpm e 0,41 vvm)** e a outra explorando **(750 rpm e 0,35 vvm)**, ambas mantendo fixa a composição do meio otimizado no primeiro planejamento. Esta escolha, ao que tudo indica, atende plenamente o domínio de validade da região de otimização e a alternativa de reduzir a agitação e a aeração é um ganho vinculado aos custos energéticos do processo.

Os experimentos realizados nas condições descritas acima, segundo mostra a Tabela 4.10, revelaram pequena variação nos valores de viscosidade como consequência direta da diminuição da aeração, porém perfeitamente aceitável, tendo em vista, o alto custo da aeração no processo. Dessa forma, obteve-se para C_G , $Y_{P/S}$ e $\mu_{1\%}$ resultados iguais a (17,0 e 16,4 g/L de goma), (0,630

e $0,607 \text{ g.g}^{-1}$) e (23900,0 e 23002,0 cP) para (830 rpm, 0,41 vvm) e (750 rpm, 0,35 vvm), respectivamente.

As Figuras 4.13 e 4.14 complementam o estudo realizado pelo segundo planejamento experimental que avalia ponderadamente as combinações entre agitação e aeração. A Equação 4.10 representa o modelo quadrático ajustado, para (K_{La}), mediante múltipla regressão e a partir da sua interpretação, a seleção dos pontos (830 rpm, 0,41 vvm) e (750 rpm, 0,35 vvm) torna-se explicativa, pois ao substituí-los obteve-se uma redução considerável de aproximadamente 13% na transferência de oxigênio ($57,260$ para $49,736 \text{ h}^{-1}$, respectivamente). Na curva de contorno, uma ampla região de maximização está definida nas áreas que vão desde a cor vermelha até a marrom, donde qualquer conjunto (X_4 , X_5) faz correspondência há uma máxima transferência de O_2 . A *Xanthomonas campestris* utilizada nesta pesquisa é um microrganismo aeróbio, no entanto, o suprimento de oxigênio no meio fermentativo não necessariamente deva ocorrer em níveis extremos à faixa adotada (0,25 a 0,75 vvm).

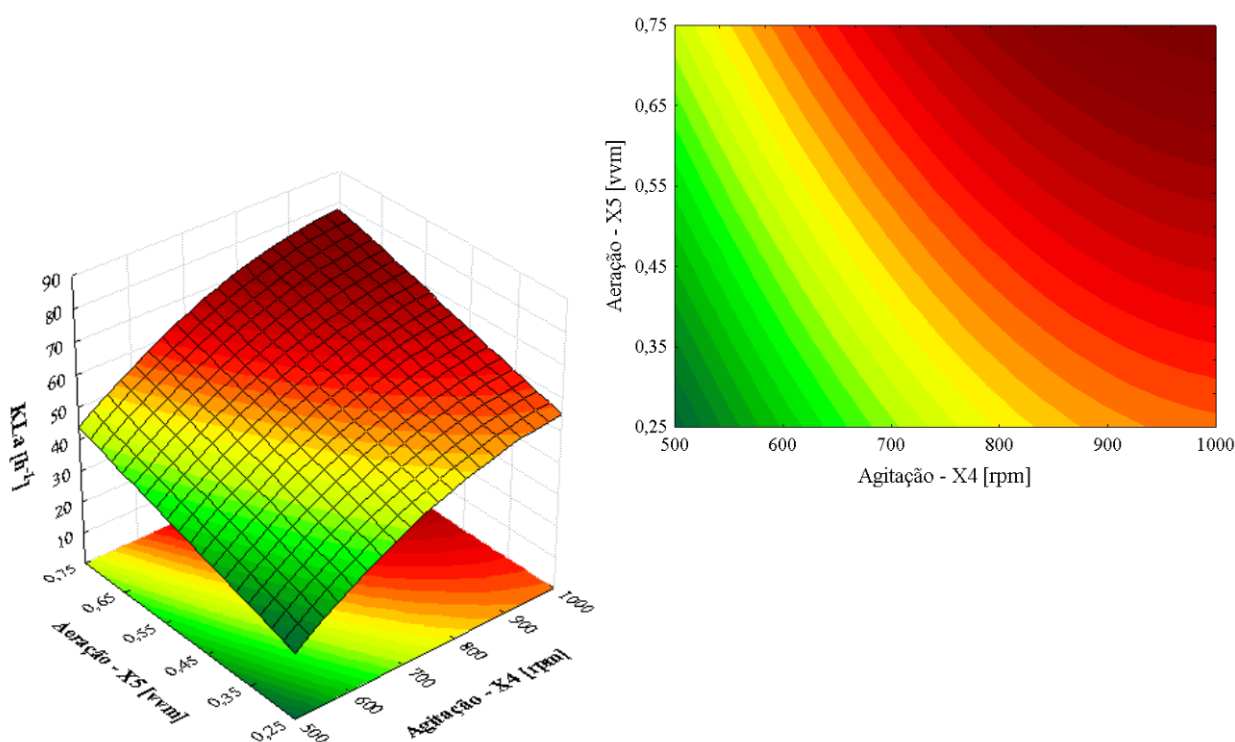


Figura 4.13 – Superfície de resposta e curva de contorno para o Coeficiente de Transferência de Oxigênio (K_{La}) em função de X_4 e X_5 .

$$Y_{K_{La}} = 56,616 + 17,186X_4 - 7,104(X_4)^2 + 11,467X_5 \quad (R^2) = 0.97 \quad (4.10)$$

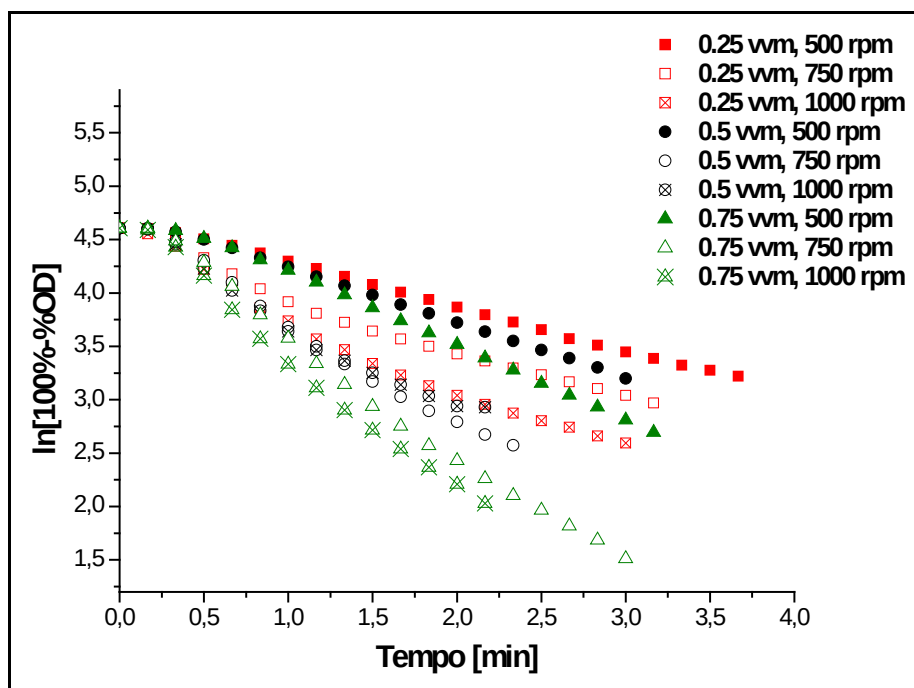


Figura 4.14 – Transferência de Oxigênio em função do tempo para diferentes taxas de aeração (0,25; 0,50 e 0,75 vvm) e velocidades de agitação (500; 750 e 1000 rpm).

A Figura 4.14 acrescenta, de modo geral, a possibilidade de mesmo não conhecendo os valores de K_{La} , inferir sobre o comportamento de cada situação experimental, pois o coeficiente angular da reta é numericamente igual ao K_{La} .

As Equações 4.11, 4.12 e 4.13 representam a superfície ajustada na forma canônica. Os sinais negativos das raízes características λ_1 , λ_2 e λ_3 são indicativos de ponto máximo nos três casos.

$$Y_{Cg} = 17,316 - 1,619W_4^2 - 0,891W_5^2 \quad (4.11)$$

$$Y_{Y_{P/S}} = 0,641 - 0,0598W_4^2 - 0,0332W_5^2 \quad (4.12)$$

$$Y_{\mu_{1\%}} = 24432,65 - 2567,71W_4^2 - 718,35W_5^2 \quad (4.13)$$

A Tabela 4.10 dispõe, resumidamente, de informações oriundas da otimização dos planejamentos experimentais, ressaltando os resultados obtidos e comparando aos modelos estatísticos aplicados. O delineamento composto central e o fatorial utilizado nessa pesquisa consistiram numa ferramenta muito interessante para avaliar as variáveis que afetaram ou contribuíram para a produção de goma xantana. Os modelos foram altamente significativos, sendo possível plotar as superfícies de respostas e estabelecer com clareza as regiões estratégicas para maximizar a concentração de goma, a conversão de substrato a produto e a viscosidade da

goma na concentração de 1% a $0,75\text{ s}^{-1}$. Em termos das respostas, a Tabela 4.10 mostra alguns avanços alcançados tendo como referência Faria (2005), tornando evidente que a redução da concentração de extrato de levedura e dos níveis de agitação e aeração promoveu uma diminuição substancial nos custos do processo. Outro fator essencial, para que o pesquisador possa interpretar o processo, à luz da metodologia estatística é a escolha apropriada da faixa de valores das variáveis independentes, pois o sucesso para se obter uma região de otimização está intrinsecamente relacionado à seleção da faixa de valores para compor a matriz do planejamento.

Tabela 4.10 – Respostas estudadas na melhor condição experimental comparadas ao modelo estatístico aplicado para diferentes planejamentos.

Planejamentos Experimentais	Condição	Experimental x Modelo	Conc.Goma [g/L]	$Y_{P/S}$ [g.g ⁻¹]	Viscosidade [cP] a $0,75\text{ s}^{-1}$
Delineamento fatorial 3^2	Faria, (2005)	experimental	14,180	0,579	20493,0
1 ^o DCC 27,0 g/L sacarose; 0,8 g/L NH_4NO_3 ; 800 rpm; 0,5 vvm	2,7 g/L extrato de levedura	experimental	16,000	0,592	22500,0
		modelo	16,202	0,627	22443,7
	1,8 g/L extrato de levedura	experimental	15,800	0,585	22101,0
		modelo	16,000	0,617	22039,6
2 ^o DF 27,0 g/L sacarose; 0,8 g/L NH_4NO_3 ; 1,8 g/L ext. levedura	830 rpm 0,41 vvm	experimental	17,000	0,630	23900,0
		modelo	17,318	0,641	24405,0
	750 rpm 0,35 vvm	experimental	16,400	0,607	23002,0
		modelo	17,076	0,632	24122,0

4.4 – Análise Cinética da Condição Otimizada

A cinética de um processo fermentativo constitui uma etapa fundamental, pois permite uma análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. O conhecimento dos valores intermediários de concentração celular (X), concentração de sacarose (S) e concentração de goma (P) definem os perfis das curvas ou a forma matemática destas para adequada compreensão do fenômeno.

O modelo cinético de Weiss & Ollis (1980) permite a identificação paramétrica em várias concentrações iniciais de sacarose e prevê o nível mais provável de produção de goma de xantana. A Figura 4.15 exhibe as curvas de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto para a condição otimizada. A Tabela 4.10 sintetizou os resultados provenientes dos dois planejamentos e destacou os valores experimentais de concentração de goma (16,400 g/L),

conversão $Y_{p/s}$ ($0,607 \text{ g.g}^{-1}$) e viscosidade ($23002,0 \text{ cP}$) obtidos operacionalmente por X_1 ($27,0 \text{ g/L}$ de sacarose), X_2 ($1,8 \text{ g/L}$ de extrato de levedura), X_3 ($0,8 \text{ g/L}$ de nitrato de amônio), X_4 (750 rpm) e X_5 ($0,35 \text{ vvm}$). O fator de conversão de substrato em massa celular ($Y_{x/s}$) foi $0,087 \text{ g.g}^{-1}$ e a produtividade equivalente a $0,683 \text{ g/L.h}$.

Lima (1999), trabalhando com três linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* atingiu o maior fator de conversão de substrato em massa celular para LFR-4 de $0,08 \text{ g.g}^{-1}$, seguidos de LFR-3 ($Y_{x/s} = 0,05 \text{ g.g}^{-1}$) e NRRL B-1459 ($Y_{x/s} = 0,03 \text{ g.g}^{-1}$).

Amanullah *et al.* (1998) trabalharam diferentes estratégias de alimentação de glicose em biorreator e para um sistema batelada atingiram $33,1 \text{ g/L}$ de xantana e $0,44 \text{ g/L.h}$ de produtividade.

Os valores de $Y_{x/s}$ e de produtividade encontrados neste estudo se comparados com Lima (1999) e Amanullah *et al.* (1998) foram superiores, conforme apresentado anteriormente.

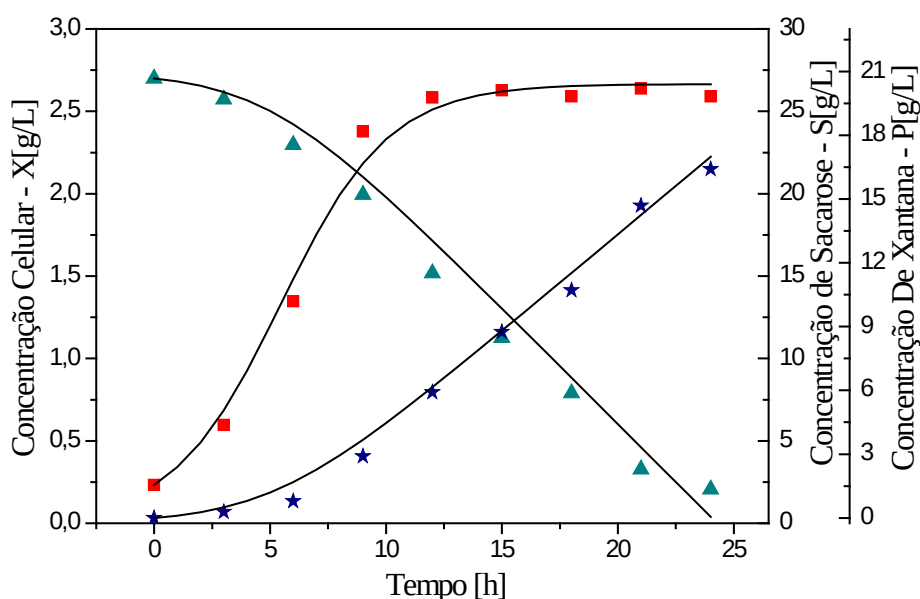


Figura 4.15 – Perfil das concentrações celular (■), sacarose (▲) e goma xantana (★) na condição otimizada. Símbolos representam dados experimentais; linhas representam o modelo de Weiss & Ollis (1980).

4.4.1 – Determinação dos Parâmetros Cinéticos via Modelagem Matemática

A Tabela 4.11 do ponto de vista dos valores encontrados para os parâmetros cinéticos e da comparação com outros autores forneceu informações que caracterizam e diferenciam os processos fermentativos em cada caso.

Tabela 4.11 – Parâmetros cinéticos determinados na condição otimizada comparados com a literatura.

Parâmetros	Ensaio na condição otimizada	Weiss & Ollis (1980)	Pinches & Pallent (1986)	García-Ochoa <i>et al.</i> (1990)	Serrano-Carreón <i>et al.</i> (1998)	Letisse <i>et al.</i> (2003)
μ_{max} [h ⁻¹]	0,473	0,152	0,29	0,110	0,25	0,38
X_{max} [g/L]	2,624	2,450	2,15	1,790	4,42	3,30
α [gS/gX]	3,975	2,00	1,24	14,286	3,03	3,23
β [gS(gX.h) ⁻¹]	0,368	0,284	0,24	0,120	0,26	0,36
m [gP/gX]	$3,894 \cdot 10^{-4}$	1,830	0,47	10,00	2,00	0,50
λ [gP(gX.h) ⁻¹]	0,346	0,155	0,13	0,003	0,25	0,23

A faixa de valores dos parâmetros calculados neste estudo comparada com os outros trabalhos citados apresentou uma notável variabilidade, fato este que pode estar associado às diferenças existentes nas condições de cultivo do microrganismo e de produção da goma xantana. Weiss & Ollis (1980) utilizaram os dados experimentais obtidos por Moraine & Rogovin (1971), os quais trabalharam com a linhagem *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 em meio de produção constituído por, glicose inicial 5%, nitrogênio 0,06%, pH $7,1 \pm 0,1$, temperatura (T) $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e vazão de ar (V_{ar}) 1 vvm. Pinches & Pallent (1986) utilizaram a mesma linhagem de *Xanthomonas campestris* de Moraine & Rogovin (1971) e meio de produção composto de glicose 22,5 g/Kg, nitrogênio (glutamato de sódio ou peptona), pH $7,0 \pm 0,5$, T $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e (V_{ar}) 0,4 vvm. Serrano-Carreón *et al.* (1998) utilizaram também *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459, mas o substrato empregado foi sacarose 40,0 g/L e a fonte de nitrogênio foi NH_4Cl 2,0 g/L em pH $7,0 \pm 0,1$, T 29°C e (V_{ar}) 0,5 vvm. García-Ochoa (1990) *apud* Letisse *et al.* (2003) utilizaram sacarose como fonte de carbono e não controlaram o pH, enquanto, Letisse *et al.* (2003) trabalharam com a linhagem *Xanthomonas campestris* ATCC 13951, utilizando sacarose 42 g/L, NH_4NO_3 1,125 g/L, pH 7,0 e T 28°C .

Os meios de produção aqui apresentados sucintamente são mais completos, mas foge ao nosso objetivo citá-los integralmente. Considerou-se então, que o substrato, a fonte de nitrogênio e as condições de processo são suficientes para distinguir cada trabalho citado do presente estudo.

De acordo com a literatura (BORZANI, 2001), muitos fatores podem contribuir para a diferença encontrada nos valores dos parâmetros cinéticos. Entre eles destaca-se a cepa selecionada, a relação C/N, a própria fonte de nitrogênio, o controle ou não do pH no meio e principalmente a utilização de meios complexos, como o caldo de cana.

4.5 – Caracterização do Produto na Condição Otimizada

4.5.1 – Determinação da Composição Monossacarídica

O teor de açúcar total encontrado para a xantana em condições otimizadas foi 85,3% e sua composição monossacarídica apresentou principalmente glucose 43%, manose 32%, ácido urônico 24% constituindo nesta ordem uma proporção equivalente a 1,79:1,33:1 (Figura 4.16). Foram detectados traços de outros carboidratos, como por exemplo, ramnose, arabinose, xilose e galactose. A predominância de monômeros de glucose e manose no hidrolisado, bem como do ácido glucurônico está de acordo com JANSSON *et al.*, 1975; MARZOCCA *et al.*, 1991; MORRIS *et al.*, 1993; HAMCERENCU *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009. Segundo Hamcerencu *et al.* (2007) o teor de acetato e piruvato pode variar conforme condições empregadas no processo fermentativo e pós-fermentativo, haja visto que algumas propriedades da goma estão diretamente relacionadas aos teores desses substituintes, logo, advém a importância da sua determinação.

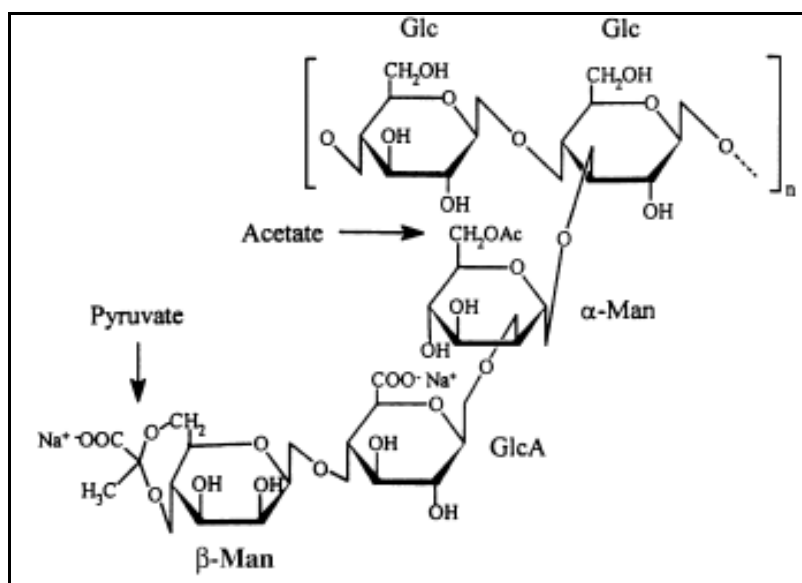


Figura 4.16 – Estrutura química da xantana.

Fonte: Hamcerencu *et al.* (2007)

Sutherland (2001) correlacionou as particularidades de polissacarídeos microbianos, enfocando aspectos estruturais, mecanismos biossintéticos, os efeitos da manipulação genética, as propriedades físicas associadas à composição química, a comercialização dos produtos e sua aplicação, bem como a prospectiva do cenário representado pelos biopolímeros.

A Tabela 4.12 fornece as proporções dos principais constituintes da xantana para diferentes espécies de *Xanthomonas*. As maiores variações ocorreram nos substituintes acetato e piruvato, como consequência da linhagem produtora.

Tabela 4.12 – Razões molares dos principais constituintes da xantana para diferentes linhagens de *Xanthomonas*.

Linhagens	Razão molar aproximada				
	Glucose	Manose	Ácido Glucurônico	Acetato	Piruvato
<i>X. campestris</i>	2,0	1,8	1,0	1,0	0,7
<i>X. phaseoli</i> 556	2,0	1,9	1,0	0,1	0,7
<i>X. phaseoli</i> 1128	2,0	1,9	1,0	1,0	0,1
<i>X. gummisudans</i> 2182	2,0	1,9	1,0	1,5	0,7
<i>X. oryzae</i> PXO61	2,0	1,9	1,0	2,0	0
<i>X. campestris</i> BD9A	2,0	0,8	0,8	0,2	0,1
Mutante	2,0	1,0	1,0	1,0	0
Mutante	2,0	1,0	1,0	0	0
Mutante	2,0	1,0	1,0	1,0	0
Mutante	2,0	1,0	0	0	0

Fonte: Sutherland, I. W. (2001).

SILVA *et al.* (2009) reportaram a produção e a caracterização da goma xantana a partir de soro de queijo para duas linhagens de *X. campestris* (1230 e 1182). A composição química, em termos de glucose, manose e ramnose, determinada para as gomas produzidas foi comparada a uma amostra comercial e o perfil monossacarídico obtido segue descrito:

- ✓ xantana comercial – (glucose 2,75 g/L; manose 3,63 g/L e ramnose - ausente);
- ✓ *X. campestris* 1230 – (glucose 0,80 g/L; manose 1,56 g/L e ramnose 1,10 g/L); e
- ✓ *X. campestris* 1182 – (glucose 0,52 g/L; manose 0,71 g/L e ramnose - ausente).

Os autores relataram ainda que pequenas variações na composição dos carboidratos ocorrem com frequência, dependendo da linhagem empregada e, em muitos casos a proporção entre os monossacarídeos se mantém (1:1). Esse estudo divulgado por Silva *et al.* (2009) representa uma contribuição científica importante e a possibilidade de destinar o soro de queijo, um resíduo agroindustrial abundante, como matéria-prima de baixo custo para viabilizar a síntese de produtos com alto valor agregado como é o caso da goma xantana. Além disso, outro aspecto positivo do ponto de vista ambiental é a redução do impacto gerado em decorrência do lançamento inapropriado.

Guo *et al.* (2008) divulgaram para a goma *psyllium* a seguinte distribuição de carboidratos em porcentagem (%): ramnose ($1,50 \pm 0,10$); arabinose ($21,96 \pm 1,29$); galactose ($3,76 \pm 0,24$); glucose ($0,64 \pm 0,17$); xilose ($56,72 \pm 2,97$) e manose ($0,40 \pm 0,02$) perfazendo um total correspondente a ($84,98 \pm 4,26$). Os autores justificaram seus resultados com base no conhecimento de que as informações estruturais explicam as propriedades funcionais e, além disso, centralizaram o foco do trabalho no fracionamento da goma visando estimar o tamanho das partículas das moléculas obtidas de diferentes frações em solução.

O cromatograma mostrado na Figura 4.17 representa os picos dos produtos de hidrólise analisados por cromatografia líquido-gasosa da amostra de xantana em condições otimizadas conforme metodologia empregada.

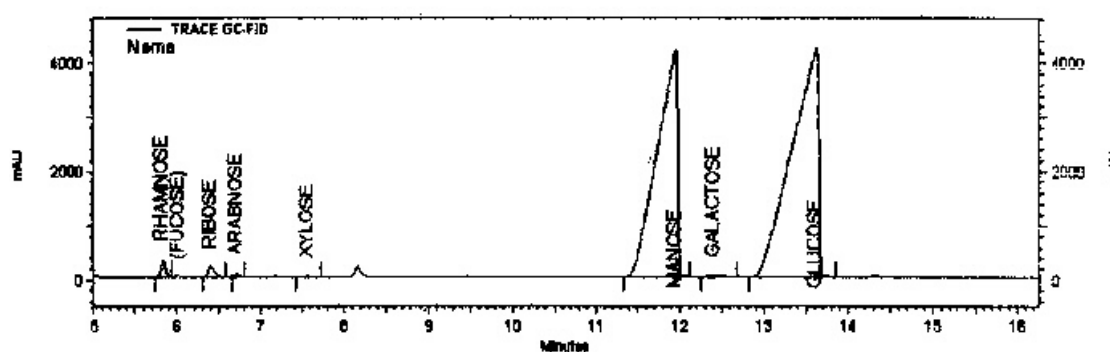


Figura 4.17 – Cromatograma dos produtos de hidrólise da amostra de xantana analisados por cromatografia líquido-gasosa na forma de acetatos de alditol.

4.5.1.1 – Análise por Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão e Determinação da Massa Molecular

O perfil de eluição da amostra por HPSEC-MALLS/RI (Figura 4.18) revelou uma distribuição de massas unimodal, assegurada pelo índice de polidispersão (M_w/M_n) igual a 1,014, demonstrando homogeneidade no material analisado.

A massa molecular ponderal média (M_w) obtida para a xantana, admitindo a biossíntese conduzida no ponto ótimo, foi $4,172 \times 10^6$ Da. Este valor, comprovadamente denota características peculiares à goma, pois resultará soluções altamente viscosas refletindo caráter pseudoplástico, conforme discussão apresentada em seções posteriores.

Papagianni *et al.* (2001) realizando fermentações em batelada na faixa compreendida entre 100 e 600 rpm constatou a influência da agitação na estrutura química da xantana, assim como o aumento no teor de piruvato em decorrência do aumento nos níveis de agitação. Os

autores indicaram ainda uma faixa de peso molecular média típica da goma situada entre 2×10^6 e 5×10^7 Da, contemplando inclusive o valor encontrado nesta pesquisa.

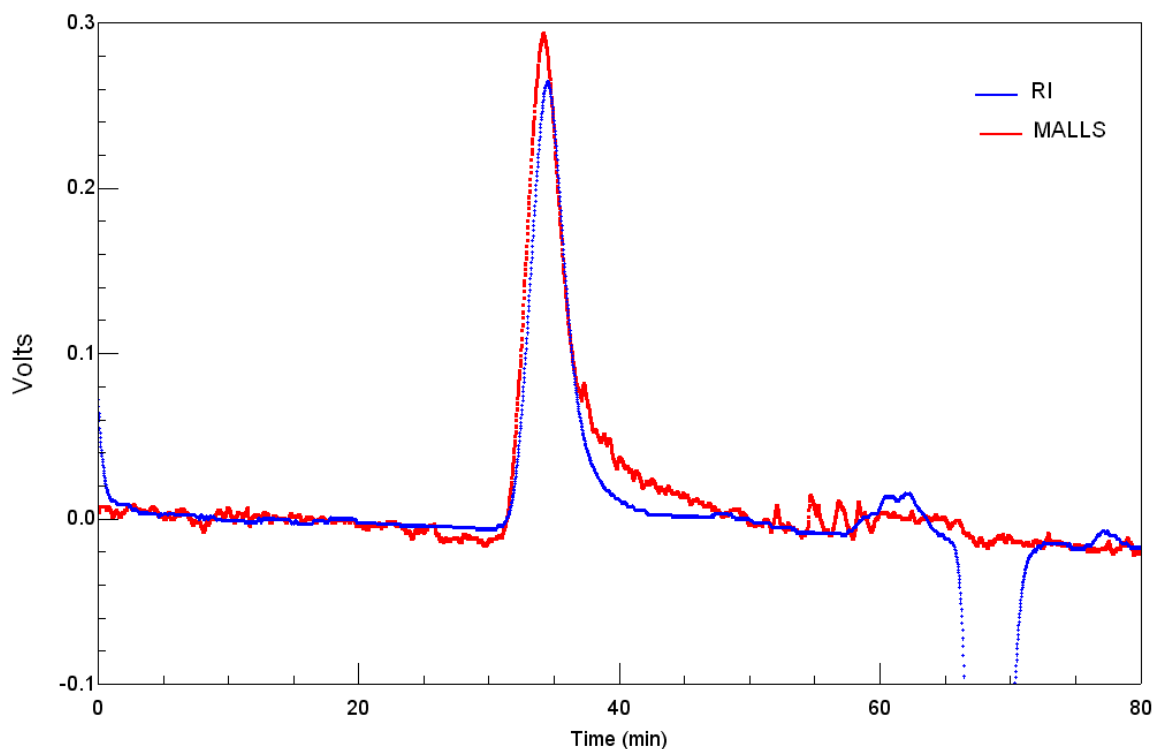


Figura 4.18 – Perfil de eluição por HPSEC utilizando detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz (MALLS - mostrado o ângulo de 90°).

Kambourova *et al.* (2009) investigaram a produção e caracterização da glucana microbiana (EPS), sintetizada por *Geobacillus tepidamans* V264, usando maltose como fonte de carbono. Alcançaram para um sistema batelada, a 300 rpm, $111,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de glucana com alto peso molecular ($> 1 \times 10^6$ Da) e termicamente estável (280°C), propriedades estas que impulsionam sua aplicação em diferentes mercados. O conteúdo total de carboidratos foi 98% e a análise dos açúcares presentes constatou a predominância da glucose na composição e de outros monossacarídeos em menor proporção (glucose/galactose/fucose/frutose: 1/0,07/0,04/0,02).

Klebsiella oxytoca produz um tipo de exopolissacarídeo (EPS), segundo Feng *et al.* (2009), com peso molecular médio de $1,16 \times 10^5$ Da e tamanho de partículas de 260 nm. Os componentes monossacarídicos e suas razões de proporcionalidade foram determinados conforme natureza dos produtos de hidrólise: ramnose (0,033)/fucose (0,0411)/arabinose (0,0147)/xilose (0,0051)/manose (0,2393)/galactose (0,0986)/glucose (0,1304). O perfil de distribuição de massas ilustrado na Figura 4.19 pode ser comparado àquele da Figura 4.17, pois a semelhança das curvas indica homogeneidade das amostras.

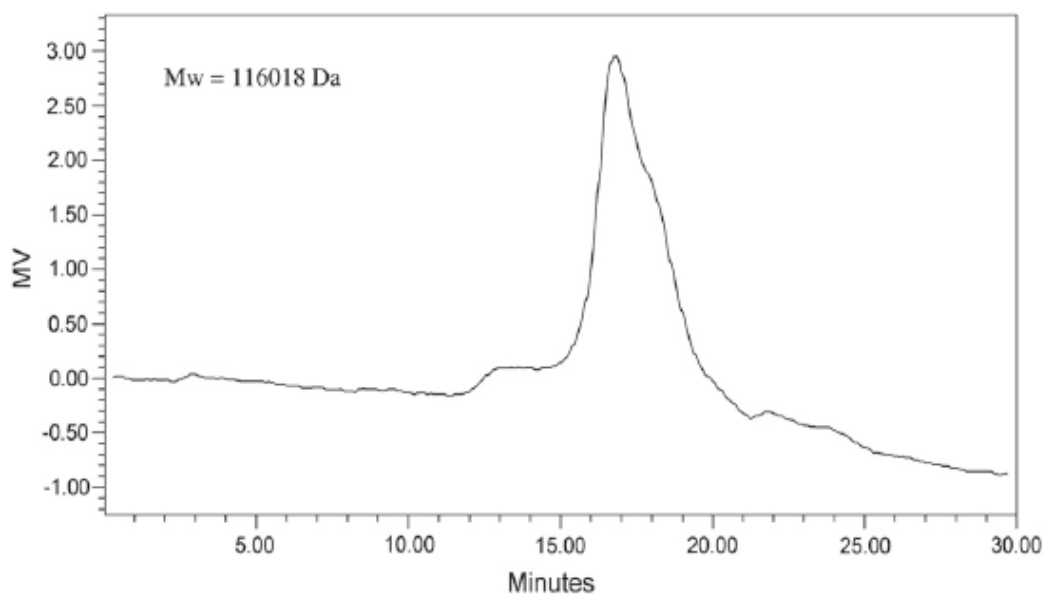


Figura 4.19 – Perfil de eluição por HPSEC para (EPS) produzido por *Klebsiella oxytoca*.

Fonte: Feng, L. *et al.* (2009).

4.5.2 – Análise Espectroscópica (FT-IR)

O espectro de infravermelho com Transformada de Fourier consiste numa metodologia adotada para detectar similaridades ou diferenças na estrutura química de diversos compostos.

As amostras de xantana comercial, xantana proveniente de caldo de cana hidrolisado e xantana produzida a partir de condições otimizadas foram analisadas com o objetivo de identificar os grupamentos funcionais presentes na estrutura destes biopolímeros. A região estudada compreendeu as bandas localizadas na janela espectral compreendida entre 400 e 4000 ondas.cm⁻¹. A discussão a seguir trata o assunto de forma didática e simplificada, porém, permite esclarecer o processo de identificação das bandas resultantes dos três espectros avaliados.

A Figura 4.20 ilustra o perfil do espectro de infravermelho das três amostras. Pode-se observar que a banda resultante da deformação axial de grupos hidroxila -OH participantes de interações do tipo ligações de H está representada em 3450-3200 ondas.cm⁻¹. As absorções de grupos hidroxilas estão entre as primeiras a terem sido estudadas por espectroscopia no infravermelho (BARBOSA, 2007). Na maioria das situações, o grupo -OH de uma molécula não se encontra livre ou isolado. Ao contrário, ele sempre se apresenta na forma associada, realizando ligação de hidrogênio. No caso de álcoois e fenóis, as absorções mais características são as relacionadas aos estiramentos das ligações O-H e C-O. Quando o grupo O-H se encontra associado, a banda geralmente é observada na região de 3590-3200 cm⁻¹, no caso de álcoois, e de 3250-3000 cm⁻¹ em fenóis, que participam de ligações intermoleculares, e de 3200-2500 cm⁻¹, no

caso da existência de ligação intramolecular. Entre aproximadamente $1250\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ aparece a ligação relativa ao C-O (BARBOSA, 2007). Considerando ainda que ésteres, anidridos e éteres também absorvem fortemente na região de $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, a caracterização das bandas de estiramento das ligações C-O de álcoois e fenóis podem se tornar um problema complexo.

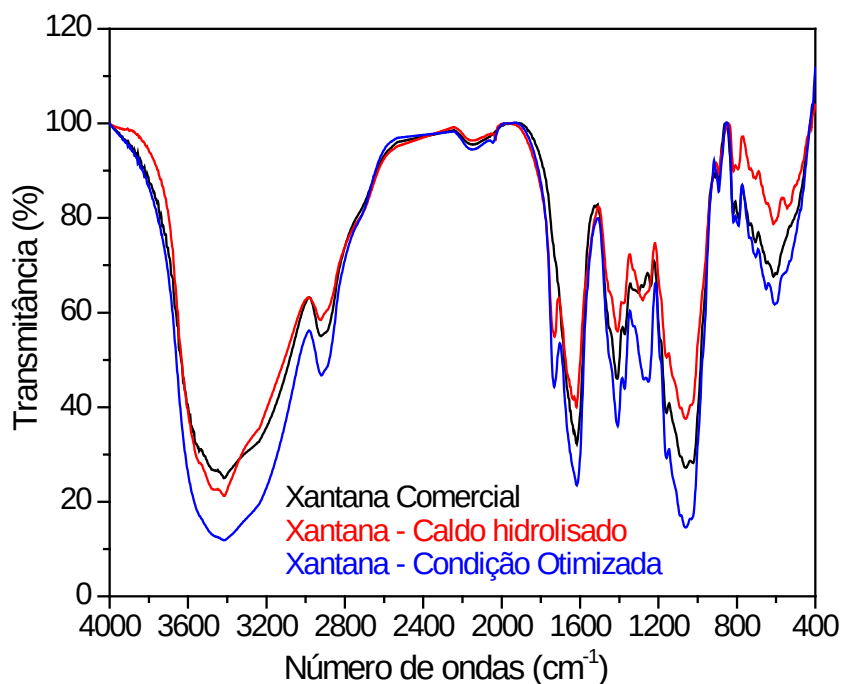


Figura 4.20 – Espectro FT-IR das amostras de xantana em *pellets* KBr: comercial, condição otimizada, obtida a partir do caldo de cana hidrolisado.

✓ Nos três espectros adquiridos, as bandas mais importantes registradas no intervalo de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ foram: **$3200\text{-}3450\text{ cm}^{-1}$** : deformação axial de -OH ; **$2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$** : deformação axial de C-H (pode ser devido a absorções de estiramento simétrico e assimétrico de CH_3 , ou ainda, de grupos CH_2) e CHO; **$1710\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$** : deformação axial de C=O de ésteres, ác. carboxílicos, aldeídos e cetonas; **$1530\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$** : deformação axial de C=O de enóis (β -dicetonas); **$1420\text{-}1430\text{ cm}^{-1}$** : deformação angular de C-H; **$1050\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$** : deformação axial de C-O).

Quando o grupo O-H participa de ligação de hidrogênio, conforme discutido, a ligação C-O fica um pouco mais fraca, e como consequência se observa redução na sua frequência de absorção. O modo de vibração da ligação C-O acopla-se à vibração da ligação C-C adjacente, resultando em alteração no posicionamento dessa banda. Para um álcool primário, por exemplo, essa vibração seria mais corretamente descrita como sendo devida ao estiramento da ligação C-C-O. Em razão desse acoplamento, álcoois primários absorvem na região de $1085\text{ - }1030\text{ cm}^{-1}$, os secundários em $1125\text{-}1085\text{ cm}^{-1}$, os terciários em $1205\text{-}1125\text{ cm}^{-1}$ e os fenóis em $1260\text{-}1180\text{ cm}^{-1}$. Essa banda geralmente é bastante intensa e relativamente larga, sendo facilmente identificada (BARBOSA, 2007).

O grupo O-H de álcoois resulta ainda em bandas referentes à deformação angular no plano (δ OH) e deformação angular fora do plano (γ (OH)), as quais aparecem nas regiões de $1460\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$ e $700\text{-}600\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Em soluções concentradas, o formato da banda de deformação angular no plano é alargado na região de $1500\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, enquanto em soluções diluídas ela é mais aguda e ocorre em torno de 1260 cm^{-1} . Essas bandas não são claramente visíveis no espectro, no entanto, o que se observa é apenas uma alteração na linha de base, sobreposta com as absorções de deformação angular de CH_2 e CH_3 (BARBOSA, 2007).

Compostos com absorções devidas a vibrações de estiramento C-H e C-C e vibrações de deformação angular C-C-C e H-C-H, as bandas mais relevantes situam nas regiões de $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ e de $1450\text{-}1365\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. As absorções de estiramento de ligação C-C, denominadas genericamente *vibrações esqueléticas*, localizam na região de $1260\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ (impressão digital) e são geralmente fracas e sem qualquer importância para elucidação estrutural. As absorções de deformação angular de ligações C-C-C surgem abaixo de 600 cm^{-1} , sendo também fracas e sem importância. Na região de $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$, quatro bandas distintas podem estar relacionadas à deformação axial da ligação C-H, dentre elas, podemos citar: absorções de estiramento simétrico e assimétrico de CH_3 , absorções de estiramento simétrico e assimétrico de CH_2 . De modo geral, o posicionamento das bandas relativas a esses estiramentos varia pouco, sendo que grupos metila absorvem devido ao estiramento assimétrico em torno de $2975\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$, por outro lado, o estiramento assimétrico de CH_2 aparece em torno de $2930\text{-}2920\text{ cm}^{-1}$ (Figura 4.20). Por outro lado, a banda de estiramento simétrico de CH_3 se encontra em torno de $2885\text{-}2865\text{ cm}^{-1}$, ao passo que, a banda de estiramento simétrico de CH_2 está na faixa de $2870\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$ (BARBOSA, 2007).

O grupo CH_3 em hidrocarbonetos dá origem à banda de deformação angular assimétrica ($\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$) na região de $1465\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$ e de deformação angular simétrica ($\delta_s \text{CH}_3$) em $1390\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$. A banda de deformação angular assimétrica ($\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$) geralmente se sobrepõe à de deformação angular simétrica de CH_2 ($\delta_s \text{CH}_2$), que ocorre em $1480\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$ (Figura 4.20). A deformação angular assimétrica do grupo CH_2 (ρCH_2), em que todo o grupo se move em fase, é perceptível na faixa de $725\text{-}720\text{ cm}^{-1}$. Essa banda é evidente em compostos de cadeia longa e corresponde à vibração do fragmento $[\text{CH}_2]_n$, sendo $n \geq 4$ (BARBOSA, 2007).

Vale destacar ainda que a presença de grupos eletronegativos diretamente ligados ao grupo CH_3 pode alterar significativamente a posição da banda de absorção de deformação angular simétrica, cuja ocorrência seria na região de $1450\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$, enquanto a absorção de deformação angular assimétrica é menos sensível a essas alterações estruturais, surgindo entre $1470\text{-}1410\text{ cm}^{-1}$ (BARBOSA, 2007).

A banda característica que se observa nos espectros de infravermelho de éteres se deve ao sistema C-O-C, cuja absorção ocorre aproximadamente na faixa de $1270\text{-}1060\text{ cm}^{-1}$. Como a massa e a força das ligações do grupo C-O-C são muito semelhantes com as do grupo C-C-C, espera-se que ambos os grupos registrem bandas de absorção em posições equivalentes, o que de fato ocorre. Contudo, como a ligação C-O possui momento de dipolo maior que a ligação C-C, a intensidade da banda de absorção referente ao estiramento da ligação C-O é maior que a da ligação C-C (BARBOSA, 2007).

No caso de éteres alifáticos, a banda de estiramento assimétrico da ligação C-O ocorre em torno de $1150\text{-}1060\text{ cm}^{-1}$, sendo mais comum situar entre $1140\text{-}1110\text{ cm}^{-1}$. Éteres cíclicos exibem essa banda na faixa de $1270\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$, sendo sua localização influenciada pelo tamanho do anel. Os éteres de seis membros absorvem na mesma região que os acíclicos, enquanto os de anéis menores geralmente absorvem em números de onda menores (BARBOSA, 2007).

Bandas características do estiramento de ligação C=O foram detectadas nitidamente na região de $1750\text{ e }1625\text{ ondas.cm}^{-1}$ e representam grupos aldeídos ou grupamento acetil (Figura 4.20). São várias as classes de compostos orgânicos onde o grupo carbonila (C=O) faz parte de suas estruturas, dentre elas pode-se citar: cetona, aldeído, ácido carboxílico, éster, lactona, anidrido, amida, lactama e sal de ácido carboxílico. O estiramento da ligação C=O ocorre em uma ampla faixa de número de ondas, que vai de aproximadamente 1850 cm^{-1} a 1610 cm^{-1} , dependendo da classe do composto e da estrutura da substância em particular. De modo geral, todo efeito resultante em aumento da força da ligação C=O terá como resposta incremento na frequência de estiramento dessa ligação, enquanto efeitos que diminuem a força da ligação implicarão em decréscimo no número de ondas de absorção (BARBOSA, 2007).

A grande importância da banda de absorção referente ao estiramento da ligação C=O baseia-se fortemente na sua intensidade, além de caracterizar uma região onde outros poucos grupos ou ligações absorvem, ou seja, nessa região acontecem poucas interferências de demais grupos funcionais, tornando mais fácil a identificação da presença da carbonila. Fatores estruturais e o estado físico da amostra afetam diretamente a frequência de absorção das carbonilas. Apenas a título informativo, os fatores estruturais serão citados, pois não é de interesse detalhar a teoria envolvida no assunto. A Figura 4.21 ilustra o efeito do tamanho do anel sobre a frequência de absorção da ligação C=O em diferentes compostos cíclicos.

Dentre os fatores que afetam a frequência de estiramento da carbonila, podemos citar:

- ✓ Eletronegatividade dos átomos ligados ao carbono da carbonila;
- ✓ Eletronegatividade dos átomos ligados ao carbono alfa em relação à carbonila;
- ✓ Efeito de conjugação de ligação dupla;

- ✓ Efeito da formação de ligação de hidrogênio;
- ✓ Efeito do tamanho do anel (BARBOSA, 2007).

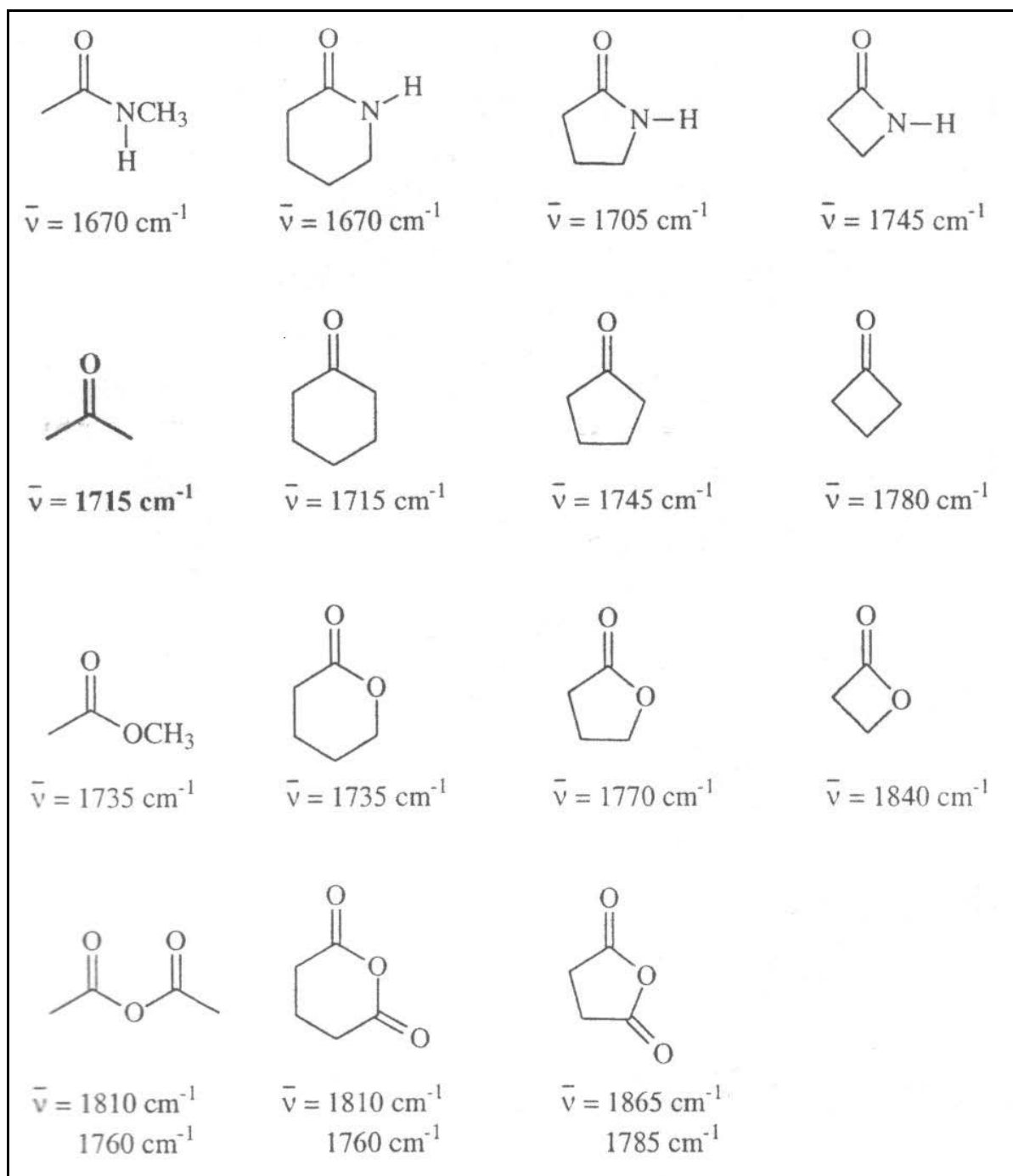


Figura 4.21 – Efeito do tamanho do anel sobre a frequência de absorção da ligação C=O em compostos cíclicos.
Fonte: (BARBOSA, 2007).

As bandas correspondentes ao estiramento de ligações C=O de cetonas e aldeídos alifáticos saturados são muito parecidas, todavia a banda equivalente aos aldeídos é detectada em

valor ligeiramente superior à das cetonas, devido o efeito indutivo doador de elétrons dos grupos alquilas ligados ao carbono da carbonila das cetonas que enfraquece a ligação C=O em relação aos aldeídos (BARBOSA, 2007).

O espectro da forma enólica não apresenta uma banda típica de carbonila conjugada à ligação dupla, mas exibe uma banda muito larga e intensa na região de 1640 a 1580 cm^{-1} . Essa redução na frequência da banda de absorção em relação a uma carbonila de um composto α,β -insaturado se deve à formação de ligação de hidrogênio intramolecular, que resulta também no alargamento da banda. Nessa direção se observa ainda uma banda larga, e geralmente fraca, entre 3200 e 2400 cm^{-1} , em razão do estiramento da ligação O-H. O da forma carbonílica, por sua vez, possui duas bandas de estiramento da ligação C=O, sendo normalmente centradas em torno de 1720 cm^{-1} (BARBOSA, 2007).

As cetonas podem ainda absorver com intensidade variando de média a forte no intervalo de 1320-1100 cm^{-1} , como resultado do estiramento e da deformação angular do grupo C-CO-C. A faixa de absorção para as aromáticas vai de 1230 a 1075 cm^{-1} . Contudo, as bandas registradas de deformação angular no plano provenientes da ligação C-CO-C na região de 630-620 cm^{-1} sofrem deslocamento para 580 cm^{-1} , porém não representa valor diagnóstico (BARBOSA, 2007).

Os espectros de aldeídos detectam uma banda típica correspondente ao estiramento da ligação C-H do grupo carbonila. Na realidade ocorrem duas bandas de intensidade média a fraca nas regiões 2830-2810 cm^{-1} e 2740-2650 cm^{-1} devido à ressonância de Fermi entre a vibração de estiramento da ligação C-H e a primeira harmônica da banda de deformação angular da ligação C(O)-H com sinal em 1390 cm^{-1} (BARBOSA, 2007).

Nos ácidos carboxílicos, o carbono da carbonila está ligado a um grupo OH que exerce efeito indutivo retirador de elétrons, aumentando a força da ligação C=O em relação aos aldeídos e às cetonas. Em razão disso, para ácidos carboxílicos que não estão envolvidos em ligação de hidrogênio (isso pode ocorrer quando o ácido está na fase de vapor ou em solução muito diluída em um solvente apolar), a absorção da carbonila é observada entre 1780-1740 cm^{-1} . Todavia, essa situação não é muito comum. Em geral, o mais comum é obter espectros com a amostra em pastilha de KBr ou como filme líquido. Nesses casos, os ácidos geralmente se encontram associados na forma de dímero, por meio de ligações de hidrogênio promovendo um enfraquecimento da ligação C=O da carbonila, de modo que os espectros dos ácidos carboxílicos alifáticos saturados apresentam uma banda de absorção em 1725-1710 cm^{-1} . Para os aromáticos, a absorção ocorre em 1700-1680 cm^{-1} , e nos ácidos alifáticos α,β -insaturados ela é observada em 1715-1690 cm^{-1} . Outras insaturações estendendo a conjugação têm pouco efeito sobre a posição da banda de absorção. A presença de grupos retiradores de elétrons como cloro, bromo no

carbono α fortalece a ligação C=O, resultando em aumento na frequência de absorção dessa ligação (BARBOSA, 2007).

Em função disto, pode-se inferir que os polissacarídeos isolados seguiram o mesmo comportamento espectral do padrão utilizado, provavelmente em razão da proximidade do grau de pureza empregado pelo fabricante e pela técnica adotada nesta pesquisa.

Freitas *et al.* (2009) sintetizou um polissacarídeo extracelular composto principalmente por galactose e menores quantidades de manose, glucose e ramnose, a partir de *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682, usando glicerol como fonte de carbono. Confrontando o espectro FT-IR obtido nas análises químicas com os espectros de outras gomas comerciais, xantana e guar, concluíram que as bandas em torno de 3400 cm^{-1} , 2939 cm^{-1} e $990\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, comuns a todos os polissacarídeos representam ligação O-H, ligação C-H de grupos $-\text{CH}_2$ e sacarídeos, respectivamente. A correspondência entre as bandas os levaram a afirmar forte similaridade entre o EPS produzido e a xantana, devido aos grupamentos ácidos presentes.

No entanto, a espectroscopia de infravermelho isoladamente não é conclusiva na identificação acerca da estrutura dos polissacarídeos de interesse, logo, recomenda-se o uso de técnicas complementares como a Ressonância Magnética Nuclear de Próton e de Carbono.

4.5.3 – Comportamento Reológico das Soluções de Xantana a 0,75% (m/v)

Uma importante característica associada aos biopolímeros é a sua capacidade de espessamento numa determinada concentração, geralmente inferior a 1% (m/v), promovendo altas viscosidades em taxas de deformação conhecidas.

Os polissacarídeos provenientes de fontes não convencionais, assim como os de origem microbiana, servem de substrato para a degradação enzimática. No entanto, o número de polissacarases isoladas e identificadas é relativamente pequeno; somente poucas espécies produtoras de polissacarídeos, também sintetizam enzimas que o degradam reduzindo suas viscosidades. Quase todas as enzimas capazes de atuar, nessas circunstâncias, no produto final exibem um alto grau de especificidade, raramente decompondo mais de um biopolímero, ainda que haja estruturas homólogas (SUTHERLAND, 1990 *apud* LIMA, 1999).

As Figuras 4.22 e 4.23 representam os reogramas, gerados a partir do *Software OriginPro* 7.5, utilizando medições de taxas de deformação para tensões de cisalhamento aplicadas a soluções 0,75% (m/v) da goma xantana, conforme resistência ao escoamento.

Para a goma comercial K e n assumiram valores iguais a $6,442\text{ [Pa.s}^n\text{]}$ e $0,136$ (Figura 4.22), respectivamente, ao passo que, a goma produzida neste trabalho alcançou valores para K e n iguais a $13,257\text{ [Pa.s}^n\text{]}$ e $0,226$ (Figura 4.23), respectivamente. Esses resultados merecem

reflexão, pois em se tratando de fluidos pseudoplásticos, também denominados 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; contudo, compará-los requer certa cautela, pois representam parâmetros reológicos de gomas procedentes de processos fermentativos distintos. Em seções anteriores, muito se discutiu a respeito da composição química dos polissacarídeos e os fatores associados às variações percentuais de alguns grupamentos, além disso, a qualidade da goma direciona a sua aplicação.

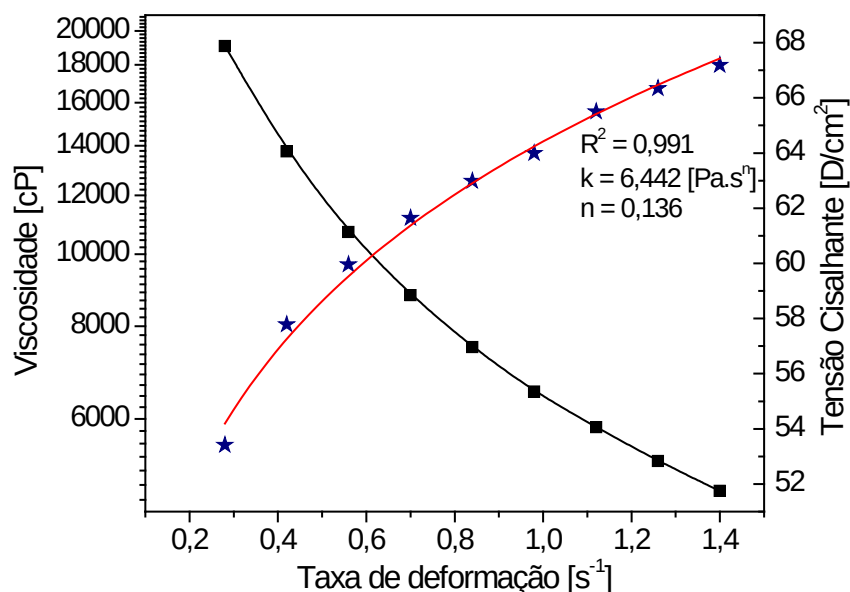


Figura 4.22 – Curvas de Viscosidade Aparente, Tensão Cisalhante em função da Taxa de Deformação considerando a xantana comercial (solução 0,75%).

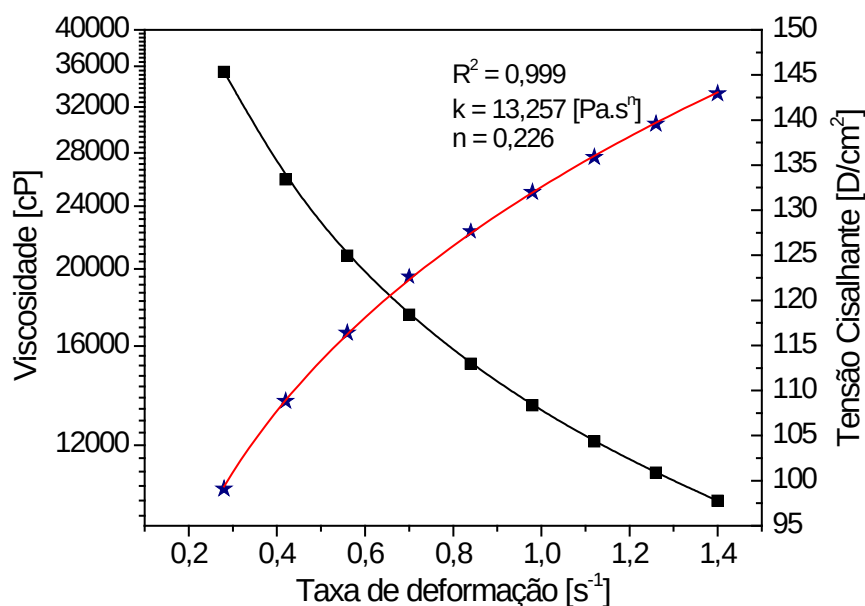


Figura 4.23 – Curvas de Viscosidade Aparente, Tensão Cisalhante em função da Taxa de Deformação considerando a xantana em condições otimizadas (solução 0,75%).

Benichou *et al.* (2007) averiguaram o comportamento reológico de soluções combinadas, a partir de xantana e de proteína isolada do soro (WPI), para diferentes razões, visando a aplicação em formulações alimentícias e propiciando através das interações associativas o aumento da estabilidade de emulsões. Curvas de viscosidade em função da taxa de deformação (Figura 4.24), para concentrações 0,1%, 0,3% e 0,5% de xantana, foram construídas e os parâmetros K e n estimados de acordo com a Tabela 4.13. Interessante ressaltar que a 100 s^{-1} , as viscosidades das soluções (0,75% m/v) da xantana comercial e otimizada calculadas pelo modelo de Ostwald de Waele correspondem a 120,5 cP e 375,3 cP, respectivamente, competindo com um valor aproximado a 150 cP da solução 0,5% preparada por Benichou *et al.* (2007).

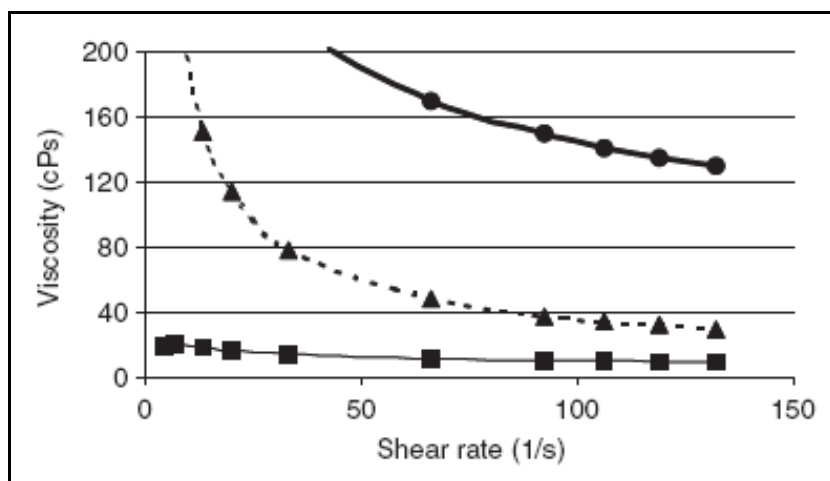


Figura 4.24 – Viscosidade da solução de goma xantana em água (■: 0,1 %; ▲: 0,3 %; ●: 0,5 %) em função da taxa de deformação à pH 7 e T = 20°C.

Fonte: Benichou, A. *et al.* (2007)

A Tabela 4.13 é uma fonte preciosa divulgada por Benichou *et al.* (2007) acerca do comportamento reológico da mistura em evidência (xantana/WPI). Um acréscimo na concentração de xantana (0,1% para 0,5%) eleva K de 0,29 para 26,38 (Pa.sⁿ) e reduz n de 0,773 para 0,243 intensificando a resistência ao escoamento e confirmando o perfil pseudoplástico típico. Analisando as proporções entre as misturas (xantana/WPI), K (1,61 para 26,54 Pa.sⁿ) e n (0,507 para 0,311) seguiram aumentando e reduzindo, respectivamente.

Tabela 4.13 – Valores para K e n em várias soluções combinando goma xantana/WPI (*whey protein isolate* - proteína isolada do soro) a pH 7 e T = 20°C (Modelo de Ostwald-de-Waele).

Sistema	K (Pa.s ⁿ)	n (-)
Goma Xantana 0,1%	0,29 ± 0,09	0,773 ± 0,089
Goma Xantana 0,3%	8,53 ± 0,13	0,314 ± 0,052
Goma Xantana 0,5%	26,38 ± 0,32	0,243 ± 0,025
WPI/Xantana (4%/0,1%)	1,61 ± 0,13	0,507 ± 0,065
WPI/Xantana (4%/0,3%)	5,93 ± 0,20	0,371 ± 0,042
WPI/Xantana (4%/0,5%)	26,54 ± 0,36	0,311 ± 0,028
WPI/Xantana (2%/0,5%)	27,49 ± 0,33	0,327 ± 0,036

Fonte: Benichou, A. *et al.* (2007)

Sciarini *et al.* (2009) detiveram seus estudos no isolamento de galactomananas oriundas de sementes de *Gleditsia triacanthos* (Fabaceae) com proporção variável de manose/galactose que dependem do método de purificação adotado. As propriedades funcionais do hidrocolóide obtido por três métodos de recuperação foram comparadas com aquelas exibidas pela xantana, devido a sua ampla utilização. O efeito da temperatura na viscosidade foi observado na Figura 4.25. À medida que aumenta a temperatura, a energia cinética das moléculas também aumenta diminuindo consideravelmente a resistência ao escoamento da solução.

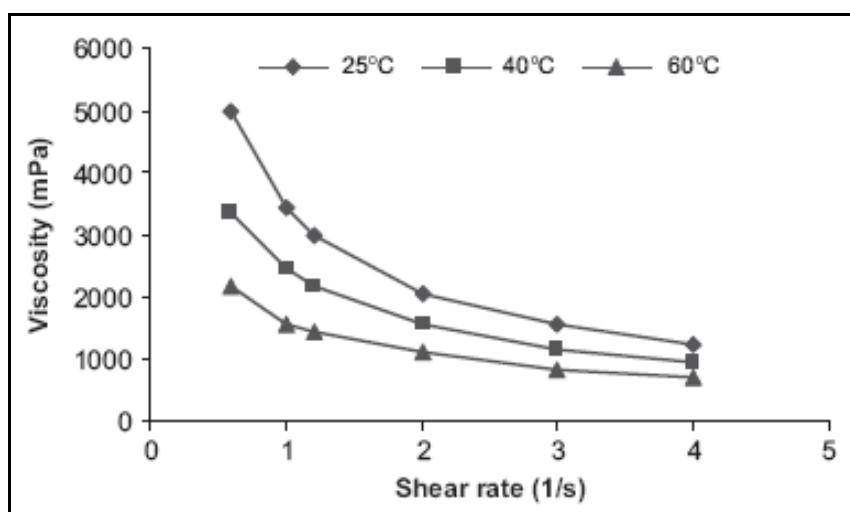


Figura 4.25 – Curvas de Viscosidade Aparente em função da Taxa de Deformação para a xantana (0,5% m/v) em diferentes Temperaturas.

Fonte: Sciarini, L.S. *et al.* (2009)

Yoo & Kim (2006) avaliaram as propriedades reológicas da mistura goma xantana-amido de arroz (5% w/w) a várias concentrações de xantana (0; 0,2%; 0,4%; 0,6% e 0,8%) numa faixa de temperatura de 25 a 70°C (Tabela 4.14). Pequenas diferenças para o índice de comportamento (n) foram detectadas, enquanto a viscosidade aparente a 100 s⁻¹ e K diminuíram com o aumento da temperatura (25 a 70°C). Rao (1999a) *apud* Yoo & Kim (2006) correlacionou temperatura e a viscosidade aparente numa taxa de deformação específica, para as misturas goma xantana-amido de arroz, em geral presentes nos alimentos fluidos, usando a relação descrita por Arrhenius:

$$\checkmark \eta_a (100 \text{ s}^{-1}) = A \cdot \exp(E_a/RT)$$

A Tabela 4.14 mostrou ainda que os efeitos da temperatura diminuíram com o aumento da concentração de xantana na mistura e, a 0,8%, os valores de η_a não sofreram alterações significativas, principalmente a partir de 40°C até 70°C, evidenciando assim, influência quase desprezível naquela propriedade. Os autores observaram também uma redução da viscosidade aparente com a temperatura mais pronunciada a menores concentrações de xantana. As curvas geradas de viscosidade, tensão cisalhante em função da taxa de deformação apresentaram coeficientes de determinação superiores a 96%.

4.5.3.1 – Determinação da viscosidade intrínseca da goma xantana

A viscosidade intrínseca e a constante de Huggins da xantana comercial e da xantana produzida no ponto ótimo foram 3967,8 mL/g ($K_H = 0,117$) e 2862,6 mL/g ($K_H = 0,198$), respectivamente (Figura 4.26). Essa diferença encontrada consolidou discussões acerca do tamanho, da forma ou do peso molecular da estrutura, relevantes ao processo de caracterização. Medidas viscosimétricas em regime diluído podem mostrar particularidades a nível molecular e isto constitui uma ferramenta na determinação da composição química de EPS's sintetizados por fermentação (TORRES *et. al.*, 1993 *apud* Lima, 1999).

Lima (1999) relatou valores de viscosidade intrínseca das amostras de xantanas, polimerizadas num meio sintético a partir de três linhagens de *Xanthomonas*, da mesma ordem de grandeza daqueles obtidos nesta pesquisa. Nesta sequência, para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459, LFR-3 (isolada de couve – *Brassica oleracea* var. *capitata*), LFR-4 (isolada de rabanete – *Raphanus sativus* L.), as viscosidades intrínsecas foram 3500,71; 1125,3 e 2210,3 mL/g.

Tabela 4.14 – Efeito da concentração de goma xantana nos parâmetros do modelo “power-law” e na viscosidade aparente (η_a) a 100 s^{-1} da mistura* (5% w/w) de goma xantana-amido de arroz.

Concentração de Goma Xantana (%)	Temperatura (°C)	η_a a 100 s^{-1} (Pa.s)	K (Pa. s ⁿ)	n (-)	R ²
0	25	$0,77 \pm 0,02$	$26,0 \pm 0,59$	$0,24 \pm 0,01$	0,97
	40	$0,62 \pm 0,03$	$21,3 \pm 0,64$	$0,24 \pm 0,01$	0,98
	55	$0,54 \pm 0,02$	$19,0 \pm 0,53$	$0,23 \pm 0,01$	0,99
	70	$0,44 \pm 0,01$	$16,3 \pm 0,21$	$0,22 \pm 0,00$	0,98
0,2	25	$0,63 \pm 0,01$	$26,1 \pm 1,17$	$0,19 \pm 0,01$	0,96
	40	$0,59 \pm 0,02$	$23,9 \pm 0,64$	$0,19 \pm 0,01$	0,97
	55	$0,47 \pm 0,02$	$20,8 \pm 1,02$	$0,19 \pm 0,00$	0,98
	70	$0,42 \pm 0,02$	$17,5 \pm 1,06$	$0,20 \pm 0,01$	0,98
0,4	25	$0,64 \pm 0,01$	$29,4 \pm 0,35$	$0,17 \pm 0,01$	0,97
	40	$0,56 \pm 0,02$	$28,6 \pm 0,52$	$0,16 \pm 0,01$	0,98
	55	$0,56 \pm 0,01$	$26,8 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,01$	0,98
	70	$0,52 \pm 0,01$	$24,0 \pm 0,54$	$0,17 \pm 0,00$	0,98
0,6	25	$0,66 \pm 0,01$	$33,2 \pm 0,73$	$0,15 \pm 0,01$	0,97
	40	$0,63 \pm 0,01$	$32,2 \pm 0,83$	$0,15 \pm 0,01$	0,97
	55	$0,61 \pm 0,01$	$32,7 \pm 0,97$	$0,14 \pm 0,01$	0,97
	70	$0,57 \pm 0,02$	$29,7 \pm 1,07$	$0,14 \pm 0,01$	0,97
0,8	25	$0,71 \pm 0,02$	$37,8 \pm 0,47$	$0,14 \pm 0,01$	0,96
	40	$0,67 \pm 0,01$	$37,0 \pm 0,14$	$0,13 \pm 0,00$	0,96
	55	$0,66 \pm 0,01$	$36,8 \pm 0,13$	$0,13 \pm 0,01$	0,96
	70	$0,65 \pm 0,01$	$37,0 \pm 0,24$	$0,13 \pm 0,01$	0,96

K: índice de consistência; n: índice de comportamento; R²: coeficiente de determinação.

*Média $\pm$ desvio padrão.

Fonte: Yoo*, B. & Kim, C. (2006)

Segundo Galindo *et al.* (1993), muitos motivos podem explicar a variação reportada na literatura para a viscosidade intrínseca. Cita-se entre eles, diferentes linhagens e processos de recuperação, tipo de pré-tratamento (filtração, aquecimento, centrifugação, etc.) a que são submetidas as soluções de xantana antes da determinação viscosimétrica.

Higiro *et al.* (2007) investigou os efeitos de três sais (NaCl, KCl e CaCl₂) nas propriedades viscoelásticas da xantana, goma *locust bean* (LBG) e seus *blends* (Tabela 4.15). Xantana 60%-LBG 40% na ausência de sais apresentou maiores valores de viscosidade

intrínseca devido à forte atração exercida entre as moléculas. Quaisquer dos sais adicionados, independente das soluções analisadas, reduziram drasticamente a viscosidade intrínseca com pronunciado efeito do íon divalente comparado ao monovalente. Outras conclusões pertinentes em relação à Tabela 4.15, com base na concentração dos sais a 50 mM, sugerem forte repulsão no sentido de menores concentrações de xantana ou maiores concentrações de LBG. A mudança na conformação molecular coincidiu com o aumento ou diminuição do componente elástico quando os sais foram removidos ou acrescentados, respectivamente.

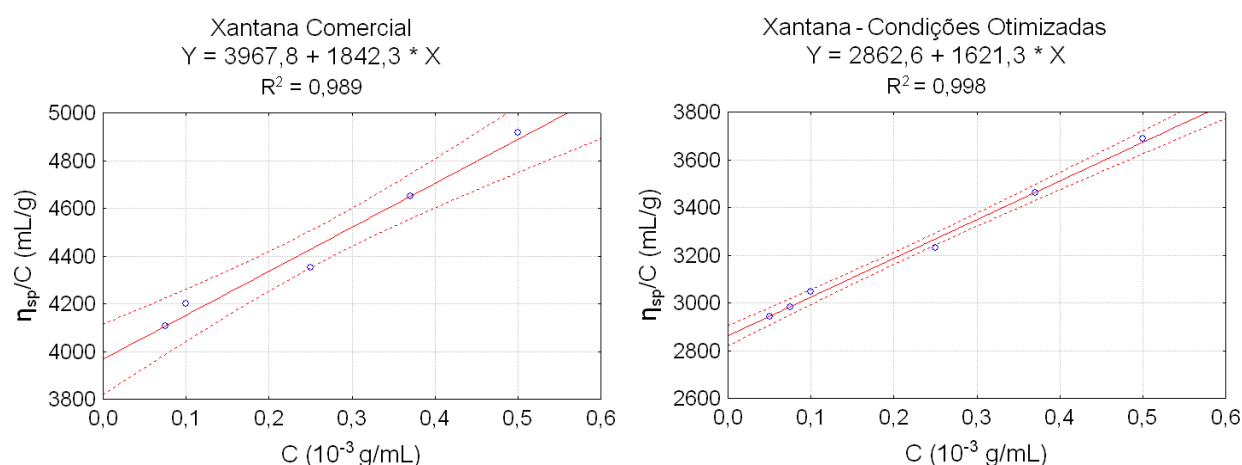


Figura 4.26 – Representa a regressão linear dos dados η_{sp}/C x C para obtenção da viscosidade intrínseca da goma xantana: comercial e nas condições otimizadas.

Tabela 4.15 – Valores de viscosidade intrínseca para a goma xantana, goma *locust bean* (LBG), e seus *blends* com adição de três sais em concentrações selecionadas.

Gum blend	Sais			
	Concentração do Sal (mM)	NaCl (dl/g)	KCl (dl/g)	CaCl ₂ (dl/g)
1. Xantana 100%	0	214,21 ± 0,2	214,21 ± 0,2	214,21 ± 0,2
	5	75,44 ± 1,1	77,93 ± 2,4	63,08 ± 0,8
	50	68,72 ± 1,7	73,82 ± 1,1	59,77 ± 0,5
2. Xantana 60% LBG 40%	0	306,61 ± 4,3	306,61 ± 4,3	306,61 ± 4,3
	5	106,23 ± 1,6	113,48 ± 0,5	48,30 ± 2,6
	50	55,86 ± 0,7	54,21 ± 2,9	44,86 ± 6,3
3. Xantana 40% LBG 60%	0	216,89 ± 0,6	216,89 ± 0,6	216,89 ± 0,6
	5	76,75 ± 4,4	61,6 ± 5,3	35,71 ± 0,8
	50	37,91 ± 1,3	31,92 ± 2,5	33,15 ± 2,1
4. LBG 100%	0	12,49 ± 0,1	12,49 ± 0,1	12,49 ± 0,1
	5	10,36 ± 0,4	11,01 ± 0,1	13,65 ± 0,6
	50	10,75 ± 0,3	11,25 ± 0,2	13,21 ± 0,1

Resultados expressos como média ± desvio padrão

Fonte: Higiro, J. *et al.* (2007).

4.5.4 – Avaliação Térmica da Xantana Comercial e da Xantana Obtida em Condições Otimizadas (TGA-DTA)

As curvas TGA-DTA devidamente interpretadas (Figuras 4.27 e 4.28) ilustram o mecanismo de decomposição térmica para duas amostras de goma xantana. A primeira perda de massa (30 - 140°C) associada ao pico endotérmico é atribuída à desidratação e corresponde a aproximadamente 15% em ambas as situações. A absorção de água pela xantana se deve à presença de grupos polares na sua estrutura, principalmente o grupamento –OH. Analisando as curvas TGA e sua derivada (dTGA) a máxima taxa de decomposição para a primeira degradação térmica, ocorre na temperatura de 58°C e corresponde ao ponto de inflexão da derivada. O segundo processo de degradação (220 a 320°C) vem acompanhado de uma perda de massa superior a 40%, logo, faz-se necessário uma avaliação cautelosa desse evento térmico observado tanto para a xantana comercial quanto para a xantana isolada em condições otimizadas. As temperaturas obtidas, nessa segunda etapa, para a máxima taxa de decomposição foram ligeiramente diferentes, não impedindo, contudo, a comparação entre as amostras analisadas. Obteve-se 294°C e 283°C para a xantana comercial e a produzida neste trabalho, respectivamente, o que lhes confere estabilidade térmica semelhante. Os termogramas mostram ainda, com base na curva de DTA, a predominância de processos exotérmicos na segunda degradação e nos eventos secundários subsequentes.

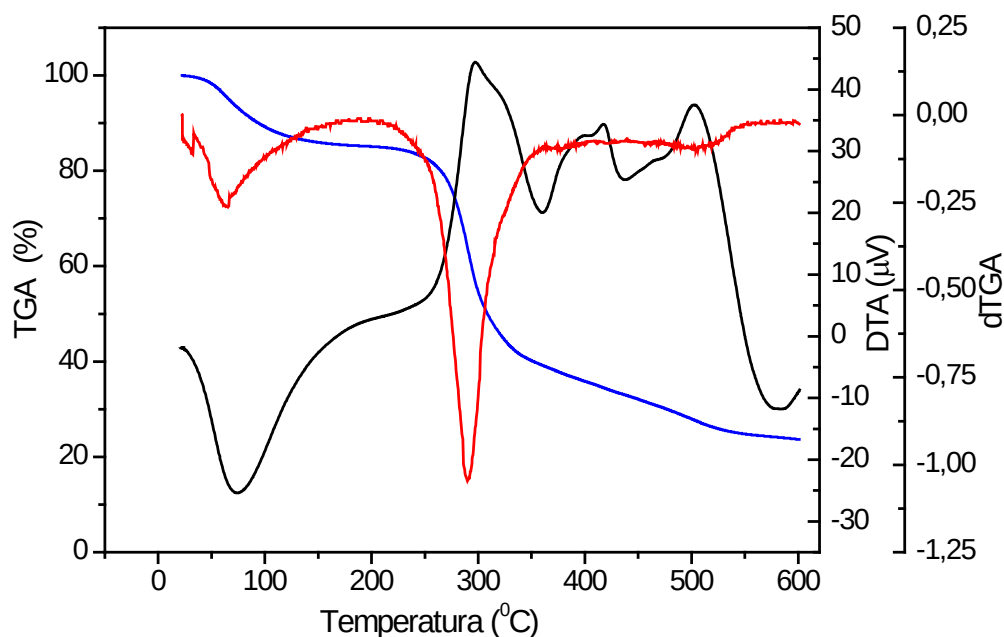


Figura 4.27 – Curvas TGA-DTA simultâneas para xantana comercial; razão de aquecimento igual a 20°C.min⁻¹; atmosfera de nitrogênio 30 mL.min⁻¹. (TGA — curva azul; dTGA — curva vermelha; DTA — curva preta).

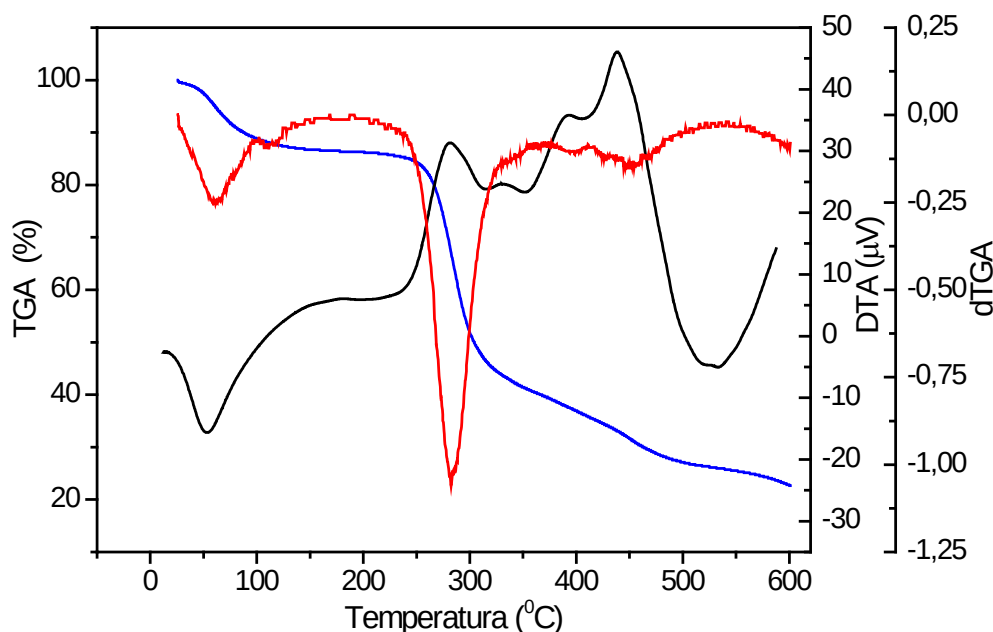


Figura 4.28 – Curvas TGA-DTA simultâneas para xantana nas condições otimizadas; razão de aquecimento igual a $20^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$; atmosfera de nitrogênio $30\text{ mL}.\text{min}^{-1}$. (TGA — curva azul; dTGA — curva vermelha; DTA — curva preta).

Zohuriaan & Shokrolahi (2004) relataram dados termogravimétricos para diferentes polissacarídeos, inclusive a goma xantana, conforme estágios de decomposição apresentados na Tabela 4.16. Assim sendo, os eventos térmicos analisados neste estudo podem ser comparados àqueles decorrentes da pesquisa divulgada por Zohuriaan & Shokrolahi (2004), apesar das pequenas variações encontradas para as faixas de degradação térmica associada à goma xantana. Sabe-se que diversos fatores contribuem, de forma isolada ou simultânea, afetando o formato das Curvas TGA-DTA e, conseqüentemente alterando, promovendo deslocamentos nas faixas de temperaturas, mascarando picos, por sobreposição, ou ainda, ocultando processos não detectáveis em baixas razões de aquecimento.

A Figura 4.29 refere-se aos estudos termogravimétricos propostos por Soares *et al.* (2005) para diferentes proporções de xantana combinada com amido de milho ou trigo. As curvas TG indicaram um único estágio de perda de massa para o biopolímero puro e seus *blends* no intervalo de temperatura entre $275 - 360^{\circ}\text{C}$. A xantana (polissacarídeo iônico) apresentou menor estabilidade térmica se comparada ao amido (polissacarídeo neutro). Tal fato se fundamenta na razão amilose/amilopectina presente nos amidos e suas interações com aquele EPS induzindo estabilidades térmicas distintas quando apreciados os mecanismos de decomposição. A 300°C visando à identificação dos produtos gasosos derivados da degradação, foram adquiridos espectros FT-IR, para as amostras de xantana e os amidos puros e, para os *blends* (xantana/amido de milho: 50/50 e xantana/amido de trigo: 50/50). Uma banda larga na

região de 2750 a 3300 cm^{-1} observada durante esse evento provavelmente representa a decomposição de grupos β -D-manopiranosil constituintes da cadeia lateral da goma xantana, sendo que, os produtos voláteis de baixo peso molecular associados à cisão de grupos carboxilatos, CO_2 e CO , tiveram suas bandas confirmadas em 2363 e 2174 cm^{-1} , respectivamente. Ácidos carboxílicos absorveram fortemente em 1778 cm^{-1} devido à ligação $\text{C}=\text{O}$ da carbonila. Além disso, os autores relataram que a degradação da xantana inicia-se com a ruptura de grupos pertencentes à cadeia lateral com subsequente desdobramento da cadeia principal.

Tabela 4.16 – Dados termogravimétricos (TGA e DTG) de polissacarídeos naturais e modificados.

Polissacarídeos	Nº de estágios de decomposição	Faixa de temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	DTG máxima ($^{\circ}\text{C}$)	% perda de massa	Energia de ativação* (KJ/mol)
Goma Arábica	1	32,9-164,6	74,6	7,5	-
	2	223,4-377,5	315,9	56,5	122
<i>Tragacanth gum</i>	1	35,0-193,1	104,5	7,1	-
	2	231,7-306,9	267,3	43,9	258
Goma Xantana	1	30,0-91,3	74,6	8,7	-
	2	251,5-330,3	290,8	41,6	179
Alginato sódio	1	32,0-140,3	80,6	7,2	-
	2	212,1-277,2	245,5	37,1	188
Quitosana	1	45,0-90,0	47,0	6,6	-
	2	282,5-358,4	325,5	40,5	219
CMC sódio	1	42,0-196,4	146,3	7,2	-
	2	263,5-328,6	303,4	40,6	230
Hidroxietil celulose (HEC)	1	34,0-95,5	59,7	2,3	-
	2	233,1-354,2	298,9	65,9	121
Metil celulose (MC)	1	324,7-415,0	370,4	79,0	232

* Energia de ativação para o maior estágio de decomposição de acordo com o método de Broido.

Fonte: Zohuriaan*, M. J. & Shokrolahi, F. (2004)

Ao confrontar as análises térmicas das amostras de xantana com a literatura nota-se a importância de pesquisas complementares na elucidação do comportamento térmico de gomas, sejam puras ou associadas (*blends*), na comprovação da melhoria de suas propriedades para aplicações específicas.

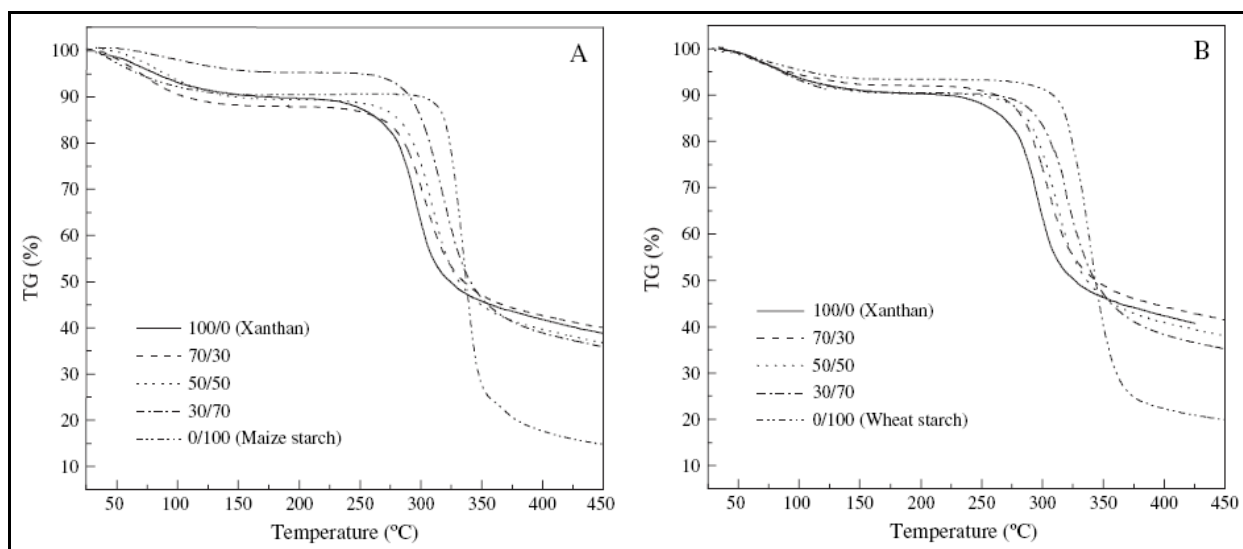


Figura 4.29 – Curvas Termogravimétricas: (A) xantana/amido de milho, e (B) xantana/amido de trigo medidos a uma razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ sob atmosfera inerte de nitrogênio.

Fonte: Soares *et al.*, 2005.

4.5.5 – Caracterização Espectroscópica por Ressonância Magnética Nuclear de Próton

A goma xantana possui uma conformação molecular rígida, ocasionando fortes interações dipolares entre os núcleos de hidrogênio e carbono, refletindo alargamento da linha de ressonância (RINAUDO *et. al.*, 1983). Com isso, os sinais não são detectados em circunstâncias de rotina dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons RMN ^1H (LIMA, 1999).

A princípio, os espectros de RMN ^1H obtidos para a goma xantana produzida especialmente em condições otimizadas, foram realizados em quatro temperaturas (25°C, 50°C, 70°C e 90°C) para verificar a situação experimental onde os sinais pudessem ser melhor interpretados. De modo geral, utiliza-se como padrão acetato de sódio, em baixas concentrações ($\cong 10^{-3}$ M) objetivando a quantificação dos teores dos grupamentos acetila e piruvato. Atribui-se valor igual a 100 para a área de integração equivalente ao acetato de sódio e, por correspondência, integrar-se-ia os picos referentes àqueles substituintes, caso fossem registrados (LIMA, 1999).

A temperatura que permitiu maior nitidez para identificação dos sinais observados ocorreu a 70°C, conforme Figura 4.30. A coleta dos espectros efetuada na ausência de padrão (acetato de sódio) impossibilitou a integração dos sinais inerentes aos grupos acetila e piruvato.

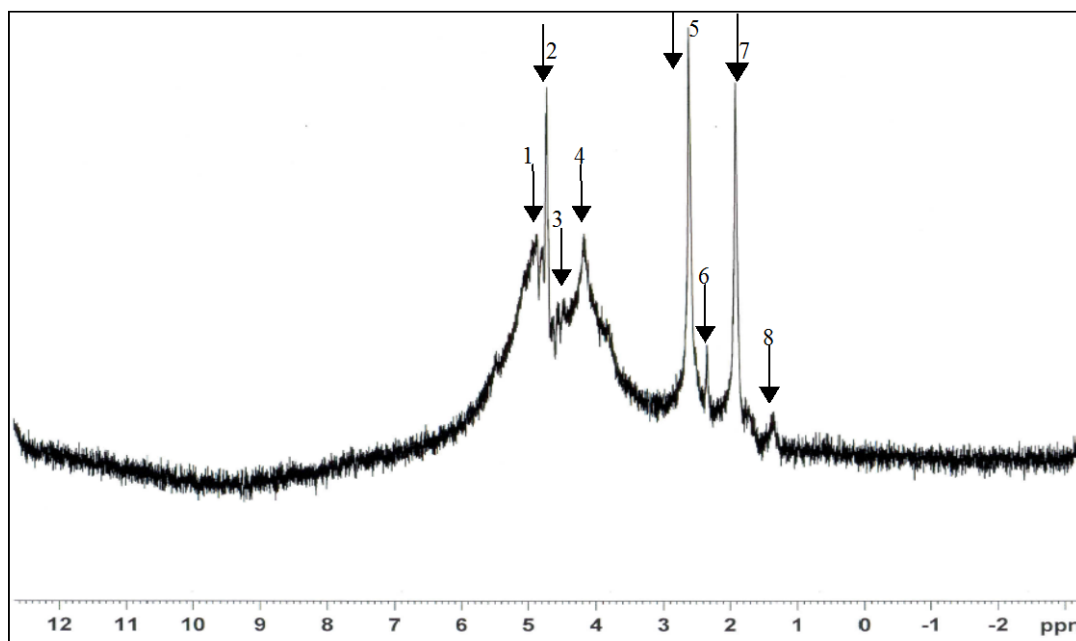


Figura 4.30 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H -RMN) para a amostra de xantana nas condições otimizadas, obtido em água deuterada (D_2O) a 70°C . 1- Prótons α -anoméricos de hexoses (Man) (4,9 ppm); (2,3)- Prótons de carbonos β de hexoses (4,6; 4,7 ppm); 4- Prótons de carbonos conectados a oxigênio (4,3 ppm); (5,6,7)- Prótons de ácidos glucurônicos (1,8; 2,3; 2,5 ppm); 8- Próton de H6 de ramnose (1,3 ppm); (7,8)- Pode representar prótons pertencentes ao grupamento acetila (1,3; 1,8 ppm).

Sabe-se que os teores em grupamento acetila e piruvato dependem da linhagem bacteriana, bem como das condições do processo fermentativo, tais como: tempo de fermentação, fonte de carbono, disponibilidade de oxigênio, nitrogênio e demais nutrientes envolvidos na biossíntese (SANDFORD *et. al.*, 1977). A variação destes grupos altera as propriedades reológicas da xantana (HOLZWARTH & OGLETREE, 1979).

Lima (1999) caracterizou por ^1H -RMN gomas produzidas a partir de três linhagens de *Xanthomonas campestris* por uma série de experimentos e, reafirmou o efeito benéfico de se elevar a temperatura das soluções para facilitar o escoamento das mesmas, devido à redução de viscosidade, proporcionando, contudo, o afastamento das cadeias laterais em relação ao esqueleto polimérico da molécula de xantana, reportando inclusive, um aumento de intensidade nos sinais de ressonância.

A determinação por Ressonância Magnética Nuclear de Prótons dos grupamentos acetila e piruvato da xantana deve ser *a priori* realizada a temperaturas relativamente altas, acima de 60°C, quando a molécula assume conformação desordenada (LIMA, 1999).

A técnica por Ressonância Magnética Nuclear pode ser ainda investigada para outros núcleos além do hidrogênio (^{13}C , ^{19}F , ^{31}P). Os estudos de ^{13}C em polissacarídeos permitem obter informações estruturais úteis. Assim, e considerando que os deslocamentos químicos (δ ppm) são sensíveis à forma do açúcar, os carbonos anoméricos têm maiores valores de δ entre 90 e 98 ppm nas piranoses, comparativamente às furanoses, os carbonos ligados a grupos $-\text{OH}$ apresentam ressonâncias típicas em $\delta = 65\text{-}67$ ppm, enquanto os carbonos ligados a grupos $-\text{OH}$ axiais têm valores de δ inferiores aqueles ligados a grupos $-\text{OH}$ equatoriais e, finalmente, os átomos de carbono envolvidos em ligações glicosídicas sofrem desvios consideráveis para alta frequência, cujos valores refletem a conformação molecular total (GIL & GERALDES, 2002 *apud* CAMPESTRINI, 2007).

Em se tratando dos deslocamentos químicos relativos à caracterização do componente polissacarídico, alguns são considerados determinantes para a identificação de sua estrutura, constituindo a impressão digital da molécula. Campestrini (2007) mostrou com riqueza de detalhes, os valores de deslocamentos químicos relativos aos carbonos do anel piranosídico e carbonos ligantes do anel na acemanana isolada da FP de *Aloe barbadensis* (Figura 4.31).

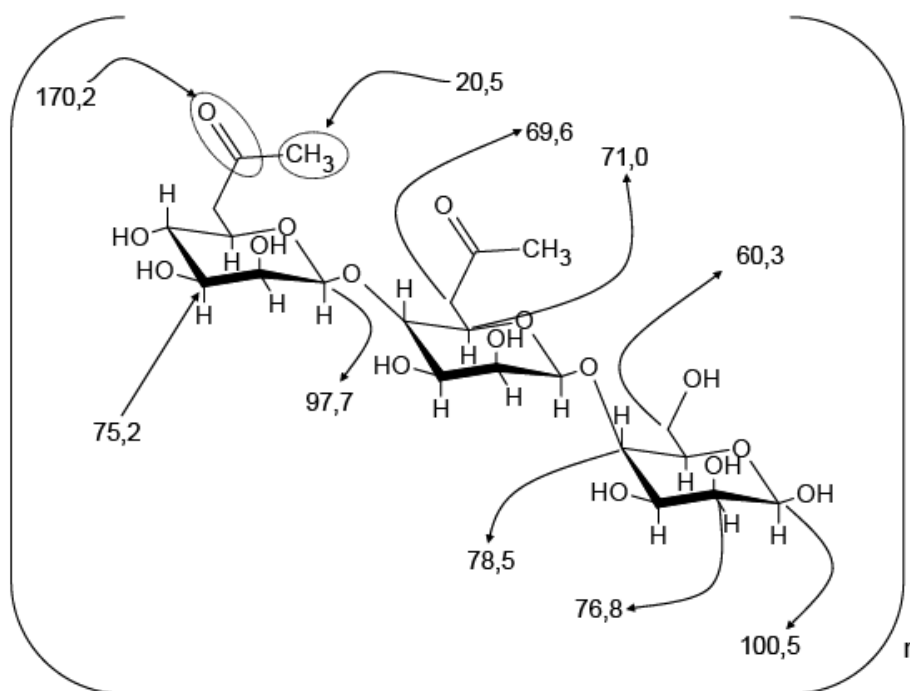


Figura 4.31 – Detalhe da estrutura química do constituinte básico da acemanana isolada da FP de *Aloe barbadensis*, com as indicações dos respectivos valores de deslocamentos químicos (^{13}C -RMN, 9,4 Tesla).

Fonte: CAMPESTRINI, 2007.

Singh *et. al.* (2006) comparando exopolissacarídeos oriundos das linhagens de *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*, BXO1 e BXO8, por ^1H -RMN, evidenciaram para ambos os EPS, a presença de prótons α -anoméricos de hexoses ou pentoses em (5,1; 5,2 ppm), prótons de carbonos β de hexoses ou pentoses (4,8; 4,9 ppm), hidrogênio próximo a grupo $-\text{OH}$ (4,0 ppm) e ácido urônico de hexoses ou pentoses situado em 2,3 ppm. Variações estruturais se confirmaram frente à distribuição de carboidratos para BXO1 e BXO8, porém, somadas às similaridades elucidam tanto os biopolímeros isolados pelas variantes como aquele particularmente otimizado neste trabalho.

4.6 – Produção de Goma Xantana Utilizando Caldo de Cana Hidrolisado por Invertase

O perfil para a fermentação realizada utilizando hidrolisado de caldo de cana, para uma concentração de sacarose igual a 40,0 g/L ($\cong$ 21,0 g/L de glicose), se diferenciou das demais em vários aspectos, sobretudo, com relação ao crescimento celular e o consumo de glicose. A xantana alcançou concentração de 13,70 g/L sobrepondo seu aspecto levemente castanho que compromete o valor comercial. O fator de conversão de substrato (sacarose) a produto foi 0,356 g.g⁻¹, valor este inferior àquele obtido na produção em condições otimizadas ($Y_{P/S} = 0,607$ g.g⁻¹) quando a concentração de sacarose era apenas 27,0 g/L (Figura 4.32). Em contrapartida, durante a fase de crescimento, devido à disponibilidade e assimilação da glicose preferencialmente, níveis elevados de concentração celular marcaram a conveniência da hidrólise enzimática. Um ganho expressivo na produção de células, (2,59 para 7,57 g/L de células), entre os processos já citados, pode representar mudanças no modo de conduzir o sistema fermentativo, sugerindo duas fases distintas: primeiro, propagação celular através do meio contendo caldo de cana hidrolisado; segundo, formação de goma xantana empregando caldo de cana diluído. Nessa direção, Umashankar *et. al.* (1996) e Shu & Yang (1990) concordam que as condições ideais para o crescimento celular e para a polimerização da goma constituem etapas ligeiramente distintas.

No entanto, é importante considerar as alterações no metabolismo celular, as rotas biossintéticas certamente se diferenciaram, resultando em polissacarídeos de natureza química distinta com relação ao que foi submetido a processo de caracterização estrutural.

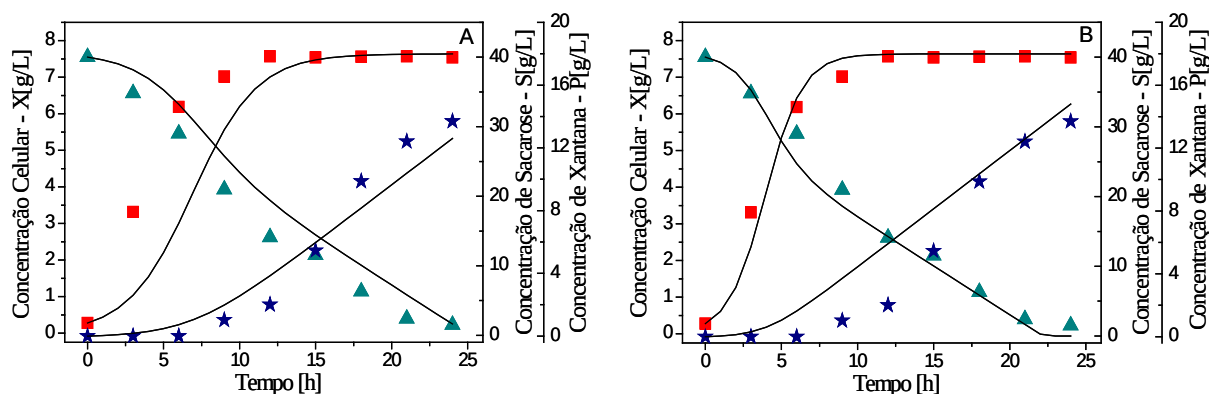


Figura 4.32 – Perfil das concentrações celular (■), sacarose (▲) e goma xantana (★) na condição hidrolisada. Símbolos representam dados experimentais; linhas representam o modelo de Weiss & Ollis (1980). Os parâmetros para ajuste dos dados experimentais: ($X_{\max.} = 7,638$ [g/L]; $\alpha = 1,984$ [gS/gX]; $\beta = 0,183$ [gS(gX.h) $^{-1}$]; $m = 1,092 \cdot 10^{-4}$ [gP/gX]; $\lambda = 9,697 \cdot 10^{-2}$ [gS(gX.h) $^{-1}$]). Figuras A e B obtidas a partir da velocidade específica máxima de crescimento (A $\rightarrow \mu_{\max.} = 0,473$ h $^{-1}$); (B $\rightarrow \mu_{\exp.} = 0,824$ h $^{-1}$).

O modelo de Weiss & Ollis (1980) foi aplicado para descrever os dados experimentais e determinar os parâmetros cinéticos previstos pela equação logística de Verhulst-Pearl e pelo modelo de Luedeking-Piret, conforme Figura 4.32 (A e B). As Figuras 4.32 A e B ilustram a situação proporcionada pela hidrólise enzimática para diferentes velocidades específica máxima de crescimento, (0,473 e 0,824 h $^{-1}$), respectivamente. O ajuste feito no ponto ótimo (27,0 g/L de sacarose; 1,8 g/L de extrato de levedura; 0,8 g/L NH₄NO₃; 750 rpm e 0,35 vvm) estimou $\mu_{\max.}$ igual a 0,473 h $^{-1}$ e ($X_{\max.} = 2,624$ [g/L]; $\alpha = 3,975$ [gS/gX]; $\beta = 0,368$ [gS(gX.h) $^{-1}$]; $m = 3,894 \cdot 10^{-4}$ [gP/gX]; $\lambda = 0,346$ [gS(gX.h) $^{-1}$]) mas, como o modelo de Weiss & Ollis é função da concentração celular e para a hidrólise verificou-se elevada produção de células, então, adotou-se $\mu_{\exp.}$ para ajustar satisfatoriamente os dados (Figura 4.32 B), uma vez que, este comportamento já era esperado. Sendo assim, prever os eventos cinéticos de vários sistemas microbianos requer conhecimento preliminar dos balanços envolvendo substrato, produto, célula e, em muitos casos, faz-se necessário adicionar parcelas incorporando os nutrientes de maior expressividade.

Os resultados e discussões apresentados, nesse estudo, formam um conjunto de respostas válidas estritamente na faixa preconizada e a caracterização da goma xantana, decorrente de um processo definido a partir do ponto ótimo, concorrem e complementam pesquisas na área biotecnológica, na tentativa de elucidar o complexo mecanismo de produção de biopolímeros, como a xantana e outros EPS's potencialmente explorados.

Capítulo 5 - Conclusões

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- ✓ A melhor fonte de nitrogênio testada para suplementar o meio de fermentação nas condições pesquisadas foi o nitrato de amônio;
- ✓ O ponto definido para as concentrações de sacarose, extrato de levedura e nitrato de amônio no primeiro planejamento, localizado nas proximidades do ponto otimizado, que maximizou as respostas concentração de goma, conversão de substrato a produto e viscosidade da goma na concentração de 1% a $0,75\text{ s}^{-1}$ corresponde a **27,0 g/L de sacarose, 1,8 g/L de extrato de levedura e 0,8 g/L NH_4NO_3** . Nessas condições específicas os valores obtidos para as respostas foram de 15,80 g/L de goma, $0,585\text{ g.g}^{-1}$ de conversão e 22101,0 cP;
- ✓ O ponto definido para a agitação e a aeração no segundo planejamento, considerando o preparo do meio selecionado anteriormente, que maximizou as respostas concentração de goma, conversão de substrato a produto e viscosidade da goma na concentração de 1% a $0,75\text{ s}^{-1}$ corresponde a **750 rpm e 0,35 vvm**. Esse ensaio promoveu uma produção de 16,40 g/L de goma xantana, $Y_{P/S} = 0,61\text{ g.g}^{-1}$ de conversão e $\mu_{1\%} = 23000,0\text{ cP}$ confirmando a previsão estimada através dos modelos estatísticos ajustados, para cada resposta de interesse, susceptíveis apenas a variações próprias de desvio padrão.
- ✓ A realização dos dois planejamentos resultou em reduções significativas, na concentração de extrato de levedura e nos níveis de agitação e aeração, se baseadas na literatura sem, contudo, comprometer o desempenho do processo.
- ✓ A cinética estudada na região de otimização das variáveis foi ajustada pelo modelo de Weiss & Ollis (1980). Este modelo cinético descreveu satisfatoriamente o crescimento celular, a produção de xantana e o consumo da fonte de carbono. A identificação paramétrica estimou valores de $\mu_{\max.}$ ($0,473\text{ h}^{-1}$), $X_{\max.}$ ($2,624\text{ g/L}$), m ($3,894 \cdot 10^{-4}\text{ gP/gX}$), λ ($0,346\text{ gP(gX h)}^{-1}$), α ($3,975\text{ gS/gX}$) e β ($0,368\text{ gS(gX h)}^{-1}$) mostrando coerência, apesar de apresentar notável discrepância, quando comparada com a literatura. A conversão de substrato a produto $Y_{P/S}$ dada pelo modelo e a experimental foi de $0,597\text{ g.g}^{-1}$ e $0,61\text{ g.g}^{-1}$, respectivamente. Os parâmetros para ajuste dos dados (X, S, P) provenientes da fermentação utilizando hidrolisado de caldo de cana

foram: ($\mu_{\max.} = 0,824 \text{ [h}^{-1}\text{]}$; $X_{\max.} = 7,638 \text{ [g/L]}$; $m = 1,092 \cdot 10^{-4} \text{ [gP/gX]}$; $\lambda = 9,697 \cdot 10^{-2} \text{ [gS(gX.h)}^{-1}\text{]}$; $\alpha = 1,984 \text{ [gS/gX]}$ e $\beta = 0,183 \text{ [gS(gX.h)}^{-1}\text{]}$).

✓ A caracterização química do EPS forneceu a seguinte relação para os carboidratos mais relevantes: glucose, manose e ácido glucurônico de 1,79:1,33:1.

✓ A massa molecular ponderal média (M_w) encontrada para a xantana, admitindo a biossíntese conduzida no ponto ótimo, foi $4,172 \cdot 10^6$ Da assegurada pelo índice de polidispersão (M_w/M_n) igual a 1,014.

✓ O espectro FT-IR das amostras produzidas, no ponto ótimo e por hidrólise do caldo, seguiram o mesmo comportamento de emissão de bandas do padrão comercial.

✓ O espectro de $^1\text{H-RMN}$ coletado gerou deslocamentos químicos para prótons α -anoméricos de hexoses ou pentoses; prótons de carbonos de hexoses ou pentoses; prótons de carbonos conectados a oxigênio; próton de H6 de ramnose e prótons de ácidos glucurônicos e urônicos.

✓ As análises térmicas pontuaram, para o principal evento, taxas de degradação máxima ocorridas em 294°C (comercial) e 283°C (biossintetizada neste trabalho).

✓ Todas essas considerações mencionadas se somaram demonstrando que a produção de goma xantana a partir de caldo de cana-de-açúcar merece pesquisas complementares, pois vários aspectos do mecanismo ligados à biossíntese de polissacarídeos permanecem obscuros, no entanto, esta via fermentativa pode se tornar viável, e até mesmo constituir uma alternativa aos processos industriais, haja visto, que as unidades produtoras deste biopolímero se diferem pelo emprego da matéria-prima.

Sugestões para trabalhos futuros

- ✓ Realizar fermentações utilizando volumes maiores de meio (*scale-up*).
- ✓ Considerar o processo como sendo duas fases distintas: crescimento celular e produção de xantana; investigar criteriosamente cada estágio.
- ✓ Testar outras fontes de sacarose, por exemplo, sorgo doce.
- ✓ Caracterizar a goma biossintetizada empregando hidrolisado de caldo de cana.
- ✓ Refinar o processo de purificação por técnicas de ultrafiltração.
- ✓ Explorar junto a outras áreas do conhecimento as rotas metabólicas envolvidas na biotransformação do carboidrato a polissacarídeo.

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*, 14, 265 – 269, 1998.
- ARENS, P. L. A study on the Differential Thermal Analysis of Clays and Clays Minerals., Excelsiors Foto-Offset, The Hague, 1951.
- 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.
- BARBOSA, L. C. A. Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. 189p., Viçosa: Ed. UFV, 2007.

- 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.
- BECKING, J. H. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. *Soil Science.*, 118 (3), p. 196 – 212, 1974.
- BELTON, P. S.; COLQUHOUN, I. J.; KEMSLEY, E. K.; DELGADILLO, I.; ROMA, P.; DENNIS, M. J.; SHARMAN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K.; SPRAUL, M. Applications of chemometrics to the ¹H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties. *Food Chemistry*. v. 61, n. ½, p. 207 – 213, 1998.
- BENICHO, A., ASERIN, A., LUTZ, R., GARTI, N. Formation and Characterization of Amphiphilic Conjugates of Whey Protein Isolate (WPI)/Xanthan to Improve Surface Activity. *Food Hydrocolloids*, 21, 379 – 391, 2007.
- BILANOVIC, D., GREEN, M. & SHELEF, G. Xanthan fermentation of citrus waste. *Bioresource Technology*, 48, 169 – 172, 1994.
- BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A. *Introdução à química de alimentos*. 2. ed. São Paulo: Varela Ltda, 1989. Cap. 1. 223 p.
- BORZANI, W. Engenharia bioquímica In: BORZANI, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., SCHMIDELL, W. 1ª ed. São Paulo, Edgard Blücher, 2001. (Biotecnologia Industrial, v. 2).
- BORZANI, W. Cinética de processo fermentativo. In: BORZANI, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E. ed. *Engenharia bioquímica*. São Paulo, Edgard Blücher, 1986. p. 165 – 184. (Biotecnologia, v. 3).
- 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, v. 1, p. 199 – 210, 1984.
- BROCK, T. D., MADIGAN, M. T. Biology of microorganisms. 6. ed. New Jersey: Prentice-Hall Internacional Editions, 1991, 874 p.
- BRUNELLO, G. & CONCONE, B. R. V. Agitação e aeração em fermentadores. In: BORZANI, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E. ed. Engenharia Bioquímica, São Paulo, Edgard Blücher, p. 137 – 167, 1986.
- CADMUS, M. C., ROGOVIN, S. P., BURTON, K. A., PITTSLEY, J. E., KNUTSON, C. A., JEANES, A. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. Can. J. Microbiol., 22, p. 942 – 948, 1976.
- CADMUS, M. C., KNUTSON, C. A., LAGODA, A. A., PITTSLEY, J. E., BURTON, K. A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. Biotechnol. Bioeng., 20, p. 1003 – 1014, 1978.
- CAMPBELL, C., GORDON, S., SMITH, C. L. Anal. Chem., 31, 1188, 1959.
- CAMPESTRINI, L. H. *Aloe barbadensis* Miller: Análise do Perfil Metabólico e Estudos dos Efeitos Vasculogênicos e Angiogênicos do Extrato do Parênquima de Reserva, da Fração Polissacarídica (FP) e da Acemanana; Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- CASTRO, A. F. P. Curva de crescimento bacteriano e noções sobre bacteriologia quantitativa. Campinas, UNICAMP, 25 p. (apostila de TC1), 1993.
- ČERNÁ, M.; BARROS, A. S.; NUNES, A.; ROCHA, S. M.; DELGADILLO, I.; COPIKOVA, J.; COIMBRA, M. A. Use of FT-IR spectroscopy as tool for the analysis of polysaccharide food additives. Carbohydrate Polymers. v. 51, p. 383 – 389, 2003.

- CHAVES, N. A. Produção e Caracterização do Exopolissacarídeo sintetizado por *Rhizobium tropici* CIAT 899. Rio de Janeiro: UFRJ, 2000. 128 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.
- CHEN, W. P., CHENG, S. L., LAI, C. L. Studies on gum production II. Cultivation conditions in laboratory. Report of Taiwan Sugar Research Institute, Tainan, Taiwan. Republic of China. Taiwan sugar, 69, p. 45 – 52, 1975.
- CHEN, W. P. & TSOU, C. H. A new potencial product from sucrose microbial gum. Taiwan Sugar Research Institute, Taipei, Taiwan. Republic of China. Taiwan sugar, 23, p. 14 – 16, 1976.
- 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).
- CHOI, Y. H.; HYE, K. K.; HAZEKAMP, A.; ERKELENS, C.; LEFEBER, A. W. M.; VERPOORTE, R. Metabolomics differentiations of *Cannabis sativa* cultivars using ¹H NMR spectroscopy and principal component analysis. Journal of Natural Products. v. 67, p. 953 – 957, 2004.
- CHRISTENSEN, B. E., KJOSBAKKEN, J., SMIDSROD, O. Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produce by marine, periphytic *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2021. Applied and Environmental Microbiology 50 (4), p. 837 – 845, 1985.
- 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.
- CORPE, W. A. Factors influencing growth and polysaccharide formation by strains of *Chromobacterium violaceum*. *J. Bacteriol.*, 88, p. 1433 – 1441, 1964.
- 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.
- DÉLÉRIS, G.; PETIBOIS, C. Applications of FT-IR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring. *Vibrational Spectroscopy*. v. 32, p. 129 – 136, 2003.
- DIEHL, B.; TEICHMULLER, E. E. Aloe vera, quality inspection and identification. *Agro Food Industry Hi-Tech*. v. 9, n. 1, p. 14 – 16, 1998.
- DOLS, M., REMAUD-SIMEON, M., WILLEMOT, R. M., VIGNON, M., MONSAN, P. Characterization of the Different Dextranuclease 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.
- ERDEY, L., PAULIK, F., PAULIK, J. *Nature*, 174, 885, 1954.

- 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.
- FARIA, S. Produção de Goma Xantana empregando Caldo de Cana por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459. Uberlândia, 120 p. (Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UFU), 2005.
- FENG, L., LI, X., DU, G., CHEN, J. Characterization and fouling properties of exopolysaccharide produced by *Klebsiella oxytoca*. Bioresource Technology, 100, 3387 – 3394, 2009.
- FENTANES, E. G. Polisacárideos microbianos. In: RAMIREZ, R. Q., (Ed.), Prospectiva de la Biotecnología en México. México: Fundación Javier Barros Sierra, p. 73 – 92, 1985.
- FERREIRA, E. C.; RODRIGUES, S. H. B. G.; FERREIRA, M. M. C.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva. Eclética Química. v. 27, p. 77 – 90, 2002.
- FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. Química Nova. v. 22, p. 724 – 731, 1999.
- 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.
- FREITAS, F., ALVES, V. D., PAIS, J., COSTA, N., OLIVEIRA, C., MAFRA, L., HILLIOU, L., OLIVEIRA, R., REIS, M. A. M. Characterization of an extracellular polysaccharide

- produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresource Technology*, 100, 859 – 865, 2009.
- 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., SALCEDO, G., FLORES, C. *et. al.* Improved shake-flask test for the screening of xanthan-producing microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 9, p. 122 – 124, 1993.
- 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.
- GARCIA-CRUZ, C. H. Contribuição ao estudo dos fatores envolvidos na produção de goma xantana por *Xanthomonas manihotis*. Campinas, 1983. Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP.
- GARCIA-CRUZ*, C. H., ETO, M. T. Produção de goma xantana com *Xanthomonas campestris* por fermentação submersa, e em estado sólido. *Revista Higiene Alimentar*, 21, nº:155, p. 97 – 102, 2007.
- GARCÍA-OCHOA, F., GARCÍA-LEÓN, M. A. & ROMERO, A. Kinetic modeling of xanthan production from sucrose. *Chemical and Biochemical Engineering*, 4, 15 – 20, 1990.
- GARCÍA-OCHOA, F., SANTOS, V. E., CASAS, J. A., GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties – Research review paper, *Biotechnology Advances*, 18, p. 549 – 579, 2000.

- GARGALLO, L. G., RADIC, D. F., ALBUIN, E. S. *et al.* Propriedades hidrodinâmicas. In: Macromolécules en solucion. PNUD-UNESCO (CHI-84/006), Santiago, cap. IV, item 4.1, p. 92 – 106, 1987.
- 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 Glycosyltransferases Based on Amino Acid Sequence Similarities: Prokaryotic α -Mannosyltransferases. Biochemistry Journal, v. 318, p. 133 – 138, 1996.
- GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. Ressonância Magnética Nuclear. Fundamentos e aplicações. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2002.
- 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 BLANSHARD, J. M. V., MITCHELL, J. R. Polysaccharides in food. London: Butterworths, p. 185 – 204, 1979.
- 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 pathogenesis. 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.
- GUO, Q., CUI, S. W., WANG, Q., YOUNG, J. C. Fractionation and physicochemical characterization of psyllium gum. Carbohydrate Polymers, 73, 35 – 43, 2008.

- HACKING, A. J. Economic aspects of biotechnology. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, p. 93 – 128, 1986.
- HAMCERENCU, M., DESBRIERES, J., POPA, M., KHOUKH, A., RIESS, G. New unsaturated derivatives of Xanthan gum: Synthesis and characterization. *Polymer*, 48, 1921 – 1929, 2007.
- 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*; short communication, 70, 105 – 109, 1999.
- 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.
- HIGIRO, J., HERALD, T. J., ALAVI, S., BEAN, S. Rheological study of xanthan and locust bean gum interaction in dilute solution: Effect of salt. *Food Research International*, 40, 435 – 447, 2007.
- HOLT, John G. et al. (Ed.) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p., p. 100.

- HOLZWARTH, G., OGLETREE, J. Pyruvate-free xanthan. *Carbohydrate Research*, v. 76, p. 277 – 280, 1979.
- HONDA, K. *Sci. Rep. Tohoku Univ.*, 4, 97, 1915.
- IONASHIRO, M. “Giolito” Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial, Calorimetria Exploratória Diferencial. 98p. Araraquara, Setembro de 2004.
- 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.
- JEANES, A. R. In: SANDFORD, P. & LASKIN, A. ed. *Extracellular Microbial Polysaccharides*. Washington, American Chemical Society, p. 284 – 298, 1977.
- JEANES, A. R., ROGOVIN, P., CADMUS, M. C., SILMAN, R. W., KNUTSON, C. A. Polysaccharide of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. ARS-NC-51. Washington, D. C. Agriculture Research Service, U. S. Department of Agriculture, 1976.
- KAMBOUROVA, M., MANDEVA, R., DIMOVA, D., POLI, A., NICOLAUS, B., TOMMONARO, G. Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by *Geobacillus tepidamans* V264 isolated from Bulgarian hot spring. *Carbohydrate Polymers*, 77, 338 – 343, 2009.
- KATON, J. E. Infrared microspectrometry. A review of fundamentals and applications. *Micron*. v. 27, n. 5, p. 303 – 314, 1996.

- 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.
- KEYSER, W. L. de, *Nature*, 172, 364, 1953.
- KHAN, T., PARK, J. K., KWON, J-H. Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. *Korean J. Chem. Engineering, Journal Review* 24(5), 816 – 826, 2007.
- KIM, C., YOO, B. Rheological properties of rice starch–xanthan gum mixtures. *Journal of Food Engineering*, 75, 120 – 128, 2006.
- KÖPLIN, R., ARNOLD, W., HÖTTE, B., SIMON, R., WANG, G. E., PÜHLER, A. Genetics of Xanthan Production in *X. campestris*: the *xanA* and *xanB* Genes are Involved In UDP-Glucose and GDP-Mannose Biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, v. 174, n. 1, p. 191 – 199, 1992.
- LE GALL, G.; PUAUD, M.; COLQUHOUN, I. J. Discrimination between orange juice and pulp wash by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy: Identification of marker compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 49, p. 580 – 588, 2001.
- LEE, J. K.; LEE, M. K.; YUN, Y. P.; KIM, Y.; KIM, J. S.; KIM, Y. S.; KIM, K.; HUAN, S.S.; LEE, C. K. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *International Immunopharmacology*, v. 1, p. 1275 – 1284, 2001.

- LETISSE, F., LINDLEY, N. D. & ROUX, G. Development of a phenomenological modeling approach for prediction of growth and xanthan gum production using *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Progress*, 19, 822 – 827, 2003.
- LILLY, V. G., WILSON, H. A., LEACH, J. G. Bacterial Polysaccharides II. Laboratory – Scale Production of Polysaccharides by species of *Xanthomonas*. *Appl. Microbiol.*, 6, p. 105 – 108, 1958.
- 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, R. & BACKING, J. H. Polysaccharide production by *Beijerinckia* and *Azotobacter*. *Microbiol. Espãn.*, 21, p. 53 – 75, 1968.
- 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*, volume 63, Issue 1, p. 111 – 115, 2004.
- LUEDEKING, R. & PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation: batch process at controlled pH. *Journal of Biochemistry, Microbiology and Technological Engineering*, 1, 393 – 412, 1959.

MACKENZIE, R.C., *Thermochim. Acta*, 28, 1, 1979.

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

MANRESA, A., ESPUNY, M. J., GIUNEA, J., COMELLES, F. Characterization and production of a new extracellular polymer from *Pseudomonas sp* GSP-910. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 26, p. 347 – 351, 1987.

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

MARIUZZO, D. M., SCAMPARINI, A. R. P., SOUZA, M., MAZIERO, G. C., VENDRUSCOLO, C. T. Use of xanthan gum in non-fat dairy desserts. In: *GUM AND STABILIZERS FOR THE FOOD INDUSTRY CONFERENCE*, 7., 1993. Wrexhan, Reino Unido. Abstracts p. 87.

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.

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

MIAN, A. F., JARMAN, R. T., RIGHELATO, C. R. Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 134 (2), p. 418 – 422, 1978.

MISAKI, A. Structural aspects of some functional polysaccharides. In: NISHINARI, K. & DOI, E. ed. *Food hydrocolloids*. New York, Plenum Press, p. 1 – 20, 1993.

- MOCHI, A. C. & SCAMPARINI, A. R. P. Xanthan gum production from Brazilian strains. In: NISHINARI, K. & DOI, E. ed. Food hydrocolloids. New York, Plenum Press, p. 147 – 150, 1993.
- MORAINÉ, R. A., ROGOVIN, P. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. Biotechnology Bioengineering, VIII, p. 511 – 524, 1966.
- MORAINÉ, R. A. & ROGOVIN, P. Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH control. Biotechnology Bioengineering, 13, 381 – 391, 1971.
- MORRIS, V. J.; BROWNSEY, G. J.; RIDOUT, M. J. Acetan and related polysaccharides. Polymer News, v. 18, p. 294 – 300, 1993.
- 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, Parte B Cap XXIII. p. 513, 1973.
- 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.
- NI, Y.; TURNER, D.; YATES, K. M.; TIZARD, I. Aloe polysaccharides. In Aloes – The genus Aloe [Tom Reynolds org]. Boca Raton: CRC press, 2004b.

- 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).
- PAPAGIANNI, M., PSOMAS, S. K., BATSILAS, L., PARAS, S. V., KYRIAKIDIS, D. A., LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. *Process Biochemistry*, 37, 73 – 80, 2001.
- PETIBOIS, C.; CAZORLA, G.; GIN, H.; DÉLÉRIS, G. Differentiation of populations with different physiologic profiles by plasma Fourier-transform infrared spectra classification. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*. v. 137, p. 184 – 190, 2001.
- 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.
- PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e Intermediários Químicos, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Relatório Técnico nº 84 396–205, Laboratório de Biotecnologia Industrial-LBI/CTPP, São Paulo, 119p, 2006.
- PURCELL, D. E.; O'SHEA, M. G.; KOKOT, S. Role of chemometrics for at-field applications of NIR spectroscopy to predict sugarcane clonal performance. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. IN PRESS, 2006.
- QUEIRÓZ, J. H. Contribuição ao estudo da produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides*. Campinas, 1987, 118 p. (Tese de Mestrado, FEA, UNICAMP).
- 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.
- RAO, M. A. Flow and functional models for rheological properties of fluid foods. In M. A. Rao (Ed.), *Rheology of fluid and semisolid foods* (pp. 25–58), (1999a). Maryland: Aspen Pub.
- REZZOUG, S.A., MAACHE-REZZOUG, Z., MAZOYER, J., JEANNIN, M., ALLAF, K. Effect of instantaneous controlled pressure drop process on the hydration capacity of scleroglucan: optimisation of operating conditions by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 42, 73 – 84, 2000.
- RINAUDO, M., MILAS, M., LAMBERT, F. ^1H and ^{13}C NMR investigation of xanthan gum. *Macromolecules*, v. 16, p. 816 – 819, 1983.

- RINAUDO, M. On the relation structure-properties of some polysaccharides used in the food industry. In: NISHINARI, K. & DOI, E. ed. Food hydrocolloids. New York, Plenum Press, 510 p., 1993.
- 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.
- ROSALAM, S., ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. Enzyme and Microbial Technology 39 (2), 197 – 207, 2006.
- 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, p. 189 – 195, 2003.
- 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.
- SANDERSON, G. R. & CLARK, R. C. Laboratory-produced microbial polysaccharide has many potencial food applications as a gelling, stabilizing and texturizing agent. Food Technology, 37, p. 63 – 70, 1981.

- SANDERSON, G. R. Gellan gum. *Applied Science*, 479, p. 201 – 232, 1990.
- SANDFORD, P. A., BAIRD, J. In: Aspinall GO, editor. *The polysaccharides*. Prague: Academia Press, 1983. pp. 470 – 3.
- SANDFORD, P. A. Potencial important microbial gums In: GLICKSMAN, M. *Food hydrocolloids*. ed., Boca Raton, C.R.C. Press, v. 1, p. 168 – 199, 1982.
- SANDFORD, P. A. – Exocellular Microbial Polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemical and Biochemistry* 36: 265 – 313, 1979.
- SANDFORD, P. A., PITTSLEY, S. E., KNUTSON, C. A. *et. al.* Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Characterization of xanthan products of differing piruvic acid content. *Extracellular Microbial Polysaccharides*, v. 45, p. 192 – 209, 1977.
- SCAMPARINI, A. R. P. Chemical modification of xanthan gum. *Amostra Interna de Trabalhos Científicos*, 3. Campinas, FEA – UNICAMP, 7p, 1993.
- SCIARINI, L.S., MALDONADO, F., RIBOTTA, P.D., PÉREZ, G.T., LEÓN, A.E. Chemical composition and functional properties of *Gleditsia triacanthos* gum. *Food Hydrocolloids*, 23, 306 – 313, 2009.
- SENA, M. M. de; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Química Nova*. v. 23, n.4, p.547 – 556, 2000.
- SERRANO-CARREÓN, L., CORONA, R. M., SÁNCHEZ, A. & GALINDO, E. Prediction of xanthan fermentation development by a model linking kinetics, power drawn and mixing. *Process Biochemistry*, 33 (2), 133 – 146, 1998.
- SEVERS, E. T. Introduction to rheology. In: *Rheology of polymers*, New York: Reinhold Publishing Corporation, Cap. 2., p. 8 – 21, 1962.
- SHU, C.-H., YANG, S.-T. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 35, p. 454 – 468, 1990.

- SILVA, M. F., FORNARI, R. C. G., MAZUTTI, M. A., OLIVEIRA, D., PADILHA, F. F., CICHOSKI, A. J., CANSIAN, R. L., DI LUCCIO, M., TREICHEL, H. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, 90, 119 – 123, 2009.
- 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., Cap. 3, 1979.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Introdução à Espectroscopia de Compostos orgânicos. 6ª ed., Rio de Janeiro: LTC Editora, 2000.
- SINGH, V. B., KUMAR, A., KIRUBAKARAN, S. I., AYYADURAI, N., KUMAR, R. S., SAKTHIVEL, N. Comparison of exopolysaccharides produced by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains, BXO1 and BXO8 that show varying degrees of virulence in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Phytopathology*, v. 154, p. 410 – 413, 2006.
- SKARACIS, G. N., KALOGIANNIS, S., IAKOVIDOU, G., Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses, *Process Biochemistry*, 39, p. 249 – 256, 2003.
- SLODKI, M.E.; CADMUS, M.C. – Production of Microbial Polysaccharides. *Adv. Appl. Microbiol.* 23: 19 – 54, 1978.
- SMALL, G. W. Chemometrics and near-infrared spectroscopy: Avoiding the pitfalls. *Trends in Analytical Chemistry*. v. 25, n. 11, p.1057 – 1066, 2006.
- SMITH, I. H., PACE, W. Recovery of microbial polysaccharides. *Journal of Chemistry Technology & Biotechnology*, v. 32, p. 119 – 129, 1982.
- SOARES, R. M. D., LIMA, A. M. F., OLIVEIRA, R. V. B., PIRES, A. T. N., SOLDI, V. Thermal degradation of biodegradable edible films based on xanthan and starches from different sources. *Polymer Degradation and Stability*, 90, 449 – 454, 2005.

- SOUW, P., DEMAIN, A.L. – Nutritional Studies on Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. Appl. Environ. Microbiol. 37 (6): 1186 – 1192, 1979.
- SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. Advances in Microbial Physiology, 23, 79 – 150, 1982.
- SUTHERLAND, I. W. Extracellular polysaccharide. In: DELLWEY, H. ed. Biotechnology. Weinheim, Verlag Chemie, v.3, p. 553 – 574, 1983.
- 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, 163 p, 1990.
- 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. Institute of Cell and Molecular Biology, University of Edinburgh, Mayfield Road, Edinburgh EH9 3JH, UK. International Dairy Journal, 11, 663 – 674, 2001.
- SZCZESNIAK, A. S. Rheological basis for selecting hydrocolloids for specific applications. In: PHILLIPS, G. O., WEDLOCK, D. J., WILLIAMS, P. A. ed. Gums and stabilizers for the food industry, 3. London, Elsevier, p. 311 – 323, 1985.
- TAGER, A. Physical Chemistry of Polymers, 2. ed. Moscow: Mir Publishers, 652 p, 1978.
- 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.

- TALMADGE, J.; CHAVEZ, J.; JACOBS, L.; MUNGER, C.; CHINNAH, T.; CHOW, J. T.; WILLIAMSON, D.; YATES, K. Fractionation of *Aloe vera* L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. *International Immunopharmacology*, v. 4, p. 1757 – 1773, 2004.
- THARANATHAN, R. N., PRASAD, M. S., SUDHAMANI, S. R. Isolation and characterization of an extracellular polysaccharide from *Pseudomonas caryophylli* CFR 1705. *Carbohydrate Polymers* 56, 423 – 427, 2004.
- 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.
- TORRES, L. G., NIENOW, A. W., SÁNCHEZ, A. et. al. The characterization of a viscoelasticity parameter and other rheological properties of various xanthan gum fermentation broths and solutions. *Bioprocess Engineering*, v. 9, p. 231 – 237, 1993.
- TORRESTIANA, B., FUCIKOVSKY, L., GALINDO, E. Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates. *Letters in Applied Microbiology*, v. 10, p. 81 – 83, 1990.
- TURNER, C. C.; WILLIAMSON, D. A.; STROUD, P. A.; TALLEY, D. J. Evaluation and comparison of commercially available *Aloe vera* L. products using size exclusion chromatography with refractive index and multi-angle laser light scattering detection. *International Immunopharmacology*, v. 4, p. 1727 – 1737, 2004.
- UHLINGER, D. J. & WHITE, D. C. Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalys in *Pseudomonas atlantica*. *Appl. and Environmental Microbiology*, 45 (1), p. 64 – 70, 1983.
- 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.
- VENDRUSCOLO, C. T. Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia sp* isolada do solo cultivado com cana-de-açúcar da região de Ribeirão Preto – São Paulo. Campinas: Unicamp/Engenharia de Alimentos, 1995. 143p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1995.
- VENDRUSCOLO, J. L. Reologia de alimentos fluidos. Seminário apresentado à Escola Politécnica da USP – Departamento de Engenharia Química. São Paulo, Abril, 1990, 20 p.
- VILOCHE BAZÁN, J. H. Estudo da produção enzimática da dextrana clínica. Campinas, 1994, 138 p. (Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP).
- VLACHOS, N.; SKOPELITIS, Y.; PSAROUDAKI, M.; KONSTANTINIDOU, V.; CHATZILAZAROU, A.; TEGOU, E. Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Analytica Chimica Acta*. v. 573 – 574, p. 459 – 465, 2006.
- VOJNOV, A. A., ZORREGUIETA, A., DOW, J. M., et al. Evidence for a role for the *gumB* and *gumA* gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. *Microbiology*, v. 144, p. 1487 – 1493, 1998.
- VORHÖLTER, F-J., SCHNEIKER, S., GOESMANN, A., KRAUSE, L., BEKEL, T., KAISER, O., LINKE, B., PATSCHKOWSKI, T., RÜCKERT, C., SCHMID, J., SIDHU, V. K., SIEBER, V., TAUCH, A., WATT, S. A., WEISSHAAR, B., BECKER, A., NIEHAUS, K., PÜHLER, A. The genome of *Xanthomonas campestris pv. campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *Journal of Biotechnology*, 134, 33 – 45, 2008.
- XIE, L.; YING, Y.; YING, T.; YU, H.; FU, X. Discrimination of transgenic tomatoes based on visible/near-infrared spectra. *Analytica Chimica Acta*. IN PRESS, 2006.

- WALTON, A. G., BLACKWELL, J. Biopolymers. New York: Academic Press, 1973. p 465 – 511.
- WATSON, E. S., O'NEILL, M. J., JUSTIN, J., BRENNER, N. Anal. Chem., 36, 1233, 1964.
- 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.
- WENDLANDT, W. W. J. Chem. Ed., 49, A571, 1972.
- WHISTLER, R. L., BeMILLER, J. N. Industrial gums, 3. ed. San Diego: Academic Press, 642 p., 1993.
- WIEDEMANN, H. G. Achema Congress paper, Frankfurt, Jun. 26, 1964.
- WILKINSON, J. F. The extracellular polysaccharide of bacteria. Bacteriological Review, 22, p. 46 – 73, 1958.
- YALPANI, M., SANDFORD, P. Commercial polysaccharides: recent trends and developments. In: Industrial polysaccharides – Progress in Biotechnology . Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v. 3, p. 311 – 336, 1987.
- YOO, B. & KIM, C. Rheological properties of rice starch–xanthan gum mixtures. Journal of Food Engineering, v. 75, p. 120 – 128, 2006.
- ZAGALLO, A. C., WANG, C. H. Comparative glucose catabolism of *Xanthomonas* species. Journal of Bacteriology, v. 93, p. 970 – 975, 1967.
- ZHANG, L.; TIZARD, I. R. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: The major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. Immunopharmacology, v. 35, p. 119 – 128, 1996.

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 (11/07/2005)