



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

ESCOLA POLITÉCNICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Produção simultânea de goma xantana e microfibrilas de
celulose pela bioconversão de bagaço de cana por
*Xanthomonas***

GLEICE VALÉRIA PACHECO GOMES

Salvador

2014

GLEICE VALÉRIA PACHECO GOMES

**Produção simultânea de goma xantana e microfibrilas de
celulose pela bioconversão de bagaço de cana por
*Xanthomonas***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química.

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Jania Betania Alves da Silva

Salvador

2014

TERMO DE APROVAÇÃO

Produção simultânea de goma xantana e microfibrilas de celulose pela bioconversão de bagaço de cana por *Xanthomonas*

Gleice Valéria Pacheco Gomes

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

Prof a. Dr^a. Janice Izabel Druzian – Orientadora, Doutora em Ciência dos Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Universidade Federal da Bahia

Profa. Dr^a. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma, Doutora em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Samuel Luporini, Doutor em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Universidade Federal da Bahia

Profa. Dr^a. Nádia Mamede José, Doutora em Química, Universidade Estadual de Campinas, Universidade Federal da Bahia

Profa. Dr^a. Zora Ionara Gama Dos Santos, Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande, Universidade Federal de Sergipe.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese às pessoas mais importantes para minha vida a minha mãe Ana Maria e ao meu pai Osmar Gomes a quem devo meu caráter e disciplina ao trabalho. Meu muito obrigado por ter me apoiado em todos os momentos da minha vida, principalmente nos momentos de desânimo e falta de estímulo e por me fazer acreditar que o conhecimento é a única herança eterna que os pais poderão deixar para seus filhos... Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Poucas tarefas são tão agradáveis como o reconhecimento e minha gratidão a todos que colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho de modo tão diferente. Entre estes quero agradecer:

A Deus por ter me guiado, pois reconheço que seria impossível realizar esse sonho se não fosse o Teu amor e a Tua presença. Obrigada Senhor por ter permitindo a concretização de mais uma etapa da minha vida, mantendo minha determinação e fé, nunca me deixando desanimar diante das barreiras impostas pela vida.

Aos amores da minha vida, meus pais Osmar e Ana, minhas irmãs Nadja e Lucimar e meus sobrinhos Raphael, Arthur e Davi, por todo amor, apoio, incentivo e compreensão principalmente nos momentos de ausência.

Ao meu namorado Gene por toda colaboração, paciência e compreensão durante todos esses anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal da Bahia pela oportunidade concedida de aprimoramento profissional e realização nas análises de FTIR realizada com tanta atenção por Sirlene.

À Prof^a. Janice Druzian pela orientação, comprometimento, pelo exemplo de profissionalismo, amor e dedicação à pesquisa.

Aos professores do Programa de Mestrado e Doutorado em Engenharia Química, em especial a Prof^a Silvana Mattedi por toda atenção durante esses longos anos de curso, a Prof^a Nádia Mamede pelas contribuições, disponibilidade e cordialidade com que sempre me recebeu durante todos esses anos e ao Prof^o Samuel Luporini pela amizade, pela disponibilidade em fazer parte da banca deste trabalho e por contribuir cientificamente com o mesmo.

As professoras Jania Betania Alves e Valéria Carvalho, por toda a partilha de saber, paciência, apoio, pelos conhecimentos transmitidos, pelas contribuições, pela disponibilidade, pelas conversas, por fim por contribuírem para minha formação acadêmica e profissional.

A Professora Zora Ionara Gama pela disponibilidade em participar da banca e pela ajuda na realização das análises térmicas.

Aos professores Roberto de Campos Giordano, Raquel Giordano e Antônio José Gonçalves da Cruz pelo acolhimento na UFSCar no período que estive desenvolvendo parte do trabalho, pela troca de conhecimento e amizade.

A turminha do LAPESCA: Lídia, Carol, Larissa, Luciane, Paulo, Márcio, Tamiris, Jaff, Augusto, Livinha, Eulina, Andréa, Lílian e Paula pela amizade, pelos vários momentos divertidos (e outros nem tanto) que passamos juntos. Ter convivido com vocês foi, e ainda é muito importante para mim. Obrigada por todas as conversas, risadas e descontrações nos cafezinhos, na hora do almoço com a “marmitta” diária, nas pipocas durante os intervalos de descanso e pelas partilhas de “musculare”.

À Deni, Bet e Lela por fazerem parte da minha vida e serem mais que meus amigos, meus irmãos, que sempre estiveram comigo principalmente nos momentos de estudo, diversão e companhia de viagens.

Aos amigos do DEQ UFSCar Dasci, Geísa, Letícia, Ivana, Aline, Edson, Adilson, Ana Maria, Sandra, Carol, Gian e Kaká pelo aprendizado e os vários momentos divertidos que passamos juntos.

Aos queridos alunos do IF Baiano *Campus* Sr. do Bonfim, que sentiram a minha ausência e torceram por mim.

Aos meus colegas e amigos do IF Baiano *Campus* Sr. do Bonfim em especial: Daniela, Solange, Cláudia, Viviane, Jaciara, Edvanda, Hildonice, Aécio, Thales, João, Batista e Genésio por me incentivarem a seguir a trilha do conhecimento e estarem sempre ao meu lado a todo o instante.

À Cargill pela concessão do amido de mandioca utilizado nesse estudo.

Ao laboratório de microscopia da Fiocruz em especial a Adriana, Lúcia e Cláudio por toda presteza e atenção nas análises de microscopia eletrônica de transmissão.

Aos amigos do Gecim: Danilo, Cleide, Renato, Ana Paula e Jamersson pela amizade, ajuda nas análises e troca de conhecimentos.

À CAPES pelo apoio financeiro através do projeto Nanobiotec – EDT Nr 04/2008.

Quero expressar agradecimentos (e espero não pecar por esquecimento) àqueles que estiveram ao meu lado continuamente e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende da nossa vontade e perseverança.

Albert Einstein

Resumo

Nas últimas décadas, muitos esforços têm sido realizados na tentativa de substituir os polímeros convencionais pelos biodegradáveis. Assim, faz-se necessário conhecer, sintetizar e caracterizar estes biomateriais. A goma xantana (GX) é um expolissacarídeo obtido por *Xanthomonas*, e é amplamente usado como espessante, dispersante e emulsificante. A maioria das embalagens utiliza matriz polimérica derivado do petróleo. Filmes à base de matriz biodegradável exibem características físicas apropriadas, porém, são quebradiços. Neste contexto, surge a proposta de se incorporar micropartículas para conferir melhorias nas propriedades mecânicas. O objetivo do presente trabalho consiste em produzir simultaneamente GX e microfibrilas de celulose a partir do cultivo de quatro cepas distintas de *Xanthomonas* em meio contendo bagaço de cana (BC), assim como avaliar o efeito da aplicação desta goma microfibrilada como aditivo de reforço mecânico de filmes de amido. Das cepas estudadas a *X. campestris pv. campestris* 254 apresentou o melhor desempenho, produzindo 22,048 g L⁻¹ de GX utilizando a partir da sacarose e 8,54 g L⁻¹ a partir de BC, o que representa, respectivamente, 55,12 % e 22,25 % da bioconversão das fontes de carbono, a 28°C e 250 rpm por 120 h, em *Shaker*. A viscosidade máxima encontrada foi de 120,3 mPa.s (0,5 % xantana, 25°C, 25s⁻¹) para BC como substrato alternativo. Assim, a seleção de cepas é um fator importante para maximizar a produção e viscosidade bem como avaliar a qualidade da goma obtida. A influência da variação da concentração do BC foi avaliada nas seguintes concentrações: 2, 4, 6, 8 e 10 % (m/m) a 28°C, 250 rpm após 120 h em *Shaker*. A utilização de 4% (m/m) de BC apresentou melhores resultados de produção e propriedades da goma xantana. Nesse estudo foi possível constatar a presença de microfibrilas de celulose do (BC) na estrutura da GX por microscopia eletrônica de transmissão. A produção de xantana em biorreator de 1,5 L foi influenciada, individualmente, pela aeração e agitação, sendo favorecida em baixa aeração ou elevada agitação. A máxima produção (7,62 g L⁻¹) obtida a 700 rpm e 1,0 vvm. O aumento da velocidade de agitação no bioprocessamento possibilitou o aumento da viscosidade das soluções de xantana (0,5 %), sendo a maior de 123,80 mPa.s, atingida com 700 rpm e 1,0 vvm. Os modelos empíricos obtidos para a produção e viscosidade das gomas xantana apresentaram um bom ajuste aos dados experimentais, porém, os modelos não foram preditivos. Foram elaborados e caracterizados filmes flexíveis à base de amido de mandioca (4 %) com a incorporação de goma xantana microfibrilada obtida em biorreator (0,00- 0,05 %) utilizando glicerol (0,79-2,00 %) como plastificante o por *casting*. Para fins comparativos foi elaborado um filme flexível sem a adição de goma xantana e (Controle – 4,0 % de amido e 1,5 % de glicerol). Os resultados de umidade mostraram que o aumento da concentração de goma xantana favorece o aumento da umidade no filme. Assim, a menor porcentagem de umidade (12,14 %) foi obtida com 1,0 % de glicerol e 0,015 % de goma xantana. Para a resposta de atividade de água observou-se que o aumento da concentração de glicerol proporcionou o aumento da umidade nos filmes. Sendo a menor resposta (0,625) obtida a 1,5 % de glicerol e 0,05 % de goma xantana. Os modelos obtidos para umidade e atividade de água não apresentaram bom ajuste e não são preditivos. Conclui-se que, a cepa de *Xanthomonas* 254 apresentou melhor adaptação ao meio contendo bagaço de cana, sendo capaz de produzir goma xantana impregnada de microfibrilas, podendo assim, ser empregada em filmes biodegradáveis proporcionando melhores propriedades mecânicas.

Abstract

In recent decades, many efforts have been made in an attempt to replace conventional polymers by biodegradable. Thus, it is necessary to understand, synthesize and characterize these biomaterials. Xanthan gum (XG) is an exopolysaccharide obtained by *Xanthomonas*, and is widely used as a thickener, emulsifier and dispersant. The majority of packaging uses polymeric matrix derived from petroleum. Films to biodegradable matrix based exhibit appropriate physical characteristics, however, are brittle. In this context, there is the proposal to incorporate microparticles to impart improvements in mechanical properties. The aim of this work is to produce both XG and cellulose microfibrils from the cultivation of four different strains of *Xanthomonas* in medium containing bagasse (BC) and to evaluate the effect of the application of microfibrillated gum as mechanical reinforcement additive starch films. Strains of *X. campestris* pv. *campestris* 254 showed the best performance, produced 22.048 g L⁻¹ GX from sucrose and 8.54 g L⁻¹ from BC, representing 55.12 % and 22.25 % respectively of the bioconversion of sources carbon at 28 °C and 250 rpm for 120 h in Shaker. The maximum viscosity was 120.3 mPa.s (0.5 % xanthan, 25 °C and 25 s⁻¹) to BC as an alternative substrate. Thus, the selection of strains is an important factor to maximize production and viscosity, as well as, evaluating the quality of the gum obtained. The influence of varying the concentration of CB was evaluated in the concentrations: 2, 4, 6, 8 and 10 % (w/w) at 28, 250 rpm after 120 h in shaker. The use of 4 % (w/w) of BC showed better production and properties of xanthan obtained. In this study, were determined the presence of cellulose microfibrils from BC in the GX structure by transmission electron microscopy. The xanthan production in a bioreactor of 1.5 L was influenced individually by aeration and agitation, being more favored in low aeration or high shear. The maximum production (7.62 g L⁻¹) obtained at 700 rpm and 1.0 vvm. Increasing the agitation possible to increase the viscosity of xanthan solutions (0.5%), with the largest 123.80 mPa.s reached 700 rpm and 1.0 vvm. The empirical models obtained for the production and viscosity of xanthan gum showed a good fit to the experimental data, but the models were not predictive. Were prepared and characterized the flexible films of cassava starch base (4 %) with the addition of microfibrillated xanthan gum obtained in bioreactor (0.00 – 0.05 %), using glycerol (from 0.79 to 2.00 %) as plasticizer by the casting. For comparative purposes was prepared a flexible film without the addition of xanthan gum and (Control - 4.0% starch and 1.5% glycerol). Results of moisture show that the concentration of xanthan gum promotes increased moisture in the film. Thus, less moisture percentage (12.14 %) was obtained with 1.0 % glycerol and 0.015 % xanthan gum. For the water activity response was observed that increasing the glycerol concentration afforded the increased moisture in the film. It is the smallest response (0.625) obtained at 1.5 % glycerol and 0.05 % xanthan gum. The models obtained for moisture and water activity did not show good fit and are not predictive. In conclusion, the strain of *Xanthomonas* 254 showed better adaptation to the medium containing bagasse, being able to produce xanthan gum impregnated with microfibrils and can thus be used in biodegradable films providing better mechanical properties.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	17
1. INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO 2	20
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	20
CAPÍTULO 3	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1. GOMA XANTANA	22
3.2. CARACTERÍSTICAS, COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DA GOMA XANTANA	25
3.3. PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA	27
3.3.1. INÓCULO	29
3.3.2. MEIO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA	30
3.4. PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA COM DIFERENTES RESÍDUOS	31
3.4.1. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	32
3.5. FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA	33
3.6. RECUPERAÇÃO DA GOMA XANTANA	35
3.7. APLICAÇÕES DA GOMA XANTANA	37
3.8. MICROFIBRILAS DE CELULOSE	39
3.9. FILMES FLEXÍVEIS À BASE DE AMIDO DE MANDIOCA	40
3.9.1. AMIDO	41
3.10. FILMES FLEXÍVEIS DE AMIDO DE MANDIOCA COM GOMA XANTANA	42
3.11. CARACTERIZAÇÃO DE GOMA XANTANA	43
3.11.1. VISCOSIDADE E PSEUDOPLASTICIDADE	43
3.11.2. MASSA MOLECULAR	46
3.11.3. ANÁLISE TÉRMICA (TGA E DSC) DE GOMA XANTANA E DE FILMES FLEXÍVEIS BIODEGRADÁVEIS	49
3.11.4. PROPRIEDADES MECÂNICAS DE FILMES FLEXÍVEIS BIODEGRADÁVEIS	51
3.11.5. CRISTALINIDADE DA GOMA XANTANA	52
3.11.6. ESPECTROSCOPIA DA REGIÃO DO INFRA-VERMELHO DAS GOMAS E DOS FILMES FLEXÍVEIS	53
3.11.7. MICROSCOPIA	54
3.11.7.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	54
3.11.7.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	55
CAPÍTULO 4	57
4. MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1 MATERIAL	57

4.2 MÉTODOS	57
4.2.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (BC)	57
4.2.2. PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA A PARTIR DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	58
4.2.2.1. REPICAGEM DAS CEPAS E PREPARAÇÃO DO INÓCULO	58
4.2.2.3. ETAPAS DO ESTUDO QUANTO A PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA	59
4.2.2.3.1. SELEÇÃO DE CEPAS QUE BIOCONVERTE BAGAÇO DE CANA A GOMA XANTANA	60
4.2.2.3.2. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA NA PRODUÇÃO E VISCOSIDADE DA GOMA XANTANA RESULTANTE	60
4.2.2.3.3. PLANEJAMENTO PARA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA A PARTIR DA CEPA <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV CAMPESTRIS</i> 254 E A CONCENTRAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA SELECIONADOS (BIORREATOR 1,5 L, 28°C, AERAÇÃO (1,0 – 3,0 VVM) , AGITAÇÃO (200 – 700 RPM), 72 HORAS).	60
4.2.2.3.4. APLICAÇÃO DA GOMA XANTANA PRODUZIDA EM BIORREATOR NO DESENVOLVIMENTO FILMES FLEXÍVEIS DE AMIDO	63
4.2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS	64
4.2.4.1. VISCOSIDADE APARENTE DAS GOMAS XANTANA	64
4.2.4.2. MASSA MOLECULAR MÉDIA DA GOMA XANTANA	65
4.2.4.3. COMPOSIÇÃO MONOMÉRICA DA GOMA XANTANA	65
4.2.4.4. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES POR CLAE-IR DAS GOMAS XANTANA	66
4.2.4.5. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS URÔNICOS POR CLAE-UV DAS GOMAS XANTANA	66
4.2.4.6. CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DOS BIOMATERIAIS	66
4.2.4.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM) DOS BIOMATERIAIS	67
4.2.4.8. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DOS BIOMATERIAIS	68
4.2.4.9. DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X (DRX) DAS GOMAS XANTANA	68
4.2.4.10. MEDIDA DE ESPESSURA (E) DOS FILMES	68
4.2.4.11. MEDIDA DA ATIVIDADE DE ÁGUA (AW) DOS FILMES	69
4.2.4.12. MEDIDA DA UMIDADE (U) DOS FILMES	69
4.2.4.13. ENSAIO MECÂNICOS DOS FILMES	69

CAPÍTULO 5 **70**

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	71
5.2. SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE GOMA XANTANA A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA EM <i>SHAKER</i>	71
5.2.1. CARACTERIZAÇÃO DAS GOMAS XANTANA PRODUZIDAS	74
5.2.1.1. VISCOSIDADE APARENTE	74
5.2.1.2. MASSA MOLECULAR	76
5.2.1.3. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	81
5.2.1.4. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	84

5.2.1.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	85
5.4.1.6. ANÁLISES DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	87
5.3. EFEITO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA PRODUÇÃO E VISCOSIDADE DA GOMA XANTANA PELA BACTÉRIA SELECIONADA EM <i>SHAKER</i>	89
5.3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS GOMAS XANTANA PRODUZIDAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAGAÇO POR <i>XANTHOMONAS</i> 254	94
5.3.1.1. MASSA MOLECULAR MÉDIA DE GOMA XANTANA	94
5.3.1.2. ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS	95
5.3.1.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	97
5.4. INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E AERAÇÃO NAS PROPRIEDADES DE GOMAS XANTANA PRODUZIDAS PELA BACTÉRIA SELECIONADA COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM BIORREATOR	99
5.4.1. PROPRIEDADES DAS GOMAS XANTANA SELECIONADAS (E3, E4, E6 E E7)	106
5.4.1.1. MASSA MOLECULAR	106
5.4.1.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS GOMAS XANTANA SELECIONADAS	109
5.4.1.3. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DAS XANTANAS OBTIDAS NOS ENSAIOS E3, E4, E5 E E6.	113
5.4.1.4. DSC DAS GOMAS XANTANA OBTIDAS NOS ENSAIOS E3, E4, E5 E E6.	115
5.4.1.5. FTIR DAS GOMAS XANTANA OBTIDAS NOS ENSAIOS E3, E4, E5 E E6.	116
5.4.1.6. DRX DAS GOMAS XANTANA OBTIDAS NOS ENSAIOS E3, E4, E5 E E6.	117
5.4.1.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS GOMAS XANTANAS SELECIONADAS	119
5.5. APLICAÇÃO DA GOMA XANTANA PRODUZIDA COM BAGAÇO DE CANA E A BACTÉRIA SELECIONADA (MELHORES CONDIÇÕES EM BIORREATOR), NO DESENVOLVIMENTO DE FILMES FLEXÍVEIS DE AMIDO	120
6. CONCLUSÕES	126
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Paca contendo colônias da bactéria <i>Xanthomonas</i> , com a produção do muco (Timmer et al, 2000).	22
Figura 2: Podridão negra causada pela bactéria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> em repolho. Fonte: Google/imagens/ <i>Xanthomonas campestris</i> (07/12/2012).	23
Figura 3: Estrutura unitária (monômero) do polissacarídeo goma xantana.	26
Figura 4: Estrutura da fibra de celulose (Potulski, 2012).	39
Figura 5: Curva esquemática de DSC (Siqueira, 2011).	51
Figura 6: Etapas de processo para produção de goma xantana em escala laboratorial.	59
Figura 7: Biorreator Tecnal-TecBio de 1,5 L (A) utilizado para produção de goma xantana a partir da fermentação de bagaço de cana-de-açúcar e esquema com as variáveis utilizadas no processo (B).	61
Figura 8: Efeito da precipitação da goma xantana oriunda do bagaço de cana-de-açúcar quando adicionado etanol 96°GL (1:3 v/v).	62
Figura 9: Fluxograma ilustrando a distribuição da apresentação dos resultados do trabalho, onde BC = Bagaço de cana e GX = Goma xantana.	70
Figura 10: Produção de goma xantana por diferentes cepas de <i>Xanthomonas</i> empregando sacarose (barras hachuradas) e bagaço de cana-de-açúcar (barras brancas) como substrato em Shaker, a 28°C e 250 rpm. As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para as medições.	72
Figura 11: Curva de calibração Log massas moleculares (MM) dos padrões de dextranas de diferentes de massas moleculares x tempos de retenção (Tr) obtidos por GPC CLAE-IR.	76
Figura 12: Os cromatogramas (GPC CLAE-IR) mostram a distribuição da massa molecular da goma xantana produzida por <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 254 (A), <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> 356 (B), <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 472 (C) e <i>X. campestris</i> pv. <i>cordiae</i> 510 (D) empregando sacarose como fonte de carbono.	77
Figura 13: Cromatogramas (GPC CLAE-IR) mostrando a distribuição da massa molecular da goma xantana Sigma.	78
Figura 14: Cromatogramas (GPC CLAE-IR) da distribuição da massa molecular das gomas xantana produzidas por <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 254 (A), <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> 356 (B), <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 472 (C) e <i>X. campestris</i> pv. <i>cordiae</i> 510 (D) empregando bagaço de cana como fonte de carbono e de nutrientes.	78
Figura 15: Curvas de TGAA de gomas xantana obtidas por <i>X. campestris</i> a partir de sacarose (SAC), bagaço de cana (BC) comparados a goma xantana Sigma.	82
Figura 16: Curvas de DTGAA de gomas xantana obtidas por <i>X. campestris</i> a partir de sacarose (SAC), bagaço de cana (BC) comparados a goma xantana Sigma.	82
Figura 17: Curvas DSC de gomas xantana obtidas por <i>X. campestris</i> a partir de sacarose (SAC), bagaço de cana (BC) comparados a goma xantana Sigma.	84

Figura 18: Microscopia eletrônica de transmissão da goma xantana Sigma em 0,5 μm (A), goma xantana obtida pela cepa de *Xanthomonas* 254 com sacarose 0,2 μm (B), e a goma xantana obtida pela cepa de *Xanthomonas* 254 com bagaço 0,2 μm (C e D). 86

Figura 19: Cromatogramas (CLAE-IR) mostrando a distribuição da massa molecular da goma xantana obtida com bagaço de cana (A), com $\text{Tr} = 22,97$ min, e a Microscopia eletrônica de transmissão (B) da fração do segundo pico coletado das microfibrilas de celulose, com $\text{Tr} = 43,40$ min, da injeção da goma xantana obtida pela cepa de *Xanthomonas* 254 com o bagaço de cana como fonte de carbono em 100nm. 87

Figura 20: Difratoogramas do bagaço de cana-de-açúcar, goma xantana Sigma, goma xantana obtida com bagaço de cana e a cepa 254, goma xantana obtida com sacarose e a cepa 254 e celulose. 88

Figura 21: Produção de goma xantana por *X. campestris* pv. *campestris* 254 empregando diferentes concentrações de bagaço de cana. As barras de variação correspondem a um intervalo de confiança de 95%. 90

Figura 22: Viscosidade aparente de soluções de goma xantana (0,5% m/v) derivada do bagaço de cana 25°C (A), 45°C (B), 65°C (C) e 85°C (D) em diferentes concentrações de bagaço 2% (\square), 4% (\circ), 6% (\triangle), 8% ($*$) and 10% (\diamond). 92

Figura 23: TGAA (linha sólida) e DTGAA (linha pontilhada) curvas de goma xantana obtidas com diferentes concentrações de bagaço: 2%; 4%; 6%; 8%; 10% e Sigma. 96

Figura 24: Espectros de FTIR de gomas xantana produzida utilizando diferentes concentrações de bagaço de cana (2%, 6%, 8% e 10%) e *Xanthomonas* 254. 98

Figura 25: Comportamento da viscosidade aparente das gomas xantanas a 0,5% (m/v), 25°C a 85°C e taxa de cisalhamento de 25 a 1000 s^{-1} obtidas nos quatro ensaios (E3, E4, E6 e E7) a partir das diferentes combinações de aeração e agitação utilizando bagaço de cana e *X. campestris* 254. 101

Figura 26: Cromatogramas das separações por GPC CLAE – IR a) nanowhiskrs de bagaço de cana; b) celulose microcristalina (CMC), obtidas nos Ensaios E3; E4; E6 e E7. 107

Figura 27: Cromatogramas CLAE-IR de adrões de glicose e manose; b) goma xantana Sigma; c) Gomas xantana obtidas nos ensaios E3; d) E4; e) E6; e) E7. 110

Figura 28: Cromatogramas CLAE-IR de a) padrões de ácido glucurônico e ácido pirúvico; b) goma xantana Sigma; c) e Gomas xantana obtidas nos ensaios E3; d) E4; e) E6; f) E7. 111

Figura 29: TGAA (linha sólida) e DTGAA (linha pontilhada) de gomas xantana obtidas nos diferentes Ensaios 3, 4, 6 e 7 em biorreator de 1,5 L. 114

Figura 30: Curvas de goma xantana obtidas nos diferentes Ensaios 3, 4, 6 e 7 em biorreator de 1,5 L. 116

Figura 31: Espectros de FTIR das gomas xantanas obtidas nos Ensaios 3, 4, 6, 7 e a goma xantana padrão (Sigma). 117

Figura 32: Difratoogramas DRX das gomas xantanas obtidas nos Ensaios 3, 4, 6, 7 e a goma xantana padrão (Sigma). 118

Figura 33: Micrografias obtidas da suspensões de goma xantana obtidas nos Ensaios 3, 4, 6 e 7 em escala 0,2 μm , 50 nm, 100 nm e 0,2 μm , respectivamente. 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção de goma xantana a partir de resíduos industriais.	32
Tabela 2: Viscosidade das gomas produzidas utilizando diferentes resíduos e diferentes cepas de <i>Xanthomonas campestris</i> .	46
Tabela 3: Cepas de <i>Xanthomonas</i> utilizadas na produção de goma xantana.	60
Tabela 4: Planejamento fatorial para avaliar a influência de variáveis independentes (aeração e agitação) sobre as respostas/variáveis dependentes (produção e viscosidades das gomas), com a cepa X. campestris 254 e 4% bagaço de cana.	61
Tabela 5: Matriz do planejamento experimental composta pelas variáveis: glicerol (X1) e goma xantana (X2) e seus respectivos níveis em valores reais e codificados, considerando o valor de amido fixo de 4%.	64
Tabela 6: Composição química média do bagaço de cana-de-açúcar.	71
Tabela 7: Viscosidade aparente de soluções aquosas de goma xantana obtida por fermentação de diferentes cepas de <i>Xanthomonas</i> com sacarose e bagaço de cana de açúcar.	75
Tabela 8: Tempo de retenção (Tr), massas moleculares médias (MM), limites inferiores de massas moleculares (LIMM) e limites superiores de massas moleculares (LSMM) de gomas xantana produzidas a partir da fonte de carbono convencional (sacarose) e alternativa (bagaço de cana).	80
Tabela 9: Eventos térmicos e porcentagens de perda de massa (Δm) referentes às gomas obtidas com as diferentes linhagens com a sacarose, bagaço de cana e a goma xantana padrão (Sigma).	83
Tabela 10: Índice de cristalinidade (Ic) do bagaço de cana, da celulose, goma xantana Sigma, gomas xantana obtida com as diferentes fontes de carbono (bagaço de cana e sacarose) e <i>Xanthomonas</i> 254.	89
Tabela 11: Parâmetros reológicos (n – índice de fluxo e K – índice de consistência) mostrando a pseudoplasticidade de goma xantana (0,5% m/v, 25 s ⁻¹ , 25 a 85°C) por <i>Xanthomonas</i> 254 e bagaço como substrato.	93
Tabela 12: Massas Moleculares das gomas xantana produzidas por <i>Xanthomonas</i> 254 com meio contendo bagaço em diferentes concentrações.	94
Tabela 13: Eventos térmicos e porcentagens de perda de massa (Δm) referentes às gomas obtidas com as diferentes concentrações de bagaço de cana.	97
Tabela 14: Matriz do planejamento fatorial (valores codificados e reais) com as respostas produção de xantana e viscosidade aparente após 72 h de fermentação com a X. campestris cepa 254 e 4% de bagaço de cana em biorreator de 1,5 L.	99
Tabela 15: Parâmetros reológicos mostrando a pseudoplasticidade da xantana sintetizada pela <i>Xanthomonas</i> cepa 254 com bagaço de cana e diferentes condições de agitação e aeração em biorreator (ensaios selecionados).	102
Tabela 16: Estimativa de efeitos das variáveis independentes agitação e aeração na resposta produção de goma xantana.	104

Tabela 17: Análise de variância para avaliação estatística do modelo de produção de goma xantana obtidas pela fermentação de bagaço de cana por <i>Xanthomonas</i> 254 em bioretator de 1,5 L.	105
Tabela 18: Estimativa de efeitos das variáveis independentes agitação e aeração na resposta viscosidade de goma xantana.	105
Tabela 19: Análise de variância para avaliação estatística do modelo de viscosidade de goma xantana obtidas pela fermentação de bagaço de cana por <i>Xanthomonas</i> 254 em bioretator de 1,5 L.	106
Tabela 20: Tempos de retenção (Tr), massas moleculares ponderadas (MM), limites inferiores (LIMM) e superior de massas moleculares, das separações GPC-CLAE-IR de soluções de nanowhiskers de bagaço de cana (NWBC), celulose microcristalina (CMC), e das gomas xantanas obtidas nos Ensaios E3, E4, E6 e E7.	108
Tabela 21: Equação da reta e R ² obtidos para as diferentes curvas de calibração dos padrões de açúcares e ácidos urônicos separados por CLAE-IR.	110
Tabela 22: Concentração dos açúcares e ácidos urônicos das gomas sintetizadas com a cepa 254 e bagaço de cana nos ensaios E3, E4, E6 e E7.	112
Tabela 23: Evento térmico, intervalos de temperatura e porcentagens de perda de massa (Δm) referentes às gomas dos quatro Ensaios do planejamento fatorial em biorreator de 1,5 L.	114
Tabela 24: Evento térmico e intervalos de referentes às gomas dos quatro Ensaios do planejamento fatorial em biorreator de 1,5 L.	116
Tabela 25: Índice de cristalinidade (Ic) das gomas xantana Sigma e as gomas obtidas nos Ensaios E3, E4, E6 e E7 com bagaço de cana e a linhagem de <i>Xanthomonas</i> 254.	118
Tabela 26: Caracterização de filmes flexíveis de amido de mandioca produzidos com goma xantana obtida com bagaço de cana (A), goma xantana obtida com sacarose (B), por bioprocessamento com <i>Xanthomonas</i> 254, e sem a presença de goma xantana (C).	120
Tabela 27: Atividade de água (Aa), Umidade (%) e propriedades mecânicas das diferentes formulações de filmes biodegradáveis de amido de mandioca, goma xantana microfibrilada e glicerol.	122
Tabela 28: Estimativa de efeitos de X1 e X2 na porcentagem de umidade e atividade de água.	124
Tabela 29: Análise de variância para avaliação estatística do modelo para porcentagem de umidade dos filmes flexíveis.	124
Tabela 30: Análise de variância para avaliação estatística do modelo para atividade de água dos filmes flexíveis.	125

LISTA DE SIGLAS

GX - Goma Xantana

BC - Bagaço de Cana

TGAA – Análise Termogravimétrica

DSC – Calorimetria diferencial de varredura

FTIR – Espectroscopia da região do infra-vermelho

DRX – Difração de Raio-X

SAC – Sacarose

Capítulo 1

1. Introdução

Os biopolímeros microbianos possuem uma grande fatia do mercado biotecnológico, sendo os principais a goma xantana e a goma dextrana, as quais podem ser produzidas por diferentes microrganismos.

A goma xantana (GX) é um heteropolissacarídeo obtido pela fermentação de *Xanthomonas*, e é amplamente usado como espessante, dispersante e emulsificante (XIE *et al.*, 2014; KENNEDY & BRADSHAW, 1984). É produzida a partir de algumas espécies de bactérias fitopatógenas do gênero *Xanthomonas sp.* (KOGAN *et al.*, 2006). Possuem características de elevado interesse industrial como pseudoplasticidade, alta viscosidade em baixas concentrações e solubilidade que são vistas como grande interesse na indústria alimentar, farmacêutica ou mesmo na recuperação avançada de petróleo (GARCÍA-OCHOA, 2000).

As propriedades da goma xantana são determinadas por sua composição química, arranjos e ligações moleculares (MEYER *et al.*, 1993; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

As fontes de carbono mais comumente empregadas na síntese da goma xantana são os carboidratos como amido, hidrolisado de amido, xarope de milho, glicose e sacarose. 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).

O processo fermentativo utilizado para a produção de goma xantana é influenciado principalmente pelas condições de cultivo, meios de fermentação e linhagens, que interferem no rendimento e estrutura da goma produzida (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

As condições operacionais influenciam o rendimento bem como a qualidade da goma xantana e as características do caldo (BORGES *et al.*, 2009; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas têm sido muito incentivada uma crescente valorização de resíduos através do aproveitamento em diversas atividades podendo contribuir positivamente para a minimização da poluição ambiental, bem como permitir a valorização econômica desses resíduos que, até então, eram considerados simplesmente

como descartáveis. Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado (DAMASCENO *et al.*, 2003).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.) é uma planta de suma importância para a economia brasileira, pois é grande geradora de empregos e de energia via industrialização desta em açúcar e álcool. Como consequências do processamento industrial da cana são produzidos resíduos, entre eles o bagaço, responsável por 25 a 30% em peso da cana moída, ou seja, um resíduo da ordem de 74 a 88 milhões de toneladas de bagaço. O bagaço de cana contém de 25 a 40% de celulose e o restante de hemicelulose (20 a 35%) e lignina (15 a 35%) (COWLING & KIRK, 1976), podendo ser utilizado em processos fermentativos como fonte de carbono.

A goma xantana sintetizada a partir desses resíduos precisa ser caracterizada para avaliar seu potencial uso na área industrial. Dentre as propriedades avaliadas tem-se a composição química e principalmente viscosidade aparente e viscoelasticidade.

A preocupação com o ecologicamente correto tem resultado em um renovado interesse pelo natural, materiais recicláveis e materiais baseados em fontes renováveis, e conseqüentemente questões tais como materiais seguros, de baixo impacto ambiental e de fácil eliminação para o meio ambiente começam a ser importantes. Por essas razões, componentes materiais tais como fibras naturais e polímeros biodegradáveis são considerados uma alternativa “interessante” para o desenvolvimento de novos compósitos biodegradáveis (biocompósitos) uma vez que são ambientalmente seguros (AVÉROUS & LE DIGABEL, 2006).

Filmes flexíveis à base de amido de mandioca proposto neste estudo vêm sendo desenvolvidos com sucesso e exibem características apropriadas, entretanto, os filmes são quebradiços com propriedades mecânicas inadequadas. Por outro lado, sabe-se que componentes como a glicerina e a goma xantana são utilizados como plastificantes com outras matrizes poliméricas de embalagens biodegradáveis (SUN *et al.*, 1999; CHILLO *et al.*, 2008).

Nesse contexto, a busca de rotas alternativas para viabilizar processos biotecnológicos torna-se cada vez mais recorrente. Por isso, este trabalho visa utilizar o bagaço de cana-de-açúcar como fonte alternativa para a produção de xantana, posto que, a composição química deste resíduo apresenta teores de sacarose e sais minerais satisfatórios, além de glicose oriunda da celulose, o que lhe confere valor nutritivo e excelente meio para fermentação. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi selecionar

linhagens de bactérias para bioconverter o bagaço-de-cana em goma xantana microfibrilada em agitador rotatório (*Shaker*) e selecionar as variáveis de maior importância na produção em biorreator através de um planejamento fatorial, assim como, fazer a caracterização térmica, reológica e de composição química e massa molecular, das gomas obtidas e aplica-las em filmes flexíveis biodegradáveis.

Capítulo 2

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Produzir simultaneamente goma xantana e microfibrilas de celulose a partir do cultivo de bagaço de cana por *Xanthomonas*, assim como avaliar o efeito da aplicação desta goma microfibrilada como aditivo de reforço mecânico de filmes de amido.

2.2. Objetivos específicos:

- Determinar a composição centesimal do bagaço de cana-de-açúcar utilizado como substrato alternativo para obtenção de goma xantana;
- Selecionar linhagens de *Xanthomonas* nativas que produzem goma xantana a partir do bagaço de cana em *Shaker* com propriedades reológicas de interesse para as mais variadas aplicações;
- Avaliar o efeito da variação da concentração de bagaço de cana-de-açúcar na produção e viscosidade das gomas xantana resultantes;
- Avaliar a influência dos efeitos da aeração e velocidade de agitação nas propriedades das gomas xantanas produzidas por *Xanthomonas* com bagaço de cana em biorreator de 1,5 L em função da produção, viscosidade aparente das soluções aquosa, composição química, bem como na massa molecular e estabilidade térmica dos biopolímeros obtidos;
- Preparar e caracterizar filmes flexíveis de amido de mandioca com goma xantana obtida pela fermentação de bagaço de cana e *Xanthomonas*, como aditivo;
- Identificar o efeito da adição de goma xantana microfibrilada nas propriedades de filmes flexíveis de amido e glicerol.

Este trabalho está estruturado em 6 capítulos, sendo o **Capítulo 1** a Introdução. No **Capítulo 2** estão os objetivos do trabalho. O **Capítulo 3** é o capítulo da Revisão Bibliográfica, onde são reportados os pressupostos teóricos que orientam todo o desenvolvimento experimental do trabalho. No **Capítulo 4** estão descritas as metodologias empregadas para a seleção de linhagens e o delineamento estatístico para avaliar a influência da agitação e aeração na produção de goma xantana, bem como a

aplicação do biopolímero em filmes flexíveis de amido de mandioca. No **Capítulo 4** estão os resultados e discussão. No **Capítulo 5** são apresentadas as Conclusões.

Capítulo 3

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Goma Xantana

A goma xantana é um exopolissacarídeo natural e de grande importância para a indústria de polímeros, sendo descoberta em 1950 pelo Northern Regional Research Laboratories (NRRL) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. O Polímero B-1459, ou goma xantana, produzido pelas bactérias *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 foi muito estudado por causa das suas propriedades como espessante e estabilizante (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Xanthomonas é um gênero da família das Pseudomonaceae. Todos os organismos deste gênero são patogênicos para as plantas. As *Xanthomonas* (Figura 1) infectam uma grande gama de plantas incluindo algumas de interesse da agricultura, como por exemplo: repolho, alface, feijão, etc (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Ao atacar citros, verduras e cana-de-açúcar devido à alta produção de exopolissacarídeo, impede o fluxo de nutrientes no caule da planta, causando doenças.



Figura 1: Placa contendo colônias da bactéria *Xanthomonas*, com a produção do muco (TIMMER et al. 2000).

Uma das mais sérias bacterioses de cultivos vegetais é a Podridão Negra (Figura 2), causada pelo *X. campestris* pv. *campestris*. Essa doença pode ser observada em qualquer estágio de desenvolvimento da planta e caracteriza-se por veias nas folhas que se tornam amarelas e negras. É de desenvolvimento rápido, propagando-se em poucas

semanas, levando a planta à morte e, conseqüentemente, a grandes perdas econômicas (OLIVEIRA et al., 2000; AZEVEDO et al., 2002).

Pelo fato de possuir propriedades reológicas únicas, a goma xantana vem sendo amplamente utilizada como agente suspensivo, espessante, emulsionante e estabilizante (NITSCHKE et al., 2001). É completamente solúvel em água fria ou quente, apresenta elevada viscosidade em baixas concentrações e apresenta excelente estabilidade ao calor e pH. A viscosidade de suas soluções apresenta pouca variação entre 0 e 100°C e pH de 1 a 13 (NACHTIGALL et al., 2004).



Figura 2: Podridão negra causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em repolho. Fonte: Google/imagens/*Xanthomonas campestris* (07/12/2012).

Muitos estudos têm sido conduzidos com o propósito de selecionar novas linhagens altamente produtoras, meios de cultivo, fontes de carbono e processos de extração e purificação de xantana, buscando redução dos custos e máximo rendimento da goma de alta qualidade, devido à dependência clara entre linhagens usadas, rendimento e propriedades da goma xantana. Assim, a seleção da linhagem precisa ser o primeiro passo para um processo específico de produção (LÓPEZ *et al.*, 2001; HASSLER & DOHERTY, 1990).

Grande parte da literatura referente à produção de xantana está baseada em cepas obtidas de coleções de cultura, principalmente *X. campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 (LÓPEZ et al., 2004; GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Porém, o isolamento de microrganismos a partir de recursos naturais é uma importante ferramenta na busca de cepas que apresentem alto rendimento no processo de bioconversão e obtenção de

xantana com qualidade reológica (ANTUNES et al., 2000; GUPTE e KAMAT, 1997). Portanto, um país com o potencial agrícola como o Brasil representa ainda uma fonte inexplorada destes microrganismos. Assim, a busca de cepas e novos substratos com alto rendimento de goma xantana que apresente alta viscosidade tem sido alvo de pesquisas.

A seleção de microrganismos produtores de polímeros em quantidade e economicamente viáveis é um desafio, envolvendo grupos de pesquisa e a indústria, principalmente em países desenvolvidos (ASHTAPUTRE; SHAH, 1995). Aqui, se insere *Xanthomonas sp.* cujos estudos visam melhorar cepas, meios de cultura e processos de extração e purificação da goma xantana.

A maior parte da literatura referente à produção de xantana cita o uso de glicose e sacarose como fontes de carbono preferenciais, entretanto algumas fontes alternativas têm sido sugeridas, visando principalmente o aproveitamento de resíduos industriais e a diminuição nos custos de produção (SENAI, 2005 a). A indústria de petróleo não usa maiores quantidades de goma xantana devido ao alto custo da mesma, e acaba utilizando outros polissacarídeos derivados de plantas ou polímeros sintéticos com um custo menor e com propriedades não tão específicas, (YOO & HARCUM, 1999).

O Brasil segue a tendência mundial de incremento no consumo de xantana, mesmo sendo ainda totalmente importada, demonstrando a relevância de se investir em uma produção nacional competitiva. Este potencial do país para a fabricação deste polímero em escala industrial é devido a grande disponibilidade de matérias-primas básicas para a produção: sacarose como fonte de carbono no meio fermentativo e etanol para a recuperação do polímero (MOREIRA, 2002).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar, com os menores custos de produção, e também o maior exportador do produto. Portanto o custo das matérias-primas no Brasil é mais baixo, enquanto que em outros países representa um fator crítico sob o aspecto comercial, o que coloca o Brasil numa posição favorável e competitiva frente a países que dominam esta tecnologia. Além disso, considerando que as bactérias de *Xanthomonas* possuem enzimas que degradam polissacarídeos, vem aumentando o interesse na utilização de substratos fermentativos alternativos como, por exemplo, resíduos industriais que podem ser utilizados para a produção de polissacarídeos, diminuindo os custos de produção e minimizando problemas ambientais causados pelo descarte (ROTTAVA, 2005; DRUZIAN & PAGLIARINI, 2007; NERY et al., 2008; BRANDÃO et al., 2008).

3.2. Características, composição e estrutura da goma xantana

A goma xantana é um heteropolissacarídeo obtido naturalmente pela fermentação de carboidratos pela bactéria *Xanthomonas*, que sintetiza a goma para evitar sua desidratação. A massa molecular desse polissacarídeo varia de 13.000.000 a 50.000.000 g/mol, e é constituído por unidades básicas de D-glucopiranosose, D-manopiranosose e ácido-D-glucurônico na proporção de 2,8: 3,0: 2,0. A goma xantana é solúvel em água fria ou aquecida, formando solução viscosa mesmo em baixas concentrações, resistente ao aquecimento e variações de pH, não degrada rapidamente com cisalhamento e não é sensível ao aumento da salinidade. É um aditivo bastante utilizado na indústria farmacêutica, cosmética, agroquímica e alimentícia como estabilizante, espessante e emulsificante. Devido ao seu comportamento pseudoplástico a goma é considerada produto estratégico na indústria de petróleo, por ser utilizada na lubrificação das brocas de perfuração e na recuperação secundária de poços de petróleo. Atualmente, o Brasil importa 100% da goma xantana consumida internamente.

A sua cadeia linear consiste em unidades de β – D – glucose ligadas nas posições 1 e 4. As ramificações contém uma unidade de ácido d-glucurônico entre duas unidades de D-manose ligadas na posição O-3 de uma unidade de glucose da cadeia principal (Figura 3). As ramificações trissacarídicas aparecem aderidas à cadeia principal do polímero, e dela resulta a estrutura rígida.

Esta estrutura pode existir na forma geométrica de simples, dupla ou tripla hélice. Aproximadamente metade das unidades de manoses contém ácido pirúvico residual e a outra metade um grupo acetil. A presença do ácido glucurônico, do acetil e do ácido pirúvico produz um tipo de polissacarídeo aniônico. No entanto a composição principalmente dos substratos acetil e piruvil assim como a massa molecular podem variar dependendo do tipo de cepa, de mutações genéticas, das condições de cultivo como fonte de carbono, disponibilidade de oxigênio, etc (NACHTIGALL et al., 2004; SANDFORD & BAIRD, 1983; MORRIS, 1976; MILAS & RINAUDO, 1979), resultando em variação nas propriedades reológicas e conseqüentemente na forma de utilização nos diferentes setores industriais.

As cadeias trissacarídicas laterais das ramificações conferem solubilidade em meio aquoso e, juntamente com os ácidos glucurônico, pirúvico e acético que além de conferir ionicidade aumentando a solubilidade estão relacionadas à conformação molecular (MISAKI, 1993).

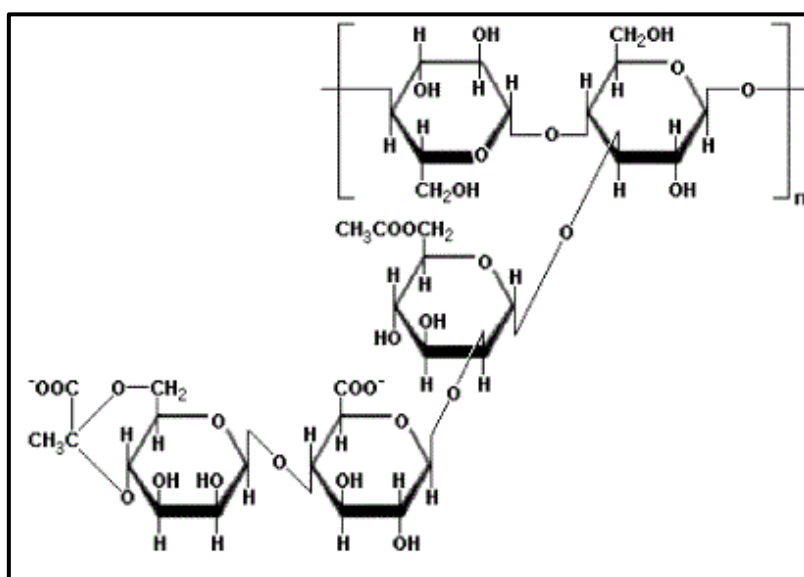


Figura 3: Estrutura unitária (monômero) do polissacarídeo goma xantana.

A estrutura secundária da xantana depende das condições sob as quais a molécula é caracterizada. A conformação ordenada pode ser nativa ou renaturada; não há consenso sobre a existência de relação entre a atividade da conformação e o tipo de estrutura verificada. A forma nativa está presente em temperaturas abaixo do ponto de transição conformacional da molécula, que depende da força iônica do meio em que a xantana produzida está dissolvida. A transição conformacional ordem-desordem é dirigida pela ocorrência de temperaturas, acima do ponto de transição e/ou redução da força iônica. Tanto a manutenção da conformação nativa (ordenada) quanto à renaturada (reordenada) depende dos mesmos fatores (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002).

A goma xantana apresenta a unidade D-manose ligada na cadeia principal pode conter um grupo acetil na posição O-6. A fórmula $[C_{35}H_{49}O_{29}]_n$ geralmente é aceita como a da molécula de xantana (SUTHERLAND, 1990; SUTHERLAND & TAIT, 1992; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; PORTILHO, 2002).

A estrutura química de cada biopolímero, bem como os grupos substituintes que ele possui determina suas características reológicas e, portanto, suas potenciais aplicações (PACE, 1991).

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

Devido a sua estrutura única, as soluções aquosas de xantana exibem propriedades reológicas bastante distintas e incomuns, como alta viscosidade e solubilidade, estabilidade frente a variações de pH e temperatura, compatibilidade com muitos sais metálicos e com outros polissacarídeos (KENNEDY & BRADSHAW, 1984; KALOGIANNIS et al., 2003).

O polissacarídeo xantana produzido por diferentes espécies de *Xanthomonas* contém normalmente glucose, manose e ácido glucurônico, e a determinação dos monossacarídeos e ácidos derivados componentes das xantanas pode ser realizada por cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) (MORENO et al., 1998).

A goma xantana é altamente estável em ampla faixa de pH, sendo afetada apenas com valores de pH >11 e < 2.5. Essa estabilidade depende da concentração: quanto maior a concentração, maior a estabilidade da solução (PETTITT, 1982).

A goma xantana é também estável em ampla faixa de temperatura (10°C a 90°C) e a viscosidade é pouco afetada na presença de sais. Após a esterilização (120°C/30 min) de produtos alimentícios contendo diferentes gomas, apenas 10% da viscosidade é perdida em produtos que contêm a goma xantana, redução inferior à observada nos produtos que contêm outros hidrocolóides, como a goma guar, alginato e carboximetilcelulose (URLACHER & DALBE, 1992).

3.3. Produção de goma xantana

O processo de obtenção da goma xantana consiste nas seguintes etapas: pré-inóculo, inóculo, fermentação, pasteurização, remoção das células, precipitação, separação e secagem da goma. O crescimento dos microrganismos e a produção da goma xantana são influenciados por fatores tais como o tipo de reator, o modo de operação (batelada ou contínuo), composição do meio, e as condições da cultura (temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido) (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Muitas tentativas foram relatadas para selecionar variáveis em fermentações de goma xantana, ou seja, a composição de nutrientes e técnicas de alimentação, temperatura, pH, agitação e adição de antiespumante. Todas essas pesquisas mostram algumas melhorias na área estudada (ROSALAM & ENGLAND, 2006). Segundo GARCÍA-OCHOA et al. (2000), o meio de cultivo e as condições operacionais influenciam o rendimento e estrutura da goma xantana produzida.

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

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

A diversidade de substratos viáveis representa o maior benefício industrial para a produção da goma xantana. Entretanto, a qualidade reológica do biopolímero varia sensivelmente em função da composição do meio utilizado (SUTHERLAND et al., 1983).

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

Processos fermentativos com elevados níveis de agitação favorecem o aumento da produção de goma xantana, bem como o crescimento celular. Em baixas velocidades ocorrem limitações na transferência de oxigênio resultando em baixas produções e polímeros com baixa massa molar. O efeito benéfico do aumento da agitação pode estar relacionado ao aumento da transferência de nutrientes e oxigênio do meio para os microrganismos, o que favorece a formação de goma xantana (PAPAGIANNI et al., 2001). Peters et al. (1989) utilizaram baixas velocidades de agitação para fermentação em batelada e obtiveram uma produção de goma xantana significativamente menor do que as obtidas em altas velocidades. Papagianni et al. (2001) observaram que o aumento

da agitação resultou em maiores produções de xantana e biomassa, com acréscimo de 100% ao aumentar a agitação de 100 para 600 rpm.

Casas, Santos e García-Ochoa (2000) em seus trabalhos, usaram altas velocidades de agitação (800 rpm) e observaram pouco crescimento celular e baixa produção de xantana, provavelmente causados por danos celular devido ao estresse hidrodinâmico. Os testes em baixas velocidades (100 rpm) também apresentaram baixa produção e crescimento celular, associadas à limitação na transferência de oxigênio. Em se tratando da taxa de oxigenação a faixa varia em de 1,5 a 3,5 vvm e uma boa aeração para que se obtenha uma boa produção de goma xantana com elevada viscosidade (WOIECHOWSKI, 2001).

Os aspectos mais estudados no cultivo de *Xanthomonas* são os que influenciam na otimização da produção, devido à complexidade dos parâmetros que interferem na qualidade reológica do biopolímero produzido.

3.3.1. Inóculo

Em função de a goma xantana constituir uma espécie de cápsula bacteriana, sua produção está associada ao crescimento celular. Durante o período de inoculação, ocorre um aumento da concentração celular, mas diminui a produção de goma xantana, porque a goma ao redor da célula impede o transporte de nutrientes e estender a fase lag de crescimento (CADMUS et al., 1978; DE VUYST et al., 1987; PONS et al., 1989; PONS et al., 1990).

No preparo do inóculo para a produção de goma xantana, a transferência de *X. campestris* visa aumentar a biomassa, limitando, a produção do biopolímero, que ao ser liberado no meio envolve as células, impede o transporte de nutrientes durante a fase lag de crescimento, provocando a morte celular (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Por isto, a incubação do inóculo é limitada há poucas horas para evitar uma significativa produção de goma.

Os microrganismos são transferidos de um meio de cultura sólido complexo (normalmente meio Yeast Malt-YM ágar) para um volume pequeno (5 a 7 mL) de um meio de cultura líquido complexo (normalmente meio YM). A cultura é transferida para 40 - 100 mL de meio contendo sais inorgânicos; fase nas quais células vão se adaptar a uma nova condição que deverão encontrar na fase de produção. O volume de inóculo para a produção de goma xantana no fermentador deve ser 5% a 10% do volume total de caldo fermentado (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Segundo Gupte e Kamat (1997), o

volume ideal de inóculo para a produção de goma xantana em fermentador deve ser de 10% do volume total de caldo fermentado.

O crescimento de *Xanthomonas* emprega meios de cultura complexos; o mais usual é o YM (glicose, peptona, extrato de levedura, extrato de malte) (GARCÍA-OCHOA et al., 2000) a 28°C sob agitação. Há dados variáveis para a produção do inóculo: 200 rpm/36h (KALOGIANNIS et al. 2003), 120 rpm/40 h (ROTTAVA, 2005) e 180 rpm/48 h (NERY et al., 2008).

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

3.3.2. Meio fermentativo para produção de goma xantana

Para produzir goma xantana, a bactéria *Xanthomonas* precisa de vários nutrientes, macronutrientes, tais como carbono e nitrogênio e micronutrientes (como potássio, ferro, e cálcio). A concentração da fonte de carbono afeta o rendimento de goma xantana, sendo a glicose e a sacarose as fontes de carbono mais frequentemente utilizadas.

O efeito da concentração de glicose na produção de goma xantana por *X. campestris* ATCC 13951 foi estudada por Funahashi et al. (1987). Segundo o estudo concentrações de glicose entre 30g - 40 g/kg de meio consiste na melhor faixa de concentrações para a produção de goma xantana. A possibilidade da adição intermitente de glicose de forma a manter seu teor no meio entre 30-40 g/kg, preveniu a inibição do crescimento celular e da produção de goma. Através dessa alimentação estratégica de glicose, a concentração de goma xantana atingiu 43 g/kg após 96 horas de fermentação. A concentração ótima inicial de glicose foi considerada pelos autores como a de 40 g glicose/kg de meio.

O nitrogênio é um nutriente essencial, como componente orgânico ou como molécula inorgânica. A razão C/N normalmente utilizada para a produção é menor que aquela usada durante o crescimento (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Geralmente, baixas concentrações de ambos são úteis para a produção da goma xantana. Resultados similares foram obtidos por Souw & Demain (1979). Segundo autores quando o carbono e o fósforo são nutrientes limitantes, a produção de goma xantana é melhorada.

Foi comprovado serem os açúcares (sacarose ou glicose) as melhores fontes de carbono, e o glutamato em uma concentração de 15 mM a melhor fonte de nitrogênio.

A concentração da fonte de carbono afeta a eficiência da conversão em polissacarídeos. É relatado na literatura que concentrações de glicose entre 1 – 5% dão o melhor rendimento, enquanto que em maiores concentrações de glicose, decresce o rendimento do produto (PAPAGIANNI et al., 2001).

Souw & Demain (1979) relatam que a melhor produção de goma xantana ocorreu com 1% de sacarose, 0,5% de frutose ou 0,5% de xilose com 2% de glicose no meio, sendo que a adição em excesso da sacarose não teve nenhum efeito prejudicial no crescimento e produção da goma xantana, mas que a adição de frutose ou xilose foi inibitória na produção e crescimento da bactéria. Sacarose mostrou uma maior produção de goma xantana, em relação aos outros açúcares estudados, sendo ligeiramente melhor que a glicose.

Estudos preliminares têm indicado que fermentações com *X. campestris* em escala industrial utilizando o melaço ou soro de leite bovino como caldo fermentativo podem resultar em goma xantana com massa molecular média, que pode ser usada para certas aplicações (KIOSSEOGLOU et al., 2003).

Vendruscolo et al. (2002) utilizaram resíduo industrial fibroso da proteína de soja como fonte de carbono na produção de goma xantana. Em fermentações com *X. campestris pv. campestris* NRR-B-1459, a fibra influenciou positivamente, elevando a produção do polímero, porém influenciou negativamente sobre a qualidade da goma obtida.

3.4. Produção de goma xantana com diferentes resíduos

Numerosos trabalhos citados na literatura já estabeleceram que a bactéria *Xanthomonas campestris* é capaz de fermentar um espectro largo de fontes de carbono, conforme Tabela 1.

A inclusão destes subprodutos industriais como substratos para síntese de biopolímeros reduz a quantidade de resíduos descartados no meio ambiente e minimiza custos no tratamento de efluentes (MESOMO, 2007).

Tabela 1: Produção de goma xantana a partir de resíduos industriais.

Bactéria utilizada	Resíduo	Goma Xantana (g/L)	Referência
<i>X. campestris</i> NRRL B 1459	Melaço de açúcar de beterraba	4,8	YOO et al (1999)
<i>X. campestris</i> C7L	Soro de leite	28	NITSCHKE et al (2001)
<i>X. campestris</i>	Casca de café	5,8	WOICIECHOWSKI (2001)
<i>X. campestris</i> ATTCC 1395	Melaço de açúcar de beterraba	53,0	KALOGIANNIS et al (2003)
<i>X. campestris</i> 1866	Casca de coco	5,3	NERY et al (2008)
<i>X. c. manihotis</i> 1182	Casca de cacau	5,4	DINIZ et al (2012)
<i>X. c. pv. mangiferaeindicae</i> 2103	Soro de mandioca	13,8	BRANDÃO, L.V. (2008)
<i>X. c. pv. mangiferaeindicae</i> 2103	Levedura de cerveja	9,4	GOMES, G. V. P. (2008)
<i>X. c. pv. campestris</i> 629	Suco de Sisal	2,5	ASSIS et al (2013)
<i>X. c. manihotis</i> 1182	Glicerina Residual do Biodiesel	0,65	ASSIS et al (2014)

Além de permitir uma diversificação na produção do setor industrial e o aumento da receita, representado uma economia viável através da obtenção de novos produtos provenientes de “resíduos” (DRUZIAN & PAGLIARINI, 2007). Na literatura não existe citação de produção de goma xantana por cultivo submerso a partir da fermentação de bagaço de cana-de-açúcar.

3.4.1. Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.) é uma planta de suma importância para a economia brasileira, e o setor sucroalcooleiro é grande gerador de empregos e de energia. Com o processamento industrial da cana-de-açúcar é produzidos inúmeros resíduos, entre eles o bagaço, responsável por 25 a 30% do peso da cana moída (NUSSIO, 1993).

A produtividade média de cana-de-açúcar no Brasil é de 85 toneladas por hectare. Para cada tonelada de cana processada são gerados cerca de 140 kg de palha e

140 kg de bagaço em base seca, ou seja, 12 toneladas de palha e 12 toneladas de bagaço por hectare (SANTOS et al, 2014; SANTOS et al, 2012).

O bagaço de cana-de-açúcar é um dos resíduos mais abundantes no Brasil devido ao grande número de indústrias sucroalcooleiras. Esta biomassa contém elevado teor de carboidratos, podendo ser utilizada na produção de diversos compostos de interesse econômico.

Existem diversas utilizações para o bagaço, que vai desde a produção de energia térmica até a indústria de papel e celulose, passando pela alimentação animal. Entretanto, o bagaço apresenta alguns inconvenientes, representado principalmente pelo seu alto teor de material lignocelulósico, cuja viabilidade de utilização requer o desenvolvimento de métodos de tratamento que promovam o rompimento da estrutura de sua fração fibrosa, para torná-lo mais digestível (BURGI, 1985). Os materiais usados em compósitos lignocelulósicos consistem em três principais frações orgânica de celulose (35-50%), hemicelulose (20-35%) e lignina (12-20 %). Eles também contêm pequenas quantidades de minerais (cinzas) e dentre vários outros compostos (VASCONCELOS et al, 2013).

O incentivo para o reaproveitamento de resíduos é objetivo de um modelo de desenvolvimento sustentável, por este motivo, é estimulada a diminuição da quantidade de resíduos gerados, a valorização destes e a minimização dos riscos provenientes do seu descarte. Neste contexto, o estudo de como viabilizar a redução deles na fonte geradora tornou-se uma alternativa imprescindível (NUNESMAIA, 2002).

Embora o bagaço possa ser utilizado para geração de energia ou como suplemento em ração animal, ainda há um grande excedente que pode ser utilizado para produção de diversos bens à sociedade. A biotecnologia tem sido bastante explorada nos últimos anos para a obtenção de inúmeros produtos de interesse econômico e social. Os processos biotecnológicos têm se mostrado promissores e com inúmeras vantagens em relação aos processos convencionais. Segundo Du Toit et al (1984), o aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar como fonte de substratos para a utilização em processos biotecnológicos é uma alternativa atrativa e promissora, considerando-se o elevado teor de carboidratos presentes nesta biomassa.

3.5. Fatores que influenciam na produção de goma xantana

Jana & Ghosh (1997) verificaram que a biossíntese de goma xantana por *X. campestris*, sob condições limitadas de oxigênio; a adição acima de 2,6 g de ácido

cítrico por litro melhora a viabilidade celular, assim como aumenta o rendimento da goma xantana. Porém, quando não há limitação de oxigênio, a adição de ácido cítrico não melhora a produção de goma xantana.

Segundo Gupte & Kamat (1997) com *X. campestris* ICa-125, as maiores concentrações de exopolissacarídeo extracelular verificaram-se na temperatura de 32°C, porém nesse estudo foram testadas apenas as temperaturas de 25°C, 32°C, 35°C e 38°C, obtendo-se 4,2, 9,0, 8,7 e 3,6 g.L⁻¹, respectivamente.

Muitos autores concordam que o pH neutro é o melhor para o crescimento do *X. campestris*. Durante a produção da goma xantana, o pH decresce de neutro para valores próximos a 5,0 por causa da formação de grupos ácidos presentes na goma xantana. Alguns autores sugerem que não seja necessário fazer o controle do pH durante o processo, mas outros recomendam manter o pH neutro utilizando para isso KOH, NaOH e NH₄OH. O estudo do efeito do pH mostra que o controle do pH acentua o crescimento das células, porém não influencia a produção da goma xantana. Quando o pH é controlado, a produção da goma cessa uma vez que a fase de crescimento estacionária seja atingida, e este efeito independe do álcali usado para controlar o pH. Quando o pH não é controlado, a produção da goma continua durante a fase estacionária de crescimento (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Para o crescimento do *Xanthomonas campestris*, os melhores intervalos de pH e temperatura são: entre 6,0 a 7,5 e de 25°C a 27°C respectivamente e para a produção da goma xantana e qualidade do polímero os melhores intervalos de pH e temperatura são: entre 7,0 – 8,0 e de 25°C - 30°C (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Esta diferença de valores mais adequados de pH e temperatura para o crescimento celular e para a produção da goma xantana pode ser uma informação útil a ser incluída em uma estratégia de fermentação em duas etapas e na elaboração de novos ambientes microbianos. Este ponto é particularmente importante no processo de otimização quando é desejável maximizar um dos fatores, mas não o outro.

Limitação de oxigênio foi observada no estudo de Peters et al. (1989), quando utilizaram baixas velocidades de agitação para uma fermentação de goma xantana em batelada. Isto resultou em uma taxa de produção específica de goma xantana significativamente menor do que ao obtido em altas velocidades.

Casas et al. (2000) observaram dois efeitos com o aumento da velocidade de agitação: aumento na taxa de transferência de massa de oxigênio e também um dano nas células. Em velocidades mais altas (800 rpm/min) o crescimento celular e a produção de

goma xantana são mais baixos, provavelmente devido ao dano celular por “stress” hidrodinâmico; e em velocidades muito baixas (100 rpm/min) também se observou mais baixo crescimento de biomassa e produção de goma xantana, devido à limitação na transferência de oxigênio. Para esse estudo foi utilizado um biorreator com volume de trabalho de 1,5 L, e ambos, o crescimento de biomassa e produção de goma xantana, alcançou um máximo quando a velocidade de agitação foi fixada em 500 rpm/min. Em velocidades de agitação mais baixas ocorre limitação de oxigênio, e em velocidades de agitação mais altas ocorre “stress” hidrodinâmico, resultando em um decréscimo da massa molecular médio, e também em um decréscimo nos parâmetros reológicos.

Papagianni et al. (2001) observaram que o aumento do nível de agitação, resulta em níveis de produção de goma xantana mais altos. Nesse estudo, a produção de goma xantana quase dobrou quando a velocidade de agitação foi aumentada de 100 para 600 rpm, e similar foi o efeito no crescimento celular.

A massa molecular foi pouco influenciada pela velocidade de agitação (100 – 600 rpm); de acordo com os resultados de CLAE, ficaram em redor de 500 kDa (Papagianni et al., 2001). A massa molecular da goma xantana é crítico para a viscosidade intrínseca e para as propriedades espessantes do polímero.

As temperaturas empregadas para a produção de xantana variam de 25-34°C. Shu & Yang (1990) concluíram que a temperatura ótima para a produção de xantana depende do meio de produção utilizado, sendo esta de 28°C para o meio otimizado por García-Ochoa et al., (2000).

A faixa de oxigenação recomendável para produção de xantana é de 1,5-3,5 mM O₂/L/minuto. Uma boa aeração é requerida devido ao aumento da viscosidade durante produção de xantana (LIMA et al., 2001; ROTAVVA, 2005).

3.6. Recuperação da goma xantana

Após a etapa fermentativa de produção da goma xantana, o polímero extracelular é recuperado e purificado. Os métodos usados para a recuperação do biopolímero dependem, sobretudo, das características do microrganismo utilizado, do tipo de polissacarídeo e do grau de pureza desejada (SANDFORD, 1979).

A etapa de recuperação da goma xantana envolve remoção de células microbianas, precipitação do biopolímero, secagem e moagem. O método específico de purificação a ser utilizado também é determinado pelo uso final do polissacarídeo (GALINDO, 1994; MOREIRA et al., 2003; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; MORRIS,

1995; WOICIECHOWSKI, 2001; LIMA et al., 2001; NERY, 2007; DINIZ, 2007; BRANDÃO, 2008).

Após a fermentação, as células podem ser eliminadas fisicamente através de centrifugação. Os polímeros são precipitados preferencialmente com solventes orgânicos solúveis em água como álcool ou acetona (MOREIRA et al., 2003).

García-Ochoa et al. (2000), apresentam um processo de recuperação de xantana que envolve etapas de desativação ou lise das células, através de processos químicos, mecânicos ou térmicos; remoção das células por filtração; recuperação do polímero por precipitação com solventes orgânicos (etanol, isopropanol, misturas de sais e álcool); e separação do precipitado. O precipitado deve ser lavado várias vezes com o solvente que é evaporado posteriormente.

Após a recuperação, a xantana é purificada e seca em estufa a baixas temperaturas (MOREIRA et al., 2003) ou liofilizada (GIAVASIS et al., 2000). Depois, as amostras são submetidas a análises reológicas e à determinação estrutural. A purificação do biopolímero pode ser feita mediante sucessivas diálises contra água deionizada (CHI; ZHAO, 2003), com detergentes catiônicos, por métodos cromatográficos, por agentes químicos ou com enzimas que interagem de forma específica com certos grupos (DRUZIAN, 2000). A secagem do biopolímero pode ser realizada em secadores contínuos ou em batelada, a vácuo ou com circulação forçada de gás inerte.

A recuperação da xantana durante o processo industrial é geralmente uma etapa crítica e dispendiosa. De acordo com Albiter et al. (1994), os investimentos associados com a recuperação destes polímeros, constituem uma parte significativa do total da produção, podendo para xantana grau alimentício e farmacêutico representar até 50% dos custos totais. Nesta etapa da produção os principais objetivos são: a concentração do caldo de fermentação, a precipitação e purificação dos biopolímeros, e a inativação das células e de enzimas indesejáveis (BAIOCCO, 1997).

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

A secagem rápida do biopolímero a altas temperaturas pode resultar em um produto com baixa solubilidade ou com baixa viscosidade em solução. Porém, o

aquecimento controlado da goma xantana pode resultar em um produto com melhor reologia em solução (PACE, 1991).

O polímero depois de seco pode ser moído, e algumas gomas comerciais são diferenciadas por tamanho de partículas. Deve-se levar em conta que, na moagem, o calor gasto não degrade ou altere a cor o produto. O empacotamento usado deve ser impermeável porque a goma xantana é higroscópica e sujeita a degradação hidrolítica (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

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

3.7. Aplicações da goma xantana

A aplicação da goma xantana na indústria de alimentos, farmacêutica e petroquímica está relacionada principalmente à sua capacidade de formar soluções viscosas e géis hidrossolúveis que lhe fornece propriedades reológicas únicas (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; SUTHERLAND & KENNEDY, 1996; MEYER *et al.*, 1993).

A goma xantana tem sido usada em uma extensa variedade de alimentos, por apresentar importantes propriedades, como: espessante de soluções aquosas, agente dispersante, estabilizadora de emulsões e suspensões, estabilizadora da temperatura do meio, propriedades reológicas e pseudoplásticas e compatibilidade com ingredientes alimentícios (KATZBAUER, 1998; WHISTLER & BEMILLER, 1993). Quando utilizada em baixas concentrações, gera estabilidade na estocagem, capacidade de resistência à água e apelo estético (NUSSINOVITCH, 1997; URLACHER & DALBE, 1992). É também usada na agricultura em suspensões, como agente estabilizante para herbicidas, pesticidas, fertilizantes e fungicidas (NUSSINOVITCH, 1997).

A alta viscosidade das soluções e a solubilidade em água do biopolímero têm assegurado importantes aplicações para a xantana na indústria de petróleo, onde é

habitualmente usada em processo de perfurações para recuperação de óleo (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

A goma xantana é um excelente agente suspensor para esmaltes cerâmicos e outras misturas difíceis de manter em suspensão. A sua excelente compatibilidade com componentes de esmaltes cerâmicos, melhora a moagem do material, aumenta a adesão a úmido, controla o tempo de secagem e reduz imperfeições na superfície das peças. Devido a essas propriedades, torna-se o produto apropriado para uso em produtos de limpeza e polidores. Favorece a suspensão de abrasivos e melhora o escoamento e o espalhamento do produto. Em tintas a base de água é utilizada para estabilizar os pigmentos e controlar suas propriedades de escoamento, uniformizando a migração da cor nos fios de tecidos.

Na indústria farmacêutica os biopolímeros são utilizados como sistema matricial para controlar a liberação de fármacos. Eles podem ser associados ou não a outros polímeros dependendo da consistência da matriz em que se almeja no caso dos comprimidos de teofilina a combinação da goma xantana com galactomanana apresentou um perfil de dissolução excelente e uma dinâmica de liberação *in vitro* de aproximadamente 90% do medicamento em 8 horas. Em outro aspecto, as matrizes testadas com concentração superior a 25% dos biopolímeros exibiram resultados semelhantes ao da xantana isolada, retenção do fármaco na matriz, já a galactomanana isolada mostrou liberação muito rápida (VENDRUSCOLO, 2005).

A goma xantana adicionada ao amido e ao glicerol tem sido aplicada na indústria alimentícia para melhorar as propriedades mecânicas dos filmes de revestimento de alimento, na intenção de substituir os filmes não biodegradáveis (MATTA JUNIOR, 2009). Neste âmbito, a citada goma incorporada em suspensões de amido ajuda a manter a estabilidade, acelera o processo de gelatinização, reduz a umidade e custos (CHAI ZAWANG & SUPHANTHAKIRA, 2005).

A junção da goma com amidos e agentes plastificantes tem sido aplicada no melhoramento da estabilidade, gelatinização e retrogradação de filmes, propriedades de grande importância na obtenção que interferem diretamente na formação da película. Com a associação do amido, xantana e glicerol foram obtidos bons resultados em relação ao aumento da resistência a perfuração, a rupturas, aos valores de tonalidades, diferenciado as propriedades mecânicas destes filmes (MATTA JUNIOR, 2009).

Os agentes plastificantes inseridos em filmes têm como papel principal alterar a flexibilidade. Isso ocorre, devido às interferências causadas pelas moléculas que estes

agentes dispõem, reduzindo as pontes de hidrogênio existentes entre as cadeias poliméricas da estrutura, consequentemente, provocando modificações química, física e mecânica (MALI & GROSSMAN, 2003).

3.8. Microfibrilas de celulose

As microfibrilas de celulose são uma matéria prima natural e renovável (Hentze, 2010), que consistem principalmente de celulose cristalina, que são ligadas umas as outras por pequenas regiões de celulose amorfa (WANG e SAIN, 2007), ou seja, um material uniforme e altamente cristalino (YANO et al., 2007), conforme Figura 4. As microfibrilas de celulose são obtidas através da fibrilação mecânica que gera uma desintegração da parede celular (HENRIKSSON, 2008), que modifica as suas propriedades estruturais e de superfície (YANO e NAKAGAYTO, 2004), além da sua dimensão.

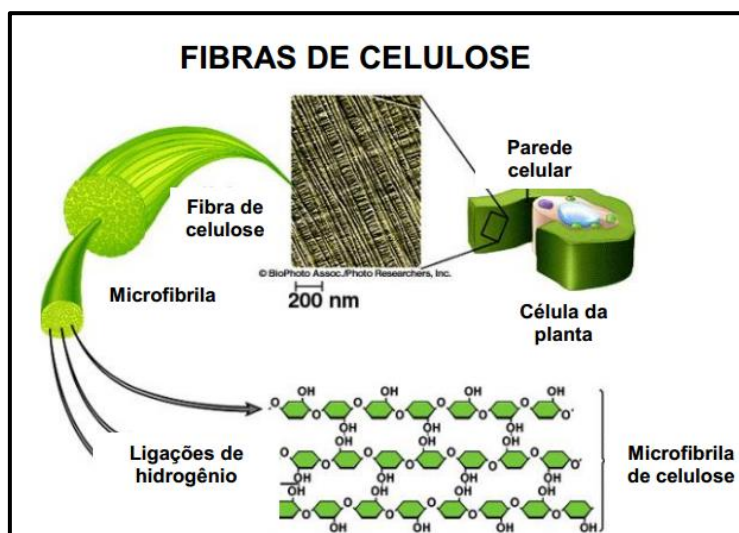


Figura 4: Estrutura da fibra de celulose (Potulski, 2012).

As microfibrilas de celulose podem possuir diâmetro de 5 a 50 nm e comprimento de 10 nm a 100 nm, dependendo dos parâmetros de preparação e da origem da celulose utilizada (HENRIKSSON, 2008; WANG e SAIN, 2007, SPENCE et al. 2010).

As propriedades físicas e mecânicas singulares das microfibrilas combinadas com a sua baixa densidade as tornam um material excelente e muito utilizado para reforço de compósitos (WANG e SAIN, 2007), como revestimentos e na produção de

filmes. Estudos recentes com filmes flexíveis contendo microfibrilas mostraram aumento nos índices de tração e nos valores de retenção de água (SPENCE, 2010).

As microfibrilas de celulose podem ser produzidas a partir de várias fontes, tais como polpa de madeira, algodão entre outras (SPENCE et al., 2011). Estes materiais são normalmente produzidos por quatro métodos mecânicos: homogeneização, microfluidização, micro-moagem (desfibrilação) e *cryocrushing* (maceração em baixíssima temperatura), cada um com vantagens e desvantagens, mas todos produzem microfibrilas com diâmetros na faixa de 1-10 nm (SPENCE et al., 2011).

Outros métodos também podem ser aplicados na produção deste tipo de materiais, como a utilização de tratamentos enzimáticos, hidrólises ácidas e carboximetilação (HENRIKSSON, 2008).

Muitas pesquisas tem sido desenvolvidas na área de compósitos e produção de filmes poliméricos, a fim de substituir fibras sintéticas por fibras naturais que apresentam propriedades mecânicas superiores (WANG et al., 2006; GAGNON, et al., 2010; TORVINEN et al., 2011).

3.9. Filmes flexíveis à base de amido de mandioca

Em escala laboratorial os filmes à base de amido são produzidos pelo processo de ‘*casting*’ ou por extrusão. Nesta técnica, após a gelatinização térmica dos grânulos em presença de excesso de água, amilose e amilopectina se dispersam na solução aquosa e, durante a secagem, se reorganizam, formando uma matriz contínua que dá origem aos filmes.

A grande vantagem dos filmes à base de amido é a obtenção de produtos finais biodegradáveis, sendo viável produzir materiais (embalagens) de vários tipos, a partir do amido, uma vez que, para a transformação dos biopolímeros em produtos acabados, as indústrias podem utilizar as mesmas máquinas utilizadas para a fabricação de plásticos de polietileno, sendo necessárias, apenas, algumas alterações nos processos ou pequenas adequações (ABAM, 2011). A exemplo da extrusão.

Os filmes produzidos a partir de polissacarídeos, especialmente amidos, apresentam baixa permeabilidade ao oxigênio a baixas taxas de umidade relativa. Além disso, os filmes à base de amido são insípidos, inodoros e transparentes, não alterando o sabor, aroma e aparência do produto (CHIUMARELLI et al., 2010; GARCIA et al., 2010; PARETA e EDIRISINGHE, 2006). No entanto, eles apresentam várias desvantagens, tais como sua hidrofiliabilidade (sensibilidade à água) e baixas propriedades

mecânicas em relação aos polímeros sintéticos convencionais, o que os tornam insatisfatório para algumas aplicações (ALVES et al., 2006; JOHN e THOMAS, 2008).

Além disso, geralmente os filmes obtidos de polissacarídeos como o amido são quebradiços; desta forma, tem-se a necessidade da inserção de plastificantes (VICENTINO et al. 2011). Os plastificantes devem ser compatíveis com o biopolímero e, os mais estudados em combinação com os filmes de amido são os polióis, como o glicerol e o sorbitol, materiais que interagem com as cadeias de amido, aumentando a mobilidade molecular e, conseqüentemente, a flexibilidade seus filmes (MALI et al, 2004).

Os plastificantes são geralmente adicionados na proporção de 10 a 60 g/100g matéria seca, dependendo do grau de rigidez do material (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1993). No entanto, dependendo da concentração em que são empregados, podem causar um efeito chamado antiplastificante, isto é, ao invés de aumentar a flexibilidade e hidrofiliçidade, podem causar um efeito contrário (GAUDIN et al., 1999). Geralmente, isto ocorre quando são empregadas pequenas concentrações de plastificante (abaixo 20 g/100 amido), então o plastificante interage com a matriz polimérica, mas não está em quantidade suficiente para aumentar a mobilidade molecular, fenômeno também dependente das condições de armazenamento (LOURDIN et al., 1997).

3.9.1. Amido

Quimicamente, o amido é constituído por dois tipos de polímeros, a amilose e a amilopectina. A amilose é um polímero linear com unidades de D-glicopiranosose ligadas por ligações α (1-4). A amilopectina é altamente ramificada, com unidades de D-glicopiranosose ligadas em α (1-4) e α (1-6) (PARKER; RING, 2001).

Fisicamente, o amido está armazenado sob a forma de grânulos, onde as frações (amilose e amilopectina) estão arranjadas na direção radial. A parte linear das moléculas de amilopectina forma estruturas helicoidal duplas, estabilizada por ligações de hidrogênio, dando origem às regiões cristalinas dos grânulos. A região amorfa é composta pelas cadeias de amilose e pelos pontos de ramificações da amilopectina (HERNÁNDEZ-URIBE, 2003; MEADOWS, 1998). Essa organização confere aos grânulos um caráter parcialmente cristalino, com graus de cristalinidade que variam de 20 a 45% (YOUNG, 1984). É a orientação regular das regiões amorfas e cristalinas que dão ao grânulo sua característica de birrefringência, conhecida como Cruz de Malta (HERNÁNDEZ-URIBE, 2003).

O amido é encontrado em uma grande concentração na natureza, e está presente principalmente em plantas como os grãos de cereais, tubérculos, raízes e leguminosas (LEONEL; CEREDA, 2002). Existem amidos derivados do milho, arroz, batata, mandioca, feijão, trigo, e várias outras fontes.

A gelatinização do amido ocorre quando uma dispersão de amido em água é aquecida, os grânulos gradualmente absorvem água, intumescem, perdem sua cristalinidade, liberam amilose e amilopectina e produzem pastas viscosas que, ao se resfriarem, formam géis (SANDERSON, 1981; THIRRÉ; SIMAO; ANDRADE, 2003).

Inicialmente, a gelatinização ocorre nas regiões mais acessíveis, que são as amorfas. Conforme a temperatura aumenta, as ligações de hidrogênio intermoleculares que mantêm as regiões cristalinas também se rompem. As moléculas de água solvatam grupamentos hidroxilas liberados e o grânulo continua se expandindo. Como consequência de uma severa ruptura de ligações de hidrogênio, o grânulo se hidrata completamente e, finalmente, a malha micelar se separa e se difunde para o meio aquoso (HERNÁNDEZ-URIBE, 2003).

O amido de mandioca é obtido através das raízes de mandioca devidamente limpas, descascadas, trituradas, desintegradas, purificadas, peneiradas, centrifugadas, concentradas, desidratadas e secas. É extremamente versátil e alcança uma eficiência incomparável em todas as suas aplicações. Quanto mais clara a cor, melhor é a qualidade do amido. A cor indica se a mandioca utilizada é velha ou não, como também a limpeza com que o amido é processado (ABAM, 2012).

O amido de mandioca é considerado de alta expansão porque seus grânulos sofrem grande inchamento quando aquecidos em água. Como as forças associativas internas tornam-se frágeis sob agitação mecânica, o viscograma Brabender apresenta um alto pico de viscosidade, seguido de acentuada queda durante o cozimento (FRANCO et al., 2001).

3.10. Filmes flexíveis de amido de mandioca com goma xantana

Na literatura é possível encontrar alguns poucos trabalhos que utilizam a goma xantana como integrante na formulação de alguns filmes biodegradáveis de amido, sendo responsável como agente de brilho nos filmes (CHEN e NUSSINOVITCH, 2000) e com a função de melhorar as propriedades mecânicas, como, por exemplo, o aumento da percentagem de alongação, observada em filmes de amido de mandioca pela adição de goma xantana desacetilada (VEIGA-SANTOS et al., 2005).

Foi atribuída também à presença da goma xantana a propriedade de diminuir a velocidade de cristalização e envelhecimento de filmes à base de amido (YOSHIMURA et al., 1999).

As características e propriedades da interação xantana-amido já tem sido estudadas por alguns autores (KATZBAUER, 1998; WANG et al., 2006; VEIGA-SANTOS, 2004), sendo que um aumento sinérgico da viscosidade foi observado em soluções de xantana com outros polissacarídeos de plantas (LACHKE, 2004) e mais especificamente com amido (KIM e YOO, 2006). Amidos com elevados teores de amilose são mais difíceis de serem dispersos em água para formar soluções filmogênicas e retrogradam em velocidade muito alta para formar gel (JOKAY e NELSON, 1967). Os plastificantes, assim como a goma xantana, poderiam auxiliar nesta questão, embora por mecanismos diferentes.

3.11. Caracterização de goma xantana

3.11.1. Viscosidade e pseudoplasticidade

A reologia é o estudo da deformação e do escoamento da matéria (STEFFE, 1996; RAO, 1999). A deformação ocorre quando a matéria está no estado sólido, e o escoamento, quando a matéria está no estado líquido. A propriedade reológica de interesse no caso dos sólidos é a elasticidade e no caso dos líquidos é a sua viscosidade.

A pseudoplasticidade é caracterizada pela diminuição da viscosidade, fenômeno que ocorre à medida que aumenta a taxa de deformação aplicada no sistema. A tixotropia é caracterizada pelo decréscimo da viscosidade aparente do líquido com o tempo de aplicação de uma dada taxa de deformação (SHAW, 1975; NAVARRO, 1997).

A goma xantana é extremamente pseudoplástica, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação do fluido devido à desarticulação da rede de polímero e ao alinhamento parcial das macromoléculas na direção do fluxo de cisalhamento (KI-WON; YONG-SEOK; GAP-SHIK, 2006), sendo uma característica muito desejada em diversas situações (XUEWU et al., 1996).

A viscosidade de um líquido está relacionada com a resistência interna oferecida ao movimento relativo das diferentes partes desse líquido (RAO, 1999). Assim, o conhecimento do comportamento reológico das soluções é essencial para o seu processamento, avaliação, controle de qualidade e aceitabilidade do consumidor

(STEFFE, 1996). Além de ser medida direta da qualidade do fluido, a viscosidade pode fornecer importantes informações a respeito das mudanças fundamentais na estrutura do fluido durante um determinado processo, como polimerização, emulsificação e homogeneização. Para se avaliar as características de uma solução ou mesmo realizar o controle de qualidade de um produto alimentício, devem-se fazer testes reológicos a baixa tensão de cisalhamento. Esses testes simulam as condições de utilização do produto (SACAMPARINI, 1991), e a viscosidade aparente é o parâmetro mais indicado (RAO, 1999). As altas tensões de cisalhamento são utilizadas para realizar estudos reológicos das condições do processamento de determinadas soluções ou produtos, (SHAW, 1975).

As soluções de xantana apresentam uma pequena tixotropia, ou seja, a viscosidade diminui com o tempo para uma taxa de cisalhamento constante. Esta diminuição na viscosidade é quase que totalmente reversível desde que não haja imediata destruição da estrutura interna, causada pela aplicação de taxa de deformação muito alta (NAVARRO, 1997). A presença de tixotropia no biopolímero é de grande utilidade para cosméticos, como loções e xampus, e tintas, por exemplo, pois facilita a retirada do produto da embalagem, sem escorrimento exagerado, e seu espalhamento durante a utilização (MOREIRA, 2002).

Dentre as gomas microbianas, tais como: dextrana, gelana e xantana, a última ocupa lugar de destaque no mercado por apresentar propriedades reológicas bastante distintas e incomuns, tais como alto grau de pseudoplasticidade.

Soluções de biopolímeros bacterianos com propriedades reológicas de interesse industrial geralmente exibem propriedades pseudoplásticas, viscoelásticas e tensão residual elevada (SUTHERLAND, 2001), porém a viscosidade aparente do caldo de fermentação é um parâmetro utilizado para avaliar a qualidade do biopolímero (SACAMPARINI, 1991; NITSCHKE *et al.*, 2001; BUENO; GARCIA-CRUZ, 2000).

As soluções aquosas de xantana apresentam características reológicas diferenciadas das dos demais polímeros, tal como, a alta viscosidade em baixa concentração, apresentando altos níveis de pseudoplasticidade e estabilidade frente a variações de temperatura, pH, e presença de sais (SUTHERLAND, 1983), e ainda, dissolve-se rapidamente em água quente ou fria (ROCKS, 1971).

A principal característica da xantana é sua capacidade de modificar a reologia ou o comportamento de fluxo das soluções (MARGARITIS & PACE, 1985). Suas

propriedades são determinadas por sua composição química, arranjos e ligações moleculares (PACE, 1980; GARCÍA-OCHOA *et al.* 2000).

A viscosidade das soluções de xantana aumenta com a elevação da concentração do polímero. Este comportamento pode ser atribuído às interações intermoleculares e entrelaçamentos (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). As concentrações críticas, que em termos reológicos, é o ponto divisor entre uma solução diluída e concentrada, constituem o produto da formação de aglomerados de partículas; assim o movimento de uma partícula vizinha podendo ser afetada pela presença das ramificações da goma xantana (RAO, 1999).

A goma xantana com alto grau de acetilação e especialmente baixo grau de piruvatação, aumenta a viscosidade de suas soluções porque associações intermoleculares são favorecidas (LIMA *et al.*, 2001).

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

As propriedades reológicas das soluções de xantana podem ser diferenciadas, dependendo das cepas, variação das colônias e dos processos utilizados para obtenção do biopolímero (FUNAHASHI; YOSHIDA; TAGUCHI, 1987; TORRES *et al.*, 1993; SOUZA, 1999; ANTUNES *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2001).

Muitos biopolímeros apresentam mudanças na viscosidade da solução quando o pH é alterado. Segundo Morris (1994), a viscosidade das soluções de goma xantana não é influenciada por mudanças de pH entre 1 e 11, e na presença de 0,1% de cloreto de sódio.

Os biopolímeros produzidos a partir de meios de cultura alternativos, como os que contêm soro de leite na sua composição, apresentaram qualidade inferior, isto é, viscosidade inferior à apresentada quando obtidos em meios com fontes de carbonos convencionais (ANTUNES, 2000; NERY, 2007; DINIZ, 2007; BRANDÃO, 2008; DRUZIAN & PAGLIARINI, 2007). A Tabela 2 mostra os diferentes tipos de resíduos

agroindustriais já utilizados com as suas respectivas viscosidades e tipos de linhagens de *Xanthomonas*.

Tabela 2: Viscosidade das gomas produzidas utilizando diferentes resíduos e diferentes cepas de *Xanthomonas campestris*.

	Resíduo	Viscosidade* (mPa)	Referência
<i>X. campestris mangiferaeindicae</i> 2103	Casca de Coco	52,64	NERY, (2007)
<i>X. campestris mangiferaeindicae</i> 2103	Soro de Leite	23,67	NERY, (2007)
<i>X. campestris mangiferaeindicae</i> 1866	Casca de Maracujá	22,45	NERY, (2007)
<i>X. campestris mangiferaeindicae</i> 1182	Casca de Cacau**	27,25	DINIZ, (2012)
<i>X. campestris mangiferaeindicae</i> 1182	Caldo de Cana	16,91	BRANDÃO,(2008)
<i>X. campestris mangiferaeindicae</i> 2103	Soro de Mandioca	19,09	BRANDÃO,(2008)

* 25°C, 25s⁻¹, 0,5% de Goma Xantana

** 0,02% Uréia e 0,2% Fosfato, 25°C, 250 rpm, 216h

Antunes (2000) mostrou que a medida da viscosidade de soluções aquosas de xantana revela com maior precisão a potencialidade de aplicação industrial da goma, se comparado com o resultado de viscosidade do caldo de fermentação. A tendência atual é de avaliar a qualidade de um biopolímero através da determinação da viscosidade aparente em solução aquosa em baixas concentrações (RAO, 1999; DIAZ, 2002; FORESTI, 2003).

3.11.2. Massa Molecular

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

As condições operacionais do processo fermentativo, a composição do meio de cultura e do substrato e as características e mutações genéticas da bactéria *Xanthomonas*, influenciam o MM e a DMM da goma xantana, sendo biosintetizadas

moléculas com massas moleculares médios e distribuições diferentes (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

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

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

Os teores de ácido pirúvico e acético apresentam relação com MM da xantana (CALLET; MILAS; RINAUDO, 1987). Variações de MM foram observadas ao se comparar goma xantana livre de piruvato ($2,3 \times 10^6$ Da) com a xantana livre de acetil e piruvato ($2,3 \times 10^6$ Da) e a goma xantana nativa ($5,2 \times 10^6$ Da). A desacetilação não afetou o teor de ácido pirúvico nem a MM da xantana. Embora a influência das condições operacionais na relação estrutura molecular e MM da xantana estejam descritas, não existe consenso entre os resultados obtidos, pois geralmente, apenas uma única variável é estudada (CASAS *et al.*, 2000).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é um dos métodos mais utilizados para separar e analisar polímeros acoplado o sistema a um detector de Índice de Refração (IR). Especificamente, a técnica de cromatografia de permeação em gel GPC (Gel Permeation Chromatography) ou cromatografia de exclusão molecular permite fornecer informações referentes a massa molecular média e a distribuição da mesma, mediante programas estatísticos específicos incorporados aos cromatógrafos (CIOLA, 1998). A técnica GPC permite uma seletiva e dinâmica distribuição das moléculas dos polímeros, podendo ser aplicada de maneira a eluir moléculas com

densidade e formas similares, fornecendo um método rápido e útil para avaliar o MM e DMM (CANEVAROLO, 2004).

O mecanismo de separação da cromatografia por exclusão está baseado na propriedade da resina empacotada na coluna (fase estacionária) ser macromoléculas com ligações cruzadas, apresentando afinidade pelos solventes, mas insolubilidade nos mesmos. Portanto, a resina da fase estacionária é um gel não carregado equilibrado no mesmo eluente que separa as moléculas em análise (COLLINS; BRAGA; BANATO, 1995). Na fase estacionária, o espaço intersticial entre as partículas da resina é ocupado pelo líquido que ao fluir, elue as moléculas a serem separadas. A porosidade da fase estacionária controla a eluição, de maneira que a variação no fluxo imprime uma velocidade que promove a separação (MANO, 1985).

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

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

3.11.3. Análise Térmica (TGAA e DSC) de goma xantana e de filmes flexíveis biodegradáveis

O termo análise térmica é frequentemente utilizado para descrever um conjunto de técnicas analíticas que investigam o comportamento de uma amostra em função da variação de temperatura, possibilitando caracterizar qualitativa e quantitativamente um grande número de materiais em uma larga faixa de temperatura. As vantagens das análises térmicas em relação a outras técnicas são: a amostra pode ser estudada sob uma ampla faixa de temperatura usando vários programas de aquecimento; existe uma variedade de porta amostras (cadinhos) e acessórios que permitem acomodar quase todas as formas físicas de amostra (sólido, líquido e gel); somente uma pequena quantidade de amostra é necessária (0,1 µg-10 mg); a atmosfera gasosa na vizinhança da amostra pode ser controlada e é possível realizar experimentos que requerem desde alguns minutos a algumas horas para seu término, a partir do controle da taxa de aquecimento (HATAKEYAMA e QUINN, 1994).

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

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

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

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é a técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à amostra em relação a um material de referência,

enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura. A medida de temperatura é feita por meio de termopares fixados à base do suporte da amostra e da referência. Alterações de temperatura da amostra são devidas a variações de entalpia endotérmicas ou exotérmicas, decorrentes de transições físicas ou de reações químicas. A área contida sob o pico é representativa da variação de entalpia (ΔH) sofrida pela amostra. As variações de entalpia são chamadas transições de primeira ordem (fusão, cristalização, vaporização, solidificação e adsorção), ilustrado na Figura 5. As transições térmicas ditas de segunda ordem são acompanhadas de variação da capacidade calorífica da amostra, juntamente com variações dimensionais e viscoelásticas (como, por exemplo, a transição vítrea TGA), mas não apresentam variações de entalpia, não gerando picos nas curvas de DSC e sim, alterações na linha de base (LUCAS et al., 2001).

Embora sejam comuns duas varreduras para a análise de DSC, para filmes biodegradáveis obtidos de amido, ao final da primeira varredura, o amido presente no material se expande, impossibilitando uma segunda varredura (VEIGA-SANTOS & SCAMPARINI, 2004).

A análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC) consiste na avaliação da quantidade de calor absorvido ou liberado por uma amostra quando da ocorrência de eventos térmicos. Entende-se por eventos térmicos, transformações físicas, químicas ou físico-químicas ocorridas na amostra quando esta é submetida a um programa de temperatura. Dentre os eventos térmicos de materiais poliméricos, pode-se citar: **Transição vítrea** (temperatura de transição vítrea, TGA): Este ponto é o valor médio da faixa de temperatura que durante o aquecimento de um material polimérico, permite que as cadeias poliméricas da fase amorfa adquiram mobilidade, passa do comportamento vítreo ao borrachoso (CANEVAROLO, 2007). **Fusão Cristalina** (temperatura de fusão cristalina, T_m): Esta temperatura é o valor médio da faixa de temperatura em que durante o aquecimento, desaparecem as regiões cristalinas com a fusão dos cristalitos. Essa transição só ocorre na fase cristalina, portanto só tem sentido de ser aplicada em polímeros semicristalinos (CANEVAROLO, 2007). Portanto, em materiais totalmente amorfos este evento não ocorre. **Cristalização** (temperatura de Cristalização, T_c): Esta temperatura é atingida durante o resfriamento da massa fundida de um polímero semicristalino no momento em que um dado ponto dentro da massa polimérica fundida, um número grande de cadeias poliméricas se organize espacialmente de forma regular, permitindo a formação de uma estrutura cristalina. Cadeias em outros pontos também

estarão aptas para se ordenarem, formando novos cristais. Isto se reflete em toda massa polimérica, produzindo-se a cristalização da massa fundida (CANEVAROLO, 2007). A Figura 5 apresenta uma curva esquemática de DSC onde os eventos térmicos que geram modificações em curvas DSC e a característica dos picos formados estão representados.

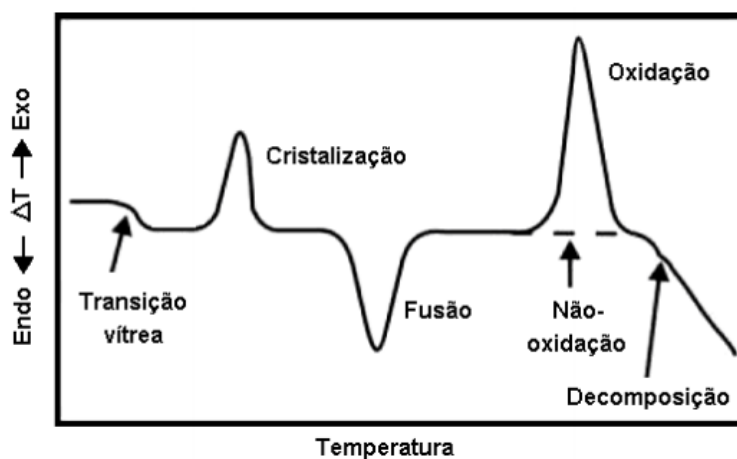


Figura 5: Curva esquemática de DSC (SIQUEIRA, 2011).

Na calorimetria exploratória diferencial por fluxo de calor a propriedade física medida é a diferença de temperatura entre a amostra (A) e o material de referência (R) ($\Delta T = T_A - T_R$), quando ambos são submetidos a uma programação rigorosamente controlada de temperatura. Neste tipo de DSC, amostra e referência são colocadas em cápsulas idênticas, posicionadas sobre um disco termoeletrico e aquecida por uma única fonte de calor. O calor é transferido para as cápsulas de amostra e referência por meio do disco, com o fluxo de calor diferencial entre ambas as cápsulas sendo controlado por meio de termopares conectados ao disco, uma vez que ΔT , em um dado momento, é proporcional à variação de entalpia, à capacidade calorífica e à resistência térmica total ao fluxo calórico.

3.11.4. Propriedades Mecânicas de filmes flexíveis biodegradáveis

As propriedades mecânicas determinam o comportamento do material quando submetidos a esforços mecânicos, definindo características importantes dos materiais poliméricos, sendo o ensaio de tração o método mais comumente utilizado. Neste ensaio é gerada uma curva tensão-deformação que sofre influência da temperatura, tempo e ambiente, desta curva são extraídos parâmetros como Módulo de Young (ou elasticidade), tensão e deformação no escoamento, tensão e deformação na ruptura, tensão máxima (resistência à tensão) e a tenacidade (CANEVAROLO, 2007).

As propriedades mecânicas dos polímeros são influenciadas pela massa molecular, cristalinidade, presença de ramificações e efeitos das ligações cruzadas. O aumento da cristalinidade está associado ao aumento da rigidez, à tração e opacidade, logo polímeros amorfos são geralmente menos rígidos mais fracos e facilmente deformados (BRIASSOULIS et al., 2004).

Os filmes devem ser resistentes à ruptura quando submetidos à tração, rasgamento, impacto e abrasão, para que possam proteger o produto embalado e facilitar sua manipulação. Devem também ser flexível para que possam se adaptar às possíveis deformações sem sofrer uma ruptura (GUILBERT et al., 1996).

O teste mais utilizado para medir a resistência mecânica, é o teste de tração, onde podem ser obtidas a resistência à tração na ruptura, no escoamento e na força máxima; deformação na ruptura; módulo de elasticidade, ductibilidade e tenacidade. O ensaio de determinação das propriedades mecânicas sob tração de um filme flexível envolve a separação, em uma velocidade constante, de duas garras que prendem as extremidades de um corpo-de-prova, registrando-se ao longo do ensaio a força que o material oferece à deformação. A tensão de ruptura (MPa) é a resistência oferecida pelo material para atingir a ruptura. A deformação (%) é a relação percentual entre a variação do comprimento do corpo-de-prova no teste e seu comprimento inicial (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

3.11.5. Cristalinidade da goma xantana/ Difração de raios - X

A cristalinidade da goma xantana bem como dos filmes biodegradáveis pode ser determinada através de difração por raios-X, que pode revelar detalhes de estrutura interna do material da ordem de 10^{-8} cm de tamanho. Pela difração, pode-se determinar se um material é amorfo, semi-cristalino ou cristalino. Também permite avaliar a cristalização durante a estocagem no caso do filme biodegradável. Para os filmes semi-cristalinos ou cristalinos, a difração permite identificar qual ou quais elementos são responsáveis pela cristalinidade do material (CULLITY, 1978).

Embora existam bases de dados com o padrão de cristalinidade de muitos materiais, no caso de filmes biodegradáveis, especialmente os elaborados a partir de matérias-primas industriais que podem sofrer pequenas variações de um lote para outro, recomenda-se que também as matérias-primas sejam separadamente submetidas á análise de cristalinidade, fornecendo padrões para uma comparação mais eficaz com o padrão de cristalinidade obtido pela análise do filme.

3.11.6. Espectroscopia da região do infra-vermelho das gomas e dos filmes flexíveis

A chamada radiação infravermelha corresponde à parte do espectro situada entre as regiões do visível e microondas. A porção de maior utilidade para a química orgânica está situada entre 4000 e 400 cm^{-1} . A radiação do infravermelho em frequência menor do que aproximadamente 100 cm^{-1} , quando absorvida por uma molécula orgânica converte-se em energia de rotação molecular. O processo de absorção é quantizado e, em consequência, o espectro de rotação das moléculas consiste em uma série de linhas (SILVERSTEIN et al., 1994).

A espectroscopia de infravermelho fornece informações diretas sobre os modos vibracionais das moléculas de uma substância. O interesse da técnica está no fato de que o conjunto de bandas do espectro é específico de cada substância, em particular, as bandas isoladas vinculam-se a vibrações de um determinado grupo funcional ou de um tipo de ligação do composto estudado. Dessa forma, pode-se estabelecer a composição e configuração estrutural da espécie química através de seu espectro de infravermelho (SILVERSTEIN et al., 1994).

As posições das bandas do espectro infravermelho são apresentadas em número de onda. As intensidades das bandas são expressas como transmitância ou absorbância. A identificação da frequência de vibração da ligação correspondente, o chamado assinalamento das bandas, é obtida através da comparação destes com tabelas de espectroscopia (SILVERSTEIN et al., 1994).

As técnicas de espectroscopia no infravermelho próximo (FTNIR) e no infravermelho médio (FTIR) são cada vez mais utilizadas no controle de qualidade de processos e produtos industriais (BLANCO et al., 1999), principalmente porque as medidas são rápidas, utilizam pequena quantidade de amostra e envolvem preparação rápida e simples das amostras. Tanto técnicas de FTNIR como de FTIR permitem ainda a determinação simultânea de diferentes parâmetros (CAMPESTRINI, 2005; CEN e HE, 2007), além de serem métodos não destrutivos, limpos, sem uso de reagentes agressivos e nem geração de resíduos (HELFER et al., 2006). Esta técnica está presente em praticamente todas as áreas, devido ao nível de desenvolvimento que esta tecnologia atingiu nos últimos anos (CARNEIRO, 2008).

3.11.7. Microscopia

A necessidade histórica do homem de observação da natureza e dos materiais possibilitou o aparecimento de equipamentos para auxiliar a visão humana ao longo de mais de 10 séculos. Os campos de observação dos objetos com ampliações de algumas dezenas até milhões de vezes foram possíveis com o desenvolvimento de equipamentos extremamente sofisticados, que utilizam feixes de radiação eletromagnética ou feixes de elétrons na construção das imagens. Um aspecto fundamental na obtenção das imagens reside na capacidade de resolver dimensões bastante reduzidas, em elevadas ampliações.

Basicamente, as técnicas de microscopia têm como objetivo a construção de imagens ampliadas dos objetos e sistemas observados. Tanto os microscópios quanto os olhos humanos podem observar objetos até um certo limite de detalhes. A partir deste limite, denominado resolução, teremos “ampliação vazia”. Portanto, nenhum equipamento de microscopia poderá cobrir todas as escalas de observação, na faixa de macroestrutura até nanoestrutura (ORÉFICE et al., 2005).

3.11.7.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O princípio da microscopia eletrônica de varredura consiste na emissão de um feixe de elétrons por um filamento de tungstênio, que concentrado, controlado e reduzido por um sistema de lentes eletromagnéticas, diafragmas e bobinas. Incide sobre a amostra, provocando uma série de emissões de sinais relacionados com a interação do feixe de elétrons incidente e a amostra. Os sinais emitidos encontram-se sob a forma de elétrons (secundários, retroespalhados, absorvidos, transmitidos, difratados, etc.) e de fótons (fotoluminescentes e raios-X), os quais são captados por detectores apropriados, sendo amplificados e processados num sistema analisador específico para cada tipo de sinal (ORÉFICE et al., 2005).

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a obtenção de uma imagem ampliada e tri-dimensional da amostra a partir da interação de um feixe de elétrons com o material, desde que este não seja transparente aos elétrons. O feixe de elétrons (elétrons primários) gerado por efeito termo-iônico é acelerado através de uma diferença de potencial e colimado através de uma coluna ótico-eletrônica sendo conduzido à câmara que contém a amostra. Este feixe de elétrons ao focalizar um ponto da amostra gera sinais que são captados e amplificados fornecendo um sinal elétrico que gera a imagem. Conforme o feixe varre a área em análise, uma imagem virtual vai sendo formada ponto a ponto (ORÉFICE et al., 2005).

Para a garantia do livre caminho médio dos elétrons, é necessário um sistema de alto vácuo (933 - 1333 Pa) nas partes que compõem o equipamento.

A interação do feixe de elétrons com a amostra gera uma variedade de sinais. Na microscopia eletrônica de varredura para a obtenção da imagem são captados elétrons secundários, elétrons retroespalhados e raios-X característicos.

Os microscópios eletrônicos de varredura apresentam, atualmente, resoluções de até 0,5 nm (SE, 30kV e aumento 600.000X), possibilidade de aumento de até 2.000.000X e são extensivamente utilizados nas pesquisas das áreas biomédicas e de materiais, nas indústrias de semicondutores, em laboratórios de pesquisas avançadas e em muitas outras aplicações (ORÉFICE et al., 2005).

3.11.7.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A técnica de caracterização por microscopia eletrônica de transmissão (MET ou em inglês *transmission electron microscopy* – TEM) oferece a possibilidade e ampliação com resolução que são da ordem de 1000X superiores ao da microscopia óptica. Foi uma técnica desenvolvida na década de 1930. A tensão aplicada varia entre 60 keV e 400 keV, sendo valores típicos na faixa de 75-100 keV. Um requisito básico para as amostras, além da estabilidade em alto vácuo, é a espessura reduzida, geralmente inferior a 200 nm.

Este valor pode variar dependendo do material, uma vez que o feixe eletrônico deverá ser transmitido através da amostra. O feixe eletrônico transmitido incide sobre uma tela fluorescente, um filme fotográfico ou uma câmera de vídeo, gerando a imagem da amostra. A resolução do MET está da ordem de 0,2 nm para equipamentos com tensões da ordem de 300 keV, com ampliações de 1.000.000X (ORÉFICE et al., 2005).

Esta resolução obtida, com elevada ampliação, é resultante do feixe coerente, em foco e com alta energia. Teoricamente, um feixe eletrônico com tensão de aceleração de 100 keV, possui um comprimento de onda de 0,0037 nm, muito inferior ao comprimento de onda da radiação eletromagnética ultravioleta ou mesmo raios-X. A análise requer o posicionamento da amostra preparada sobre um reticulado de cobre, ouro ou carbono, onde o feixe eletrônico deverá incidir e gerar a imagem na tela. O sistema de colimação e alinhamento do feixe eletrônico é construído por lentes eletromagnéticas. Uma particularidade que torna a caracterização por MET extremamente interessante é a possibilidade de obter imagens, padrões de difração e

outras técnicas de análise espectroscópicas no mesmo equipamento (ORÉFICE et al., 2005).

A interação do feixe eletrônico de alta energia com a matéria promove diversos efeitos tais como radiação (raios-X característicos) utilizada na espectroscopia EDS, elétrons secundários, elétrons retroespalhados e elétrons transmitidos, utilizados na formação das imagens, elétrons difratados que geram informações cristalográficas da amostra, difração de elétrons (ED). Pode-se enumerar diversas aplicações em todas as áreas da ciência para a caracterização por microscopia eletrônica de transmissão, como exemplo: Imagens da superfície do material com resolução da ordem de 0,2 nm; Análise de defeitos, degraus ; Análise de nanopartículas; Avaliação de filmes finos e contornos de grão; Análise de precipitação e recristalização "in situ"; Identificação de composição de fases (ORÉFICE et al., 2005).

São basicamente dois os modos de operação do MET. O primeiro consiste na obtenção da imagem e o segundo permite observar os padrões de difração dos elétrons. O primeiro possibilita análises estruturais e morfológicas e o segundo avaliação de fases cristalinas, tais como monocristais, policristais e materiais amorfos (ORÉFICE et al., 2005).

Capítulo 4

4. Materiais e Métodos

4.1 Material

Foram utilizados como matérias-primas para obtenção da goma xantana e dos biomateriais: bagaço de cana-de-açúcar (BC) (doado por vendedores de caldo de cana da orla da cidade de Salvador-BA); *X. campestris pv. campestris* 254, *Xanthomonas campestris pv. manihotis* 356, *Xanthomonas campestris pv. campestris* 472, *Xanthomonas campestris pv. cordiae* 510 (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico IBSBF, Campinas-SP); Amido de mandioca (doado pela Cargill Agrícola SA, Porto Ferreira-SP); Glicerol (Synth®); Extrato de malte, extrato de levedura e peptona bacteriológica (Acumedia); Glicose, sulfato de cobre e sulfato de potássio (Synth®); Ágar (Micromed); Fosfato monobásico de potássio (Quimis); Uréia, cloreto de sódio (Vetec); BF3 (Merck); Membrana de celulose D9777 - 100 FTO (Sigma-Aldrich). Seis padrões de dextrana de diferentes massas moleculares com intervalo de 102.000 a 5.900.000 Da Goma Xantana Sigma Aldrich.

4.2 Métodos

4.2.1. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar (BC)

Como substrato alternativo para bioconversão a goma xantana, foi testado o bagaço de cana-de-açúcar (BC). A composição centesimal do BC inclui a determinação do teor de umidade, cinzas, proteína bruta, lipídeos totais e carboidratos totais. Estes parâmetros são importantes considerando que a *Xanthomonas* necessita de nutrientes essenciais, como fonte de carbono e nitrogênio, para produzir goma xantana. Determinação de:

- Umidade: foi determinada pelo método de secagem em estufa a 105°C com circulação de ar de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC,1997).
- Cinzas: foi determinado por incineração em mufla a 550°C de acordo com a AOAC (1997).
- Proteína bruta: foi calculada a partir dos teores de nitrogênio total, usando os fatores de conversão. O fator geral de 6,25 foi usado para calcular as proteínas que não

possuíam um fator de conversão específico. O nitrogênio total foi determinado pelo método Kjeldahl, segundo AOAC (1997).

- Lipídios totais: foram determinados pelo método de extração BLIGH-DYER (1959), segundo AOAC (1997).
- Carboidratos: O teor de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de umidade, proteína, lipídios totais e cinzas. Os valores de carboidratos incluem a fibra alimentar total. Esta fração representa a fonte de carbono disponível para ser bioconvertida à goma xantana pelas cepas de *Xanthomonas*.

Para a determinação dos principais constituintes do bagaço de cana-de-açúcar (lignina, hemicelulose e celulose) foram utilizados os métodos de VAN SOEST (1965).

4.2.2. Produção de goma xantana a partir do bagaço de cana-de-açúcar

4.2.2.1. Repicagem das cepas e preparação do inóculo

A repicagem da cepa *Xanthomonas* foi realizada em placas de Petri. As placas com meio YM padrão (Yeast-Malt), YM-ágar (sólido), contendo (% m/v) 1,0% glicose; 0,5% peptona bacteriológica; 0,3% extrato de levedura; 0,3% extrato de malte e 2,0% de ágar puro foram esterilizados à temperatura de 121°C por 15 minutos e esfriadas à temperatura ambiente. Os repiques foram realizados a cada 15 dias e armazenados a ± 4 °C a fim de verificar algumas características morfológicas das colônias.

Para preservar as culturas e diminuir o risco de alteração no perfil genético, foi realizado o congelamento da cepa em ultrafreezer a -80°C. O procedimento de congelamento foi realizado seguindo as etapas: incubação da cultura em meio YM líquido a 28°C \pm 2 °C durante 48 h; adição de agente crioprotetor estéril (glicerol 50% p/v); homogeneização da mistura, sendo a suspensão alíquotada em microtubos estéreis (1,5 mL), devidamente identificados seguido de congelamento imediato -80°C. Todos os procedimentos foram realizados de forma asséptica (STABURY et al., 1995).

Para a preparação do inóculo foi utilizado o meio YM padrão líquido, contendo (m/v): 1,0% glicose; 0,5% peptona bacteriológica; 0,3% extrato de levedura; 0,3% extrato de malte (GARCÍA-OCHOA et al., 2000) para o volume de 50 mL em Erlenmyer. O pH do meio foi ajustado para 7,0 e a esterilização foi realizada por meio de vapor úmido (autoclave) a 121°C por um período de 15 minutos. O meio foi esfriado

e inoculado com uma alçada da cultura de *Xanthomonas* recentemente repicada e incubado a 28°C, 180rpm, 24 h em agitador rotativo (*Shaker* - Tecnal, mod. TE-424).

4.2.2.3. Etapas do estudo quanto a produção de goma xantana a partir de bagaço de cana

O estudo da produção de goma xantana foi realizado em duas diferentes escalas, sendo a primeira parte do trabalho realizada em agitador orbital (*Shaker*) e a última etapa (planejamento estatístico) em Biorreator, seguindo as etapas conforme Figura 6.

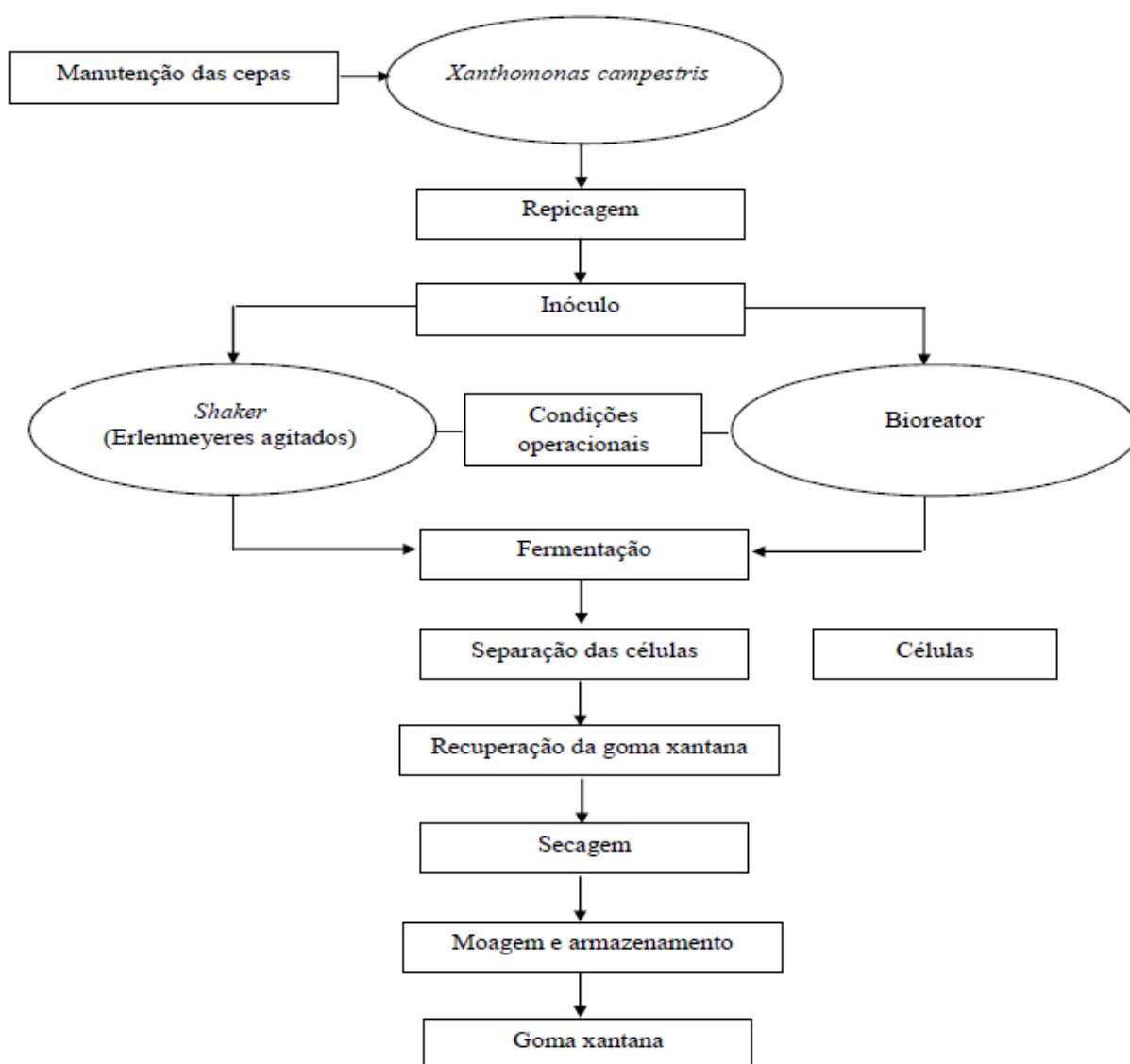


Figura 6: Etapas de processo para produção de goma xantana em escala laboratorial.

4.2.2.3.1. Seleção de cepas que bioconverte bagaço de cana a goma xantana

Foram utilizadas quatro cepas do gênero *Xanthomonas*. As bactérias foram obtidas da Coleção de Culturas do Instituto Biológico em Campinas-SP como é mostrado na Tabela 3.

Tabela 3: Cepas de *Xanthomonas* utilizadas na produção de goma xantana.

Número da Cepa	Descrição
254	<i>Xanthomonas campestris pv campestris</i>
356	<i>Xanthomonas axonopodis pv manihotis</i>
472	<i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>
510	<i>Xanthomonas campestris pv cordiae</i>

O estudo de seleção de linhagens foi realizado em agitador orbital (*Shaker*), a 28°C. O inóculo foi realizado a 180 rpm por 24 horas e a fermentação a 250 rpm por 120 horas, minimamente suplementado com KH_2PO_4 a 0,1 % e uréia a 0,01 %.

4.2.2.3.2. Avaliação da influência da variação da concentração de bagaço de cana na produção e viscosidade da goma xantana resultante

O estudo da influência da variação da concentração do substrato alternativo no processo fermentativo foi realizado, visando avaliar os rendimentos de produção e as viscosidades das xantanas obtidas, sob condições experimentais estabelecidas primariamente. A linhagem utilizada neste estudo foi a *Xanthomonas campestris pv campestris*. As concentrações de bagaço de cana estudadas foram: 2 %, 4 %, 6 %, 8 % e 10 %. O estudo foi realizado em *Shaker*, a 28°C, 250 rpm por 120 horas.

4.2.2.3.3. Planejamento para produção de goma xantana a partir da cepa *Xanthomonas campestris pv campestris* 254 e a concentração de bagaço de cana selecionados (Biorreator 1,5 L, 28°C, aeração (1,0 – 3,0 vvm) , agitação (200 – 700 rpm), 72 horas).

Para a bactéria selecionada nos testes preliminares foram testadas as variáveis independentes (terceira etapa do estudo) para formular o meio fermentativo: aeração (% de O_2 dissolvido) (1,0% a 3,0% vvm) e agitação (200 a 700 rpm). O cultivo foi realizado em biorreator Tecnal (mod. TecBio-V) de 1,5 L, 960 mL de volume útil (Figura 7). Foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com

três repetições no ponto central e quatro pontos axiais, totalizando onze ensaios (Tabela 4). O meio de produção do biopolímero foi elaborado com 4,0 % (m/v) de BC suplementado com 0,01 % de uréia e 0,1 % de KH_2PO_4 e o pH ajustado para 7,0. A esterilização foi realizada por meio de vapor úmido (autoclave) a 121°C por um período de 15 minutos.

Tabela 4: Planejamento fatorial para avaliar a influência de variáveis independentes (aeração e agitação) sobre as respostas/variáveis dependentes (produção e viscosidades das gomas), com a cepa *X. campestris* 254 e 4% bagaço de cana.

Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais	
	Agitação	Aeração	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)
1	-1	-1	200	1,0
2	-1	1	200	3,0
3	+1	-1	700	1,0
4	+1	1	700	3,0
5	-1,41	0	96,4	2,0
6	+1,41	0	803,5	2,0
7	0	-1,41	450	0,585
8	0	+1,41	450	3,41
9*	0	0	450	2,0
10*	0	0	450	2,0
11*	0	0	450	2,0

* Pontos Centrais

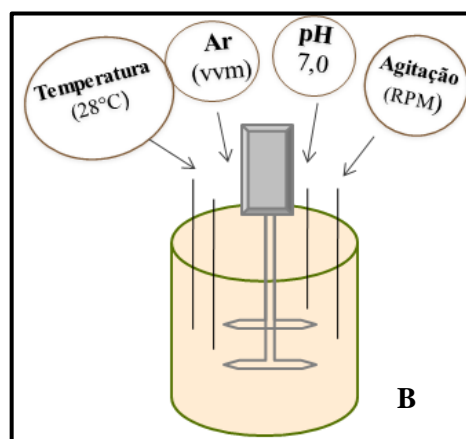
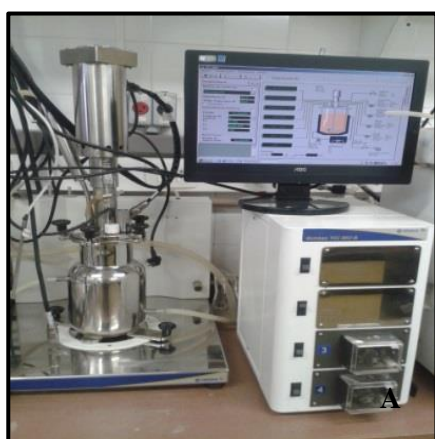


Figura 7: Biorreator Tecnal-TecBio de 1,5 L (A) utilizado para produção de goma xantana a partir da fermentação de bagaço de cana-de-açúcar e esquema com as variáveis utilizadas no processo (B).

Para recuperação da goma xantana obtidas em todos as etapas do estudo, o caldo fermentativo foi centrifugado na velocidade de 18800 $\times g$ (12000 rpm) por 30 minutos, a uma temperatura de 5°C para remoção celular (Hitachi mod. CR22GIII). Ao sobrenadante foi adicionado etanol 96°GL (1:3 v/v) para precipitação da goma. As gomas precipitadas foram retiradas com auxílio de um bastão de vidro e transferidas para placas previamente taradas (Figura 8). As gomas foram secas em estufa (35±2°C) até massa constante, e em seguida foram moídas. O polissacarídeo foi armazenado em frasco vedado para análises posteriores. Para a purificação da goma xantana, soluções aquosas a 2,0% (m/v) foram dialisadas, sob constante agitação, contra água ultrapura (durante 72 horas a 4°C), em membranas semipermeáveis de celulose com limite de exclusão molecular de 12.000-16.000 Da e porosidade de 24 Å.

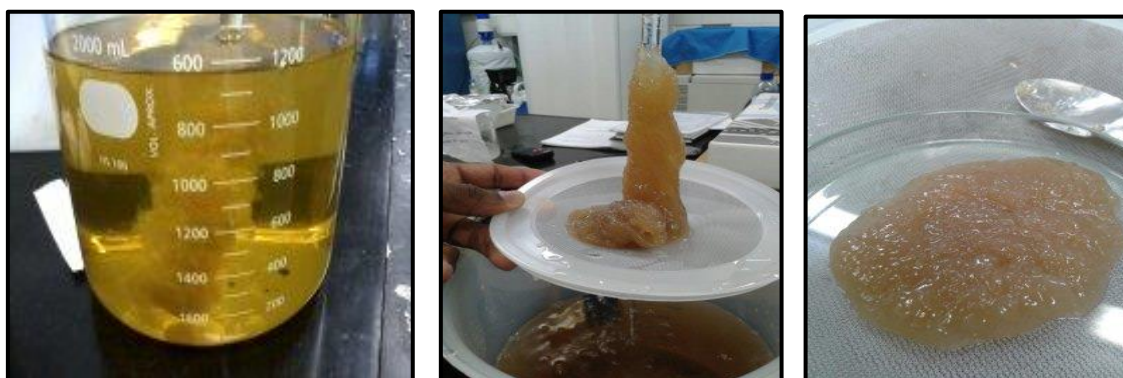


Figura 8: Efeito da precipitação da goma xantana oriunda do bagaço de cana-de-açúcar quando adicionado etanol 96°GL (1:3 v/v).

A temperatura, o tempo de fermentação, a agitação, o pH e a concentração do oxigênio dissolvido foram monitorados durante o processo fermentativo.

Os valores obtidos dos experimentos na terceira etapa foram tratados a fim de verificar se tais condições de aeração e agitação iriam influenciar ou não o comportamento do sistema. As respostas ou variáveis dependentes de cada um dos ensaios foram monitoradas durante 72 h de fermentação (Tabela 4). O tratamento dos dados foi realizado utilizando-se o software Statistica 7[®] para as variáveis dependentes com diferença significativa ($p < 0,05$).

A troca da água das membranas de diálise foi realizada de 3 a 5 vezes ao dia. Após a diálise, as soluções de biopolímeros foram congeladas, liofilizadas (LIOTOP mod. L101) e armazenadas em embalagens herméticas. Com as gomas xantana

purificadas e submetidas à radiação UV para inativação celular, foram realizadas as análises de caracterização.

O valor da porcentagem de conversão dos substratos utilizados no meio de cultivo para produção de goma xantana pôde ser obtido através da Equação 1:

$$\% \text{ Conversão} = \frac{(Pf - Pi)}{(Si - Sf)} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

Pf = Produção de goma xantana final; Pi = Produção inicial; Si = Substrato inicial; Sf = Substrato final.

4.2.2.3.4. Aplicação da goma xantana produzida em biorreator no desenvolvimento dos filmes flexíveis de amido

Os filmes flexíveis de amido foram preparados segundo a técnica *casting*, que consiste no preparo de uma solução filmogênica, onde inicialmente dissolveu-se em água destilada, o amido de mandioca (4,0 %, g/100g), o glicerol (0,79 a 2,0 %, g/100g), a goma xantana (0,01 a 0,05%, g/100g). Para avaliar a influência das concentrações de goma xantana e glicerol sobre as propriedades dos filmes, um planejamento estatístico DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) fracionado 2² foi utilizado, com 4 pontos axiais ($\alpha = \pm 1,41$) para cada variável independente e triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos (Tabela 5). Posteriormente as soluções foram aquecidas até a temperatura de gelatinização do amido (~ 70°C) sob agitação constante. Foram pesadas 50 g da solução filmogênica em placas de Petri de poliestireno e desidratada em estufa com circulação de ar (35± 2°C) por 10 a 12 horas. Os filmes obtidos foram acondicionados em dessecadores (75 %UR, 25°C) contendo solução saturada de cloreto de sódio, por 10 dias, antes de serem caracterizados, conforme adaptação da metodologia proposta por Veiga-Santos e Scamparini (2004).

Os valores obtidos nos experimentos foram tratados a fim de verificar se as concentrações de goma xantana e glicerol influenciaram ou não o comportamento do sistema. As respostas ou variáveis dependentes (produção e viscosidade) de cada um dos ensaios foram monitoradas. O tratamento dos dados foi realizado utilizando-se o software Statistica 7 para as variáveis dependentes com diferença significativa (p<0,05).

Tabela 5: Matriz do planejamento experimental composta pelas variáveis: glicerol (X1) e goma xantana (X2) e seus respectivos níveis em valores reais e codificados, considerando o valor de amido fixo de 4%.

Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais	
	Glicerol (X1)	GX (X2)	Glicerol (%)	GX (%)
1	-1	-1	1,000	0,015
2	+1	-1	2,000	0,015
3	-1	+1	1,000	0,045
4	+1	+1	2,000	0,045
5	0	-1,41	1,500	0,009
6	0	+1,41	1,500	0,051
7	-1,41	0	0,793	0,030
8	+1,41	0	2,207	0,030
9*	0	0	1,500	0,030
10*	0	0	1,500	0,030
11*	0	0	1,500	0,030

*Pontos centrais

4.2.4 Caracterização dos biomateriais

4.2.4.1. Viscosidade aparente das gomas xantana

As amostras de goma xantana obtidas pela fermentação de bagaço de cana pelas cepas de *Xanthomonas* 254, 356, 472 e 510 depois de dialisadas foram dissolvidas em água destilada na concentração de 0,5% (m/v). A dissolução ocorreu sob agitação mecânica (agitador Ika mod. C-MAGH57) por aproximadamente 15 minutos em temperatura ambiente para total absorção da água e formação do gel. As soluções foram submetidas a repouso durante 12 h à temperatura ambiente antes da leitura da viscosidade visando à eliminação de bolhas.

A viscosidade aparente (μ) das gomas obtidas foi determinada em função da taxa de cisalhamento (CHHABRA e RICHARDSON, 1999), a partir da tensão de cisalhamento e da taxa de cisalhamento medidas em reômetro Haake Rheotest (mod. 2.1), com dispositivo de cilindros concêntricos, acoplado a um banho-maria. As medidas foram feitas nas temperaturas de 25, 45, 65 e 85 °C e em taxa de cisalhamento entre 25 e 1000 s⁻¹.

Neste modelo de viscosímetro, utilizou-se 25 mL de solução de goma xantana. Uma velocidade de rotação variável é aplicada ao cilindro interno e mediu-se a tensão de cisalhamento resultante.

Para investigação do comportamento pseudoplástico das soluções de goma, foi realizado o ajuste do modelo de Otswald-de Waele ($\sigma = K \cdot \gamma^n$) aos dados experimentais, a partir da regressão da lei de potência, usando o software Excel 2007[®], onde K é o índice de consistência; n é o índice do comportamento do fluxo; σ é a tensão de cisalhamento e γ é a taxa de cisalhamento. A partir do gráfico $\log \sigma$ x $\log \gamma$, obteve-se os valores de K e n e as equações das retas, podendo-se então através da análise estatística, demonstrar o ajuste do modelo aos dados experimentais.

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

4.2.4.2. *Massa molecular média da goma xantana*

A determinação da massa molecular média (MM) foi realizado para todas as gomas xantana produzidas por GPC CLAE-IR (PerkinElmer Serie 200), utilizando colunas Shodex SB 803, 804, 805, 806 conectadas em série, tendo como fase móvel solução aquosa de nitrato de sódio (0,3% m/v) a um fluxo de 1,0 mL/min. Foram injetados 80 μ L das soluções aquosas (0,3% m/v) de padrões de dextrana (American Polymer Standards) de diferentes pesos moleculares (102000, 207200, 431800, 655200, 759400, 1360000, 2025000, 2800000, 34500000, 5900000), das gomas xantana obtidas por fermentação do BC, bem como a goma xantana padrão (Sigma) (0,3 % m/v). Os valores das massas moleculares foram obtidos a partir de uma curva de calibração (\log Massa Molecular x Tempo de Retenção) dos padrões de dextranas.

4.2.4.3. *Composição monomérica da goma xantana*

Os métodos para determinação de açúcares e ácidos urônicos por CLAE-IR foram adaptados de Druzian (2000). As gomas xantana obtidas a partir do BC foram inicialmente hidratadas por 24 h / 30°C e em seguida hidrolisadas utilizando solução 1M de ácido tri-fluoroacético (TFA) sendo posteriormente aquecidas a 100°C por 10h (Estufa Tecnal mod. TE 394/2).

4.2.4.4. Determinação de açúcares por CLAE-IR das gomas xantana

O método para a determinação de açúcares utilizou um sistema por CLAE-RI (PerkinElmer Série 200), utilizando uma pré-coluna Polypore Ca (30 mm x 4,6 mm x 10 µm) seguida de uma coluna Polypore Ca (220 mm x 4,6 mm x 10 µm). As colunas foram acondicionadas em forno a 80°C. A fase móvel utilizada foi água grau cromatográfico sob um fluxo de 0,1 mL/min. O volume de injeção foi de 5 µL.

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

4.2.4.5. Determinação de ácidos urônicos por CLAE-UV das gomas xantana

O método para a determinação dos ácidos urônicos utilizou um sistema por GPC CLAE (PerkinElmer Série 200), com detector Ultravioleta (UV) em um comprimento de onda de 195 nm, utilizando uma pré-coluna Polypore H (30 mm x 4,6 mm x 10 µm) seguida de uma coluna Polypore H (220 mm x 4,6 mm x 10 µm). As colunas foram acondicionadas em forno a 50°C. A fase móvel utilizada foi uma solução aquosa de H₂SO₄, pH 1,9 sob fluxo de 0,4 mL / min. O volume de injeção foi de 10 µL.

A identificação foi realizada por comparação de tempo de retenção (Tr) entre os picos dos padrões dos ácidos glucurônico e pirúvico e das amostras de goma hidrolisada. A quantificação foi obtida por padronização externa, utilizando soluções aquosas dos padrões para a obtenção das curvas.

4.2.4.6. Caracterização Térmica dos biomateriais

Os equipamentos utilizados foram o Pyris 1 e DSC 60 da PerkinElmer e Shimadzu, respectivamente, ambos calibrados seguindo as normas dos fabricantes. As amostras foram mantidas em dessecador até serem pesadas e acondicionadas em cadinhos previamente tarados na balança.

As curvas termogravimétricas das gomas xantanas obtidas na seleção de linhagens (6,0 mg) foram obtidas da temperatura ambiente até 500°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹, para determinar o perfil de decomposição térmica das amostras, a atmosfera do forno constituída por nitrogênio numa vazão média de 20 mL.min⁻¹. Na variação de concentração de bagaço de cana de açúcar e no planejamento

em fermentador a temperatura final foi de 800°C, considerando a mesma taxa de aquecimento e vazão média dos demais experimentos.

Para os filmes flexíveis de amido obtidos nos 11 ensaios do planejamento experimental, a análise termogravimétrica foi realizada nas seguintes condições: massa da amostra de aproximadamente 6,0 mg, atmosfera de nitrogênio a uma vazão de 50 mL min⁻¹, razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, de 25°C a 650 °C.

Em todas as análises, as curvas DTGA, correspondentes à derivada primeira das curvas de TGAA, foram usadas para determinar os intervalos de temperatura correspondente às percentagens de desidratação e decomposição de material orgânico. O programa Pyris Manager (PerkinElmer) foi utilizado para obtenção dos valores observados na curva.

As curvas DSC foram obtidas na faixa de temperatura de 25°C a 500°C, com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e atmosfera dinâmica de ar sintético com vazão de 50 mL.min⁻¹. Utilizou-se como suporte da amostra cadinho de alumínio e a massa das amostras analisadas variou de 4,0 a 10,0 mg. O programa TA 60 (Shimadzu) foi utilizado para obtenção dos valores observados na curva.

4.2.4.7. *Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) dos biomateriais*

A morfologia das dispersões de goma xantana obtida pelo bagaço de cana-de-açúcar foi determinada por microscopia eletrônica de transmissão (Jeol JEM- 1230 Eletron Microscope). As amostras foram diluídas a concentração de 0,5% de goma xantana e posteriormente foi realizada uma nova diluição na proporção 1:10. O reagente utilizado como corante foi o acetato de uranila, sendo preparado previamente a 1% (p/v) em água deionizada. O reagente foi filtrado com o auxílio de uma seringa de plástico acoplada com um filtro de tamanho dos poros de 0,22 µ.

A solução de goma xantana foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão a fim de determinar a presença de microestruturas que conferem reforço em filmes biodegradáveis de amido.

Na realização da análise utilizou-se uma grade de 300 mesh recoberta com um filme formar, na sua superfície foi adicionada uma gota da amostra e após 30 segundos (tempo necessário para fixação da amostra), o excesso da amostra na grade foi seca com papel de filtro (Whatman nº 1). Após isso, adicionou-se uma gota do corante acetato de uranila, aguardou-se 30 segundos, o excesso do corante foi retirado com papel de filtro e aguardou-se a temperatura ambiente a secagem na grade antes de se proceder a

microscopia. A microscopia foi realizada no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ – Salvador – BA.

4.2.4.8. Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FTIR) dos biomateriais

As medidas de FTIR das gomas e dos filmes flexíveis de amido foram realizadas no espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier modelo IR Prestige-21 da Shimadzu, com pastilhas de KBr, na região de 400-4000 cm^{-1} , resolução de 1 cm^{-4} e 50 varreduras. As amostras das gomas foram incorporadas ao KBr e submetidas a alta pressão para a produção de pastilhas. Enquanto que para os filmes foi por leitura direta (ATR).

4.2.4.9. Difratometria de raios-x (DRX) das gomas xantana

As análises das gomas e dos filmes flexíveis de amido foram realizadas em Difrátômetro de raios-X Shimadzu (mod. XRD 7000), com passo de 2°/min e radiação de cobre $\lambda = 1,5433 \text{ \AA}$, operando com 40 kV, corrente de 30 mAe varredura entre 5° e 80°.

Com os resultados obtidos no difratômetro foi possível calcular os índices de cristalinidade das gomas e dos filmes (Equação 2) de acordo com o método empírico de Segal et al. (1959), que fornece um valor aproximado de cristalinidade e com a ajuda do Software Origin 8.1[®] obter os índices de cristalinidade:

$$I_c = \frac{I(002) - I(am)}{I(002)} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

I_c = Índice de cristalinidade em percentagem

$I(002)$ = máxima intensidade do pico de difração que representa o material.

$I(am)$ = mínima intensidade do pico de difração que representa o material amorfo.

4.2.4.10. Medida de espessura (E) dos filmes

A espessura dos filmes flexíveis de amido pré-acondicionados (75 %UR, 25°C) foi avaliada através da espessura média através de 06 medições em posições aleatórias,

por meio de micrômetro digital Mitutoyo (mod. MDC 25 SB) de ponta plana (com resolução de 1 μ m) em triplicata (CHOI e HAN, 2001).

4.2.4.11. Medida da atividade de água (A_w) dos filmes

As medições de atividade de água (a_w) dos filmes flexíveis de amido foram realizadas com um decágono, AQUALAB LITE. Como padrões para a calibração do equipamento foram utilizados a água pura (a_w 1,000% \pm 0,001) e LiCl (a_w 0,500% \pm 0,015). As amostras, pré-acondicionadas em 75 % de Umidade Relativa a 25°C, foram avaliadas em triplicata (VEIGA-SANTOS et al., 2005).

4.2.4.12. Medida da Umidade (U) dos filmes

A umidade dos filmes flexíveis de amido foi obtida por secagem no infravermelho, em equipamento Unidade de Secagem Mettler LTJ ajustando-se a intensidade da radiação emitida de modo que a amostra atingisse 110°C.

4.2.4.13. Ensaio mecânicos dos filmes

O comportamento mecânico dos filmes flexíveis de amido pré-acondicionados (75% UR, 25°C) foram realizados em máquina universal de ensaios da marca EMIC (mod. DL2000/700), com carga máxima de 20KN, seguindo a norma ASTM D-882, com velocidade de 12,5 mm.min⁻¹ e temperatura de 25°C. Foram realizados ensaios de tração em 12 corpos de prova para cada amostra. Os corpos de provas possuíam dimensões de 50 mm de comprimento e 25 mm de largura.

Capítulo 5

5. Resultados e Discussão

O trabalho está dividido em quatro etapas: na primeira etapa serão apresentados os resultados de seleção de linhagens de *Xanthomonas* para a produção de goma xantana realizadas por fermentação em *Shaker* com a fonte de carbono comercial (sacarose) e alternativa (bagaço de cana-de-açúcar), e caracterizações dos biopolímeros. Na segunda etapa está descrito a influência da variação da concentração da fonte de carbono (bagaço de cana-de-açúcar) na produção de goma xantana pela bactéria selecionada (em *Shaker*) e viscosidade da goma e demais caracterizações. Na terceira etapa do estudo estão apresentados os resultados do planejamento estatístico para a produção de goma xantana utilizando o bagaço de cana-de-açúcar com a cepa e concentração de bagaço de cana selecionado, utilizando biorreator de 1,5 L. Na quarta etapa estão apresentados os resultados da aplicação da goma xantana microfibrilada obtida em biorreator como aditivo de filmes flexíveis de amido, glicerol e goma xantana bem como a caracterização deste biomaterial. As quatro etapas estão conforme ilustradas na Figura 9.

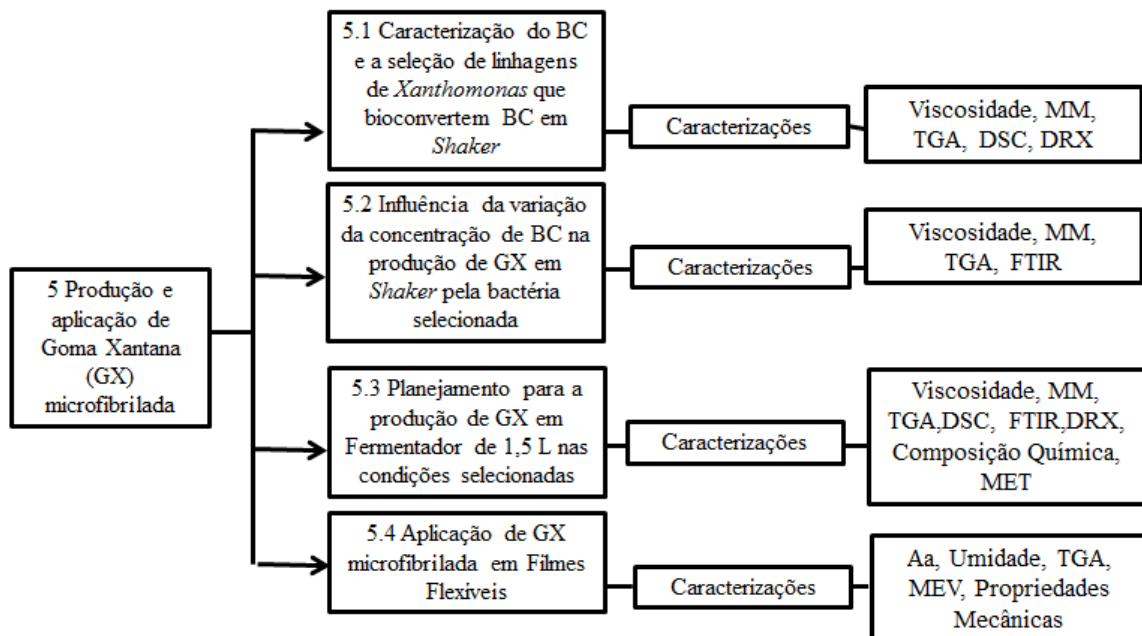


Figura 9: Fluxograma ilustrando a distribuição da apresentação dos resultados do trabalho, onde BC = Bagaço de cana e GX = Goma xantana.

5.1. Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

A composição do bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho está apresentada na Tabela 6. Esse substrato foi utilizado nos meios de fermentação para substituir a sacarose como fonte de nutrientes para produção de goma xantana.

Tabela 6: Composição química média do bagaço de cana-de-açúcar.

Parâmetros	Valor (%)
Umidade	0,84 ± 0,11
Cinzas	1,16 ± 0,01
Lipídios totais	1,00 ± 0,02
Proteínas bruta	1,29 ± 0,06
Carboidratos	95,71 ± 0,02
Celulose	35,75 ± 0,02
Hemicelulose	22,03 ± 0,01
Lignina	20,34 ± 0,01

Segundo Brandão (2013), a relação entre a fonte de carbono (C) e a fonte de nitrogênio (N) do bagaço de cana é de aproximadamente 77:1. Esta é uma relação que pode favorecer o acúmulo de polímero (goma xantana) com propriedades reológicas adequadas (BRANDÃO, 1996).

O bagaço de cana é composto em média de 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (PANDEY et al, 2000). O bagaço empregado para produção de goma xantana apresenta uma porcentagem menor de celulose (35,75%) em comparação com os relatos de literatura. Este fator pode estar relacionado à maior decomposição térmica da celulose durante o processamento da cana-de-açúcar para obtenção do caldo de cana-de-açúcar.

De acordo com Shankar et al. (1996), as fontes de nutrientes influenciam a via de síntese do biopolímero, tornando o meio fermentativo rico em macro e micronutrientes, assim como a adaptação bacteriana a um meio alternativo, podem contribuir para um aumento na produção de goma de xantana.

5.2. Seleção de linhagens produtoras de goma xantana a partir de bagaço de cana em *Shaker*

Sabe-se que a composição do meio de cultura, as fontes de carbono e de nitrogênio, as condições de fermentação, o tempo de fermentação, o pH, a temperatura e do tipo de cepa de *Xanthomonas* podem influenciar a estrutura, a composição, a massa

molecular, e portanto a viscosidade da goma xantana resultante (DUTA et al., 2006; NICOLAUS et al., 2010; ASSIS et al., 2014).

Em geral, os meios fermentativos contêm de 2 a 4% de açúcar livre, normalmente glicose ou sacarose, como fonte de carbono, 0,05 a 0,1% de nitrogênio, fósforo e traços de outros minerais e resultam numa conversão de 50 a 70% da fonte de carbono em goma xantana (ROTTAVA, 2005). Os processos industriais procuram utilizar meios que disponibilizem condições tanto para o crescimento como para o acúmulo do polímero (TEIXEIRA, 2005). Neste contexto, existe a necessidade de suplementação de nitrogênio livre e fósforo no meio fermentativo composto de bagaço de cana-de-açúcar, como ureia e fosfato de potássio.

Nesta etapa do trabalho relata-se a investigação de cepas de *Xanthomonas* na bioconversão de bagaço de cana a goma xantana. Como controle foi utilizado a fonte de carbono sacarose. As cepas de *Xanthomonas* estudadas foram: *X. campestris* pv. *campestris* 254, *X. campestris* pv. *manihotis* 356, *X. campestris* pv. *campestris* 472 e *X. campestris* pv. *cordiae* 510. A Figura 10 mostra a produção de goma xantana pelas quatro cepas de *Xanthomonas* a partir dos dois meios fermentativos.

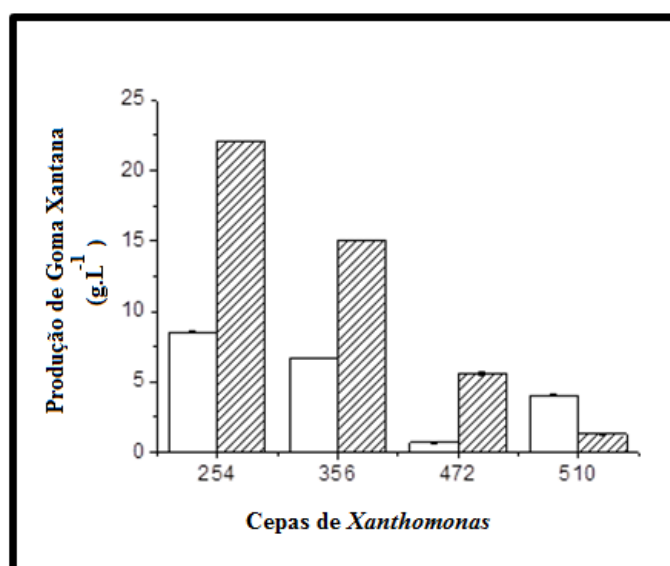


Figura 10: Produção de goma xantana por diferentes cepas de *Xanthomonas* empregando sacarose (barras hachuradas) e 4% de bagaço de cana-de-açúcar (barras brancas) como substrato em Shaker, a 28°C e 250 rpm. As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para as medições.

A produção de goma xantana variou de 1,28 g.L⁻¹ a 22,05 g.L⁻¹ empregando sacarose como fonte de carbono, e de 0,68 a 8,54 g.L⁻¹ quando bagaço de cana foi

utilizado como fonte de carbono e outros nutrientes. Com sacarose como fonte de carbono, a produção com a cepa 254 foi 17 vezes mais elevada do que a obtida com a linhagem de *X. campestris pv. cordiae* 510, que foi a menos produtiva. No entanto, quando o bagaço de cana foi utilizado como fonte de carbono, a menor produção de goma xantana foi obtida pela linhagem de *X. campestris pv. campestris* 472. Todas as médias de produção diferem entre si a 95% de confiança, o que permite concluir que a cepa de *Xanthomonas* 254 apresentou melhor adaptação ao meio alternativo e consequentemente maior produção de biopolímero (8,54 g.L⁻¹). A bioconversão (Equação 1) dos substratos utilizados para obtenção de goma xantana foi de 22,25%, 52,57% e 92,04% para a produção com as cepas 356, 510 e 472 respectivamente, utilizando o bagaço de cana. Com a sacarose, foi de 55,12%; 37,90%; 13,94% e 3,20%, respectivamente.

A escolha de nutrientes adequados para gerar o produto de interesse está relacionada com a atividade metabólica do microrganismo (SANTOS-EBINUMA et al., 2013). Neste sentido, a menor produção de goma xantana obtida com bagaço de cana-de-açúcar pode ser resultado da menor quantidade de açúcar livre disponível para a reprodução do microrganismo, uma vez que a concentração de carboidratos dos meios contendo bagaço de cana é de 38,3 g.L⁻¹, enquanto o conteúdo de sacarose é de 40,0 g.L⁻¹.

Quando a sacarose é utilizada no meio fermentativo como fonte de carbono para os microrganismos a disponibilidade de açúcar acessível é maior em comparação com o bagaço de cana, que é uma forma complexa (açúcares ligados) para os microrganismos. A primeira condição oferece a possibilidade de o microrganismo desenvolver uma rota metabólica produzindo e absorvendo nutrientes, desde o início do cultivo. No entanto, quando o microrganismo metaboliza bagaço de cana (polissacarídeos complexos), resulta num custo de energia adicional, associada à produção de enzimas (hidrolases, invertases, entre outras) e, consequentemente, no desenvolvimento de uma via metabólica diferenciada.

Dentre as cepas estudadas, a *X. campestris pv. campestris* 254 destacou-se com relação a produção de goma xantana, independente da fonte de carbono utilizada. Moreira et al. (2001) avaliou a produção de goma xantana em *Shaker* utilizando sacarose com 18 diferentes cepas de *X. campestris pv campestris* e obteve uma produção de goma xantana variando de 2,3 g.L⁻¹ a 8,4 g.L⁻¹, dependendo do microrganismo empregado. Nitschke & Thomas (1995) obtiveram produção em *Shaker*

de 10,6 g.L⁻¹ e 14,5 g.L⁻¹ utilizando glicose e duas diferentes cepas selvagens de *X. campestris pv. campestris*.

Um dos principais problemas associados aos resíduos industriais é a poluição do meio ambiente devido descarte. Tem-se feito vários esforços para dar-lhes novas aplicações, tais como, fonte alternativa de nutrientes visando à produção de biomoléculas por microrganismos. Assim, vários resíduos agroindustriais vem sendo empregados como substratos para produzir goma xantana. Como os experimentos realizados nesta etapa do trabalho foram realizados em agitador orbital (*Shaker*), os resultados serão comparados com outros produzidos em condição semelhante. Nery et al. (2013) bioconverteu casca de coco com *X. campestris campestris* 1866 resultando em 2,0 g.L⁻¹ de goma xantana depois de 60 horas de fermentação. Assis et al. (2013), produziu goma xantana com *X. axonopodis pv. manihotis* 1182 a 28°C, 120 horas e 250 rpm e obteve uma produção de 2,40 g.L⁻¹ empregando resíduo líquido de sisal. No entanto, com *X. campestris mangiferaeindicae* 2103 e glicerina produziu 7,23 g.L⁻¹ de polissacarídeo. Silva et al. (2009) cultivou *X. campestris* 1230 e *X. campestris* 1182 com soro de leite a 28°C, 72 horas e 180 rpm, e obteve uma produção de 10,82 g.L⁻¹ e 23,81 g.L⁻¹, respectivamente. A comparação entre os resultados deste trabalho e os citados na literatura mostra que o bagaço de cana-de-açúcar, por ser um substrato composto de polissacarídeos complexos é uma fonte adequada para a produção de goma xantana. O BC por ser um substrato complexo pode ser utilizado como substrato para produção de goma xantana porque o microrganismo *Xanthomonas* consegue degradá-lo.

5.2.1. Caracterização das gomas xantana produzidas

5.2.1.1. Viscosidade Aparente

A solução de goma xantana é considerada como um fluido com comportamento típico pseudoplástico (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; ASSIS et al., 2014). No presente trabalho, a viscosidade aparente de soluções aquosas a 0,5% (m/v) de goma xantana foi avaliada na taxa de cisalhamento de 25 s⁻¹ e 25°C.

A viscosidade aparente das gomas xantana obtidas com diferentes linhagens a partir de bagaço de cana variou de 116,10 a 120,30 mPa.s e utilizando sacarose variou de 96,16 a 113,08 mPa.s. A comparação entre as médias dos valores de viscosidade mostra que houve diferença estatística ao nível de confiança de 95% (p < 0,05), considerando-se tanto a influencia das cepas quanto as fontes de nutrientes do meio. A

maior viscosidade aparente foi obtida com a goma xantana produzida pela cepa 254 com bagaço de cana ($120,30 \pm 0,07$), que foi de 3,50, 1,75 e 1,03 % maior do que a viscosidade das gomas xantana obtidas com as linhagens 356, 510 e 472, respectivamente, com a mesma fonte de carbono (Tabela 7).

Tabela 7: Viscosidade aparente de soluções aquosas de goma xantana obtida por fermentação de diferentes cepas de *Xanthomonas* com sacarose e bagaço de cana de açúcar.

Cepas de <i>Xanthomonas</i>	Viscosidade (mPa.s) *	
	Sacarose	Bagaço de Cana
254	$111,20 \pm 0,07^{Bb}$	$120,30 \pm 0,07^{Aa}$
356	$96,16 \pm 0,06^{Bd}$	$116,10 \pm 0,02^{Ad}$
472	$113,08 \pm 0,08^{Ba}$	$119,06 \pm 0,05^{Ab}$
510	$110,20 \pm 0,03^{Bc}$	$118,20 \pm 0,07^{Ac}$

Letras maiúsculas indicam diferenças significativas ($P > 0,05$) em relação à fonte de carbono e letras minúsculas mostram ($P > 0,05$) em relação à estirpe microbiana, nas condições 25°C e 25 s^{-1} .

A goma xantana obtida pela cepa 254 a partir de bagaço de cana-de-açúcar resultou em $8,54\text{ g.L}^{-1}$ de polímero (62% menor do que a obtida em meio controle obtida com a fonte de carbono sacarose, $22,50\text{ g.L}^{-1}$), (Figura 10). Em contrapartida, este biopolímero apresentou viscosidade aparente ($120,30\text{ mPa.s}$) aproximadamente 8,0 % maior do que viscosidade da goma xantana obtida da sacarose ($111,20\text{ mPa.s}$), Tabela 7. Assim, torna-se necessário menor quantidade de goma xantana para obter soluções altamente viscosas. Esta viscosidade pode estar associada a maior massa molecular do biopolímero e/ou a presença de polímeros do bagaço de cana que não foram totalmente metabolizados pelo microrganismo.

Brandão et al. (2010) cultivaram *X. campestris* 2103 e 1182 utilizando soro de mandioca (*Shaker*) e obtiveram goma xantana com uma viscosidade aparente de 96,14 e 41,78 mPa.s, respectivamente. Assis et al. (2014) utilizando glicerina e *Xanthomonas campestris* 2103 empregando várias combinações de aeração e agitação em biorreator, obteve uma viscosidade aparente variando 79,60 a 262,20 mPa.s. A viscosidade aparente destes relatos foi medida nas mesmas condições do presente trabalho. Assim, nesse contexto as gomas xantanas obtidas com bagaço de cana são similares as produzidas com outros substratos alternativos.

5.2.1.2. Massa Molecular

A massa molecular média da goma xantana derivada da sacarose e do bagaço de cana usando as quatro cepas de *Xanthomonas* foi determinada. Seis padrões de dextrana de diferentes MM com intervalo de 102.000 a 5.900.000 Da foram separados por GPC CLAE-IR, resultando tempos de retenção de 31,56 à 26,43 minutos, respectivamente. A curva de calibração obtida pelo Log da MM em função do tempo de retenção dos padrões de dextrana apresentou $R^2 = 0,970$ ($y = -0,301x + 14,56$). De acordo com a Figura 11 constata-se que a massa molecular tem uma relação inversa com o tempo de retenção.

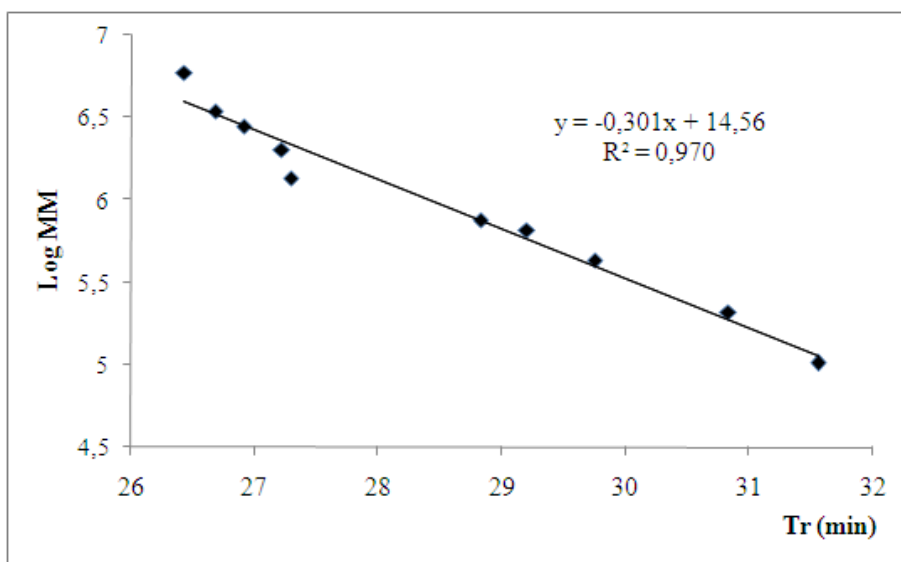


Figura 11: Curva de calibração Log massas moleculares (MM) dos padrões de dextranas de diferentes de massas moleculares x tempos de retenção (Tr) obtidos por GPC CLAE-IR.

Os cromatogramas das soluções aquosas das xantanas obtidas a partir das diferentes fontes mostram a presença de um pico com maior intensidade, indicando o aparecimento da goma xantana. Quanto maior a massa molecular média menor será o tempo de retenção na coluna tipo GPC (Figuras 11 a 14).

A separação cromatográfica GPC CLAE-IR mostra que a massa molecular média das gomas xantana obtida a partir do cultivo submerso em meio contendo 4,0% de bagaço de cana-de-açúcar por diferentes cepas variou de 310,08 a 354,98 kDa (Tabela 8).

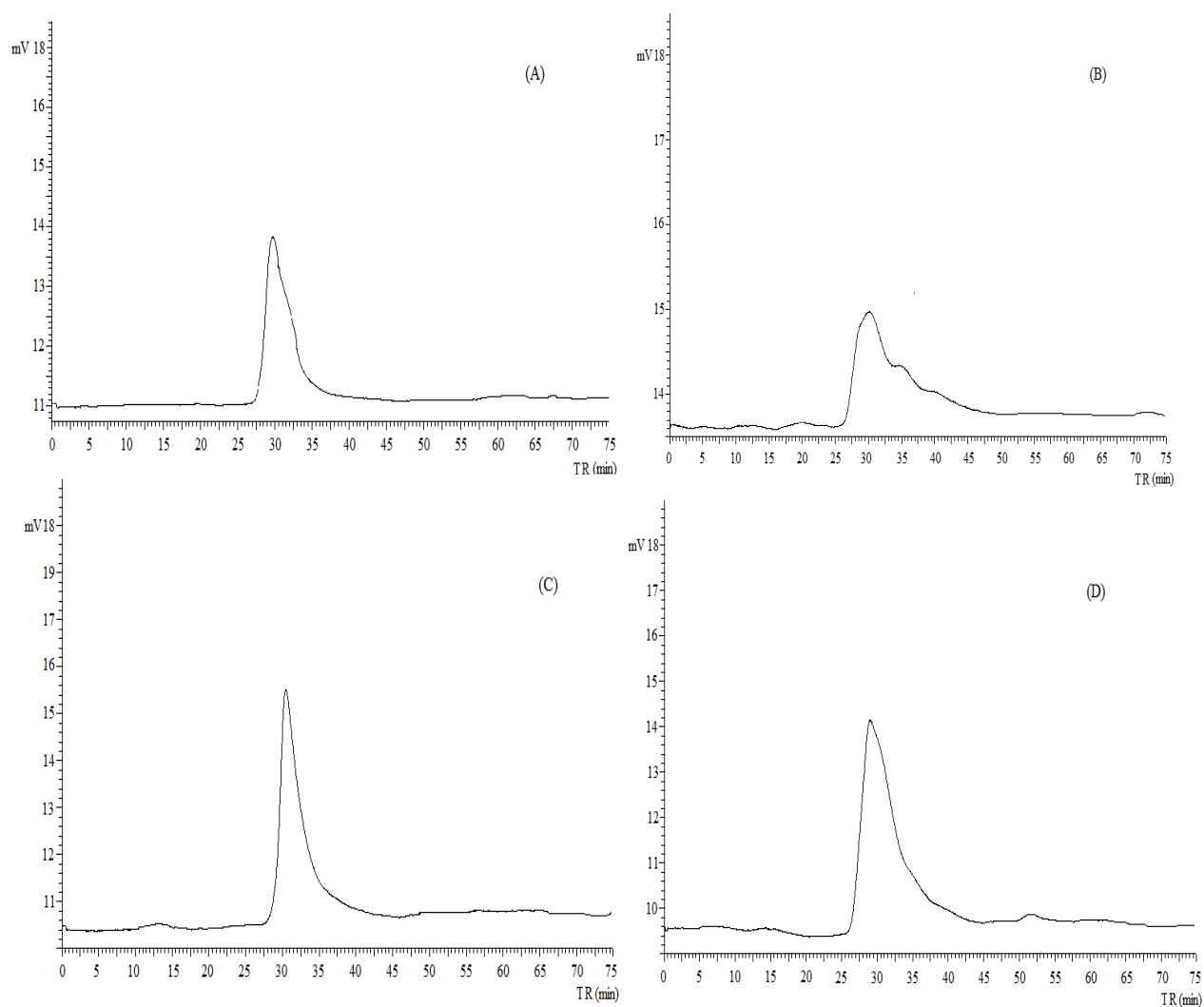


Figura 12: Os cromatogramas (GPC CLAE-IR) mostram a distribuição da massa molecular da goma xantana produzida por *X. campestris* pv. *campestris* 254 (A), *X. campestris* pv. *manihotis* 356 (B), *X. campestris* pv. *campestris* 472 (C) e *X. campestris* pv. *cordiae* 510 (D) empregando sacarose como fonte de carbono.

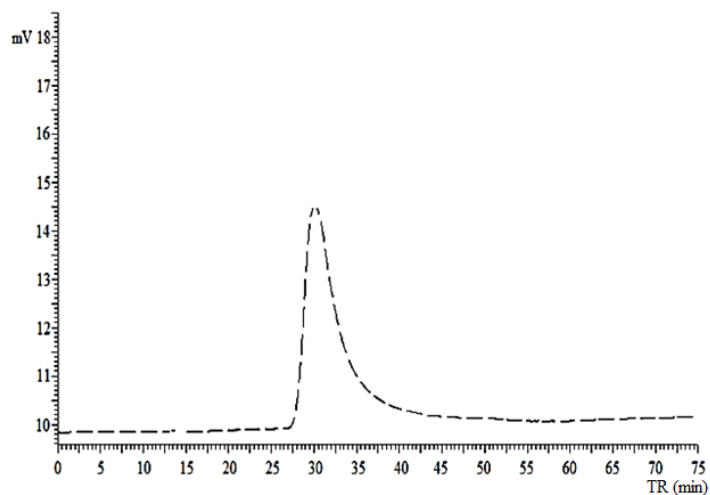


Figura 13: Cromatogramas (GPC CLAE-IR) mostrando a distribuição da massa molecular da goma xantana Sigma.

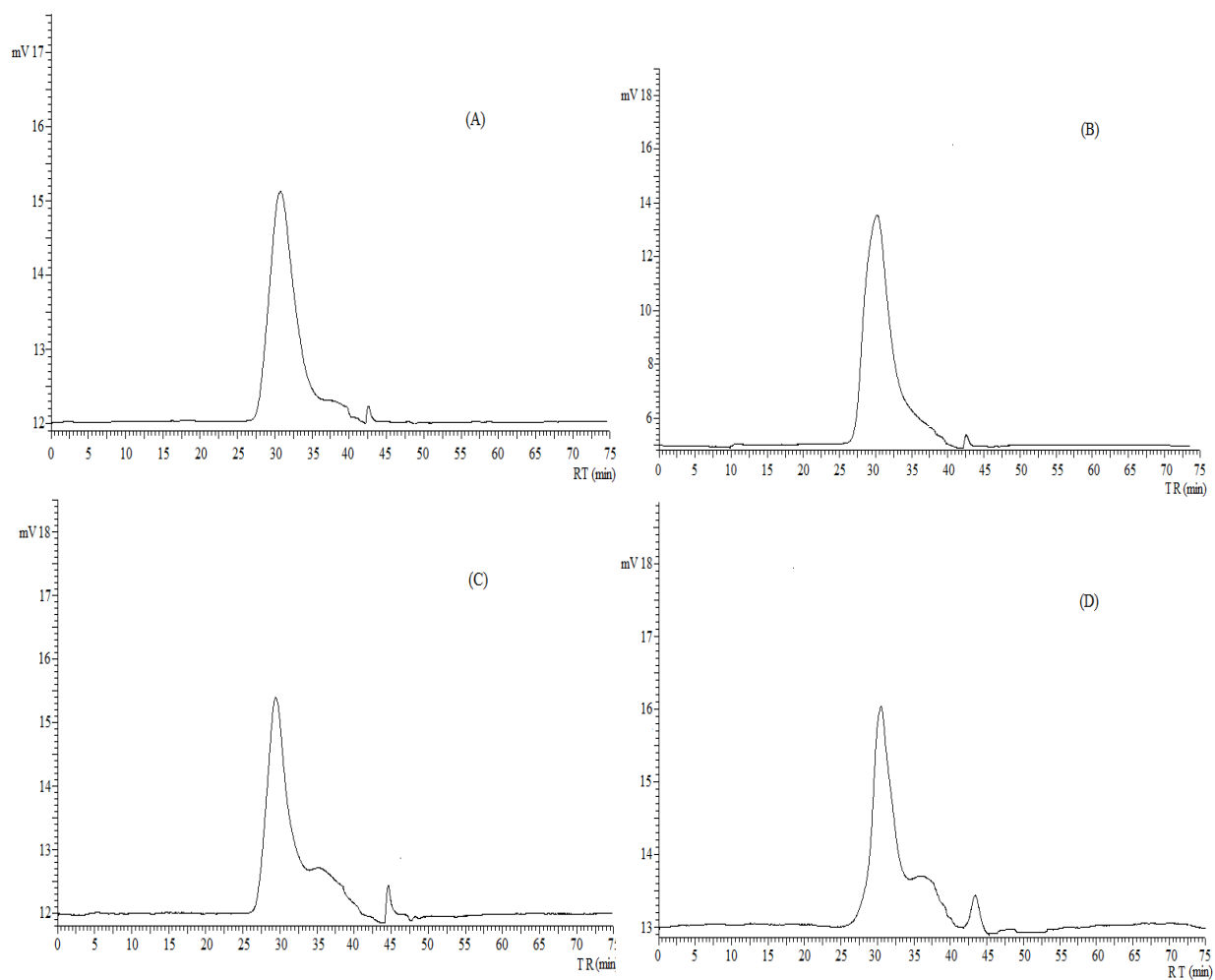


Figura 14: Cromatogramas (GPC CLAE-IR) da distribuição da massa molecular das gomas xantana produzidas por *X. campestris pv. campestris* 254 (A), *X. campestris pv. manihotis* 356 (B), *X. campestris pv. campestris* 472 (C) e *X. campestris pv. cordiae* 510 (D) empregando bagaço de cana como fonte de carbono e de nutrientes.

A análise de comparação das médias mostrou que as gomas xantana com as maiores massas moleculares ponderadas foram produzidas pela cepa de *Xanthomonas* 254 (352,09 kDa) e 472 (354,98 kDa), sem diferença significativa ($p < 0,05$) entre si, sendo aproximadamente 13 e 7 % maiores do que os obtidos com as cepas *Xanthomonas* 356 (310,08 kDa) e *Xanthomonas* 510 (330,42 kDa), respectivamente. Além disso, o maior valor de massa molecular da goma xantana produzida com sacarose foi alcançado com a utilização da *Xanthomonas* 472 (362,34 kDa), que foi apenas cerca de 2% maior do que as obtidas a partir do bagaço de cana-de-açúcar por *Xanthomonas* 472 (354,98 kDa) e 254 (352,09 kDa). Os dados da Tabela 7 permite ainda concluir que os dados de massa molecular ponderada (MM) apresentam correlação inversamente proporcional de 81,07 % com os dados de viscosidade aparentes das gomas xantana obtidas de sacarose e, de 87,10 % para as oriundas de bagaço de cana-de-açúcar, Tabela 8.

Galindo et al. (1994) reportaram que elevada massa molecular da goma xantana e a estrutura terciária conferem a solução aquosa deste polissacarídeo a propriedade de ser mais ou menos viscosa. Neste estudo a goma xantana com os mais baixos valores de Tr (maior massa molecular média) foi obtida com a cepa 472 utilizando a sacarose (362,34 kDa) e a menor massa molecular, com altos valores de Tr, foi obtida com a cepa 356 utilizando o bagaço de cana (310,08 kDa), (Figura 12 e 14, Tabela 8).

Estes resultados permitem inferir que o uso do bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e de nutrientes para o cultivo de *Xanthomonas* 254, representa uma alternativa viável para a obtenção de goma xantana de alta massa molecular, associada a viscosidades superiores, comparada a do biopolímero obtido em meio contendo sacarose (convencional). Contudo, é importante avaliar os efeitos de variáveis como pH, velocidade de agitação e aeração para otimizar o processo, de modo a maximizar as características que conferem qualidade à goma xantana, tornando o biopolímero mais competitivo do que o obtido da fermentação de sacarose (goma xantana comercial).

Os menores Tr foram representados pelas gomas obtidas com 4 % de sacarose e cepa 510 (29,87 minutos) e com 4 % de sacarose e cepa 472 (29,88 minutos), indicando que a massa molecular média das xantanas produzidas foram as maiores (~362,34 kDa com a cepa 472). Um comportamento análogo foi observado com gomas obtidas com bagaço de cana de açúcar, onde o menor tempo foi obtido com a goma 4 % bagaço de cana 472 (29,90 minuto uma massa molecular de aproximadamente 354,98 kDa), (Figuras 12 e 14, Tabela 8).

Tabela 8: Tempo de retenção (Tr), massas moleculares médias (MM), limites inferiores de massas moleculares (LIMM) e limites superiores de massas moleculares (LSMM) de gomas xantana produzidas a partir da fonte de carbono convencional (sacarose) e alternativa (bagaço de cana).

	Linhagens de <i>Xanthomonas</i>	Tr (min)			MM (kDa)			
		máximo	ponderado	Mínimo	LIMM	MM	LSMM	
Goma Xantana	Sacarose ¹	254	31,02	29,96	29,63	7,09 ^a	343,54 ^a	1648,99 ^a
		356	31,77	30,03	29,63	4,33 ^b	326,38 ^b	3079,49 ^b
		472	31,14	29,88	29,61	1,77 ^c	362,34 ^c	876,89 ^c
		510	30,87	29,87	29,58	1,83 ^c	354,99 ^d	1648,99 ^a
	Sigma	31,16	30,03	29,71	1,05	327,05	1707,22	
	Bagaço ²	254	31,14	30,11	29,74	7,87 ^a	352,09 ^a	2813,83 ^a
		356	31,08	29,94	29,90	11,94 ^b	310,08 ^b	3792,27 ^b
		472	31,07	29,90	29,62	27,47 ^c	354,98 ^a	3513,54 ^c
510		31,36	30,02	29,63	14,21 ^d	330,42 ^d	1538,43 ^c	

¹ Amostras de GX na concentração de 4% (m/v) utilizando sacarose (SAC) como fonte de carbono com as diferentes linhagens em *Shaker*.

² Amostras de GX na concentração de 4% (m/v) utilizando bagaço (BC) como fonte de carbono com as diferentes linhagens *Shaker*.

Ambas as gomas obtidas pela fermentação tanto do substrato convencional (sacarose), quanto o alternativo (bagaço de cana) apresentaram tempos de retenção menores que a goma xantana Sigma, resultando, portanto em maiores massa molecular. A goma xantana Sigma eluiu em 30,03 minutos e uma massa molecular média (~331,78 kDa), conforme Tabela 8 e Figura 12.

O Limite de Distribuição das Massas Moleculares de um polímero é uma variável importante, uma vez que relaciona-se com várias propriedades físicas, como adesão, resistência, força elástica, fragilidade, permeabilidade a gases. Os limites desta distribuição permite observar que a goma xantana Sigma tem um menor intervalo de LDMM (1,05-1707,22 x 10³ Da) enquanto que as demais gomas obtidas com os diferentes substratos e diferentes linhagens apresentaram intervalos de LDMM (1,83 – 3792,27 x 10³), (Tabela 8). Segundo Pace (1991), as xantanas exibem uma combinação de propriedades que são essenciais para a aplicação. Tais propriedades são determinadas por sua composição química, agrupamentos e ligações moleculares, massa molecular média e sua distribuição.

A massa molecular está diretamente associada às propriedades reológicas da xantana, pois o tamanho das cadeias do polímero e a estrutura terciária conferem à solução aquosa a propriedade de ser viscosa (GALINDO, 1994). Pode ser também influenciada pelo microrganismo produtor e pelas condições operacionais aplicadas

Constata-se as maiores massas moleculares (Tabela 8) para as gomas xantana obtidas com sacarose e a cepa 472 e com bagaço de cana e a cepa 254, justificando a maior viscosidade aparente do biopolímero (Tabela 7). Observa-se que quando menor o tempo de retenção maior é a massa molecular da goma xantana e conseqüentemente a viscosidade aparente aumenta.

Assim como neste trabalho (Tabela 8), Shatwell et al. (1990) mostram a influência de patovares de *Xanthomonas* em relação a massa molecular. Os autores relatam uma variação entre 9000 kDa para o polímero produzido pelo *patovar campestris* 646 kDa e 1270 kDa com o *patovar phaseoli* (1128).

A diferença na massa molecular pode estar influenciada à fatores genéticos inerente a cada cepa de *Xanthomonas*, porém outros fatores, como: concentração do inóculo, agitação, temperatura, pH, tempo de cultivo e nutricionais devido a composição do substrato da fermentação provocam mudanças quantitativas e qualitativas nas gomas sintetizadas (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; GALINDO, 1994), gerando polissacarídeos com diferentes massas moleculares (SUTHERLAND, 1993). Portanto, estas variáveis devem ser minuciosamente avaliadas e definidas com o intuito de gerar um polímero homogêneo e, conseqüentemente, com qualidade reprodutível.

5.2.1.3. Análise Termogravimétrica

A Figura 15 mostra as curvas TGA sobrepostas para as amostras de goma xantana obtida com a fonte de carbono sacarose (A) e as gomas obtidas com o bagaço de cana (B). Na Figura 16 estão relacionadas às DTGA (derivadas) das amostras.

Todas as amostras apresentaram dois eventos térmicos independente do substrato ou cepa. O primeiro evento, a temperaturas inferiores a 120°C, é atribuído à perda de água, ou desidratação. No segundo evento, em temperaturas maiores que 200°C, ocorre à decomposição do biopolímero, e está associado à ruptura das principais ligações de goma xantana. Para as amostras de goma obtidas com a fonte de carbono sacarose e as linhagens *X. campestris pv. campestris* 254 e *X. campestris pv. manihotis* 356 parece existir três eventos térmicos, apesar de que nesta faixa de temperatura (202°C a 356°C) é confirmado pela literatura que acontece apenas a degradação do polissacarídeo, logo pode ser um evento conjugado. Esse fato pode estar relacionado à linhagem utilizada e a sua influencia no polímero obtido. Para a goma xantana obtida com a fonte alternativa, bagaço-de-cana, esse mesmo comportamento aconteceu apenas

com a goma obtida com a linhagem *X. campestris* pv. *cordiae* 510. As percentagens de perda de massa, observados em cada etapa das curvas de TGAA das amostras de goma obtida com sacarose e bagaço de cana podem ser vistos na Tabela 9.

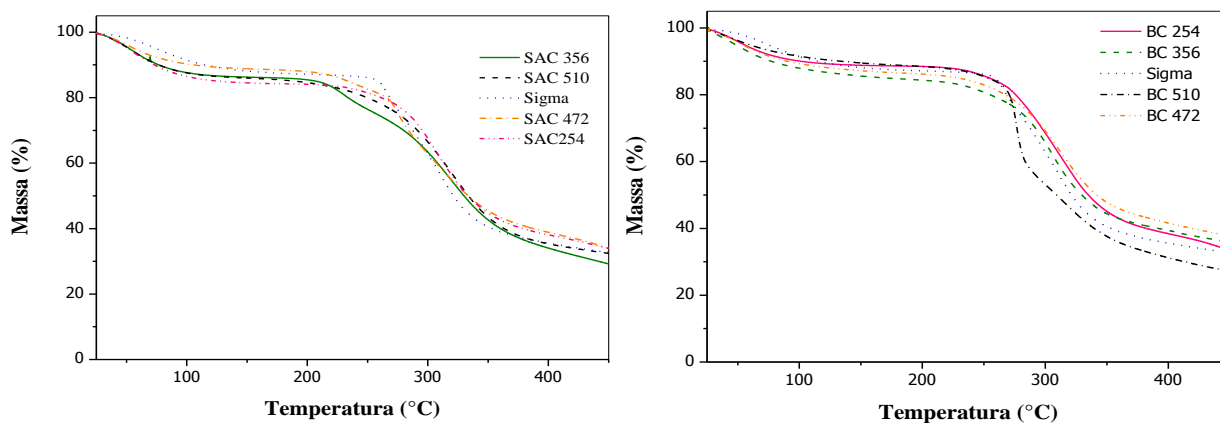


Figura 15: Curvas de TGA de gomas xantana obtidas por *X. campestris* a partir de sacarose (SAC), bagaço de cana (BC) comparados a goma xantana Sigma.

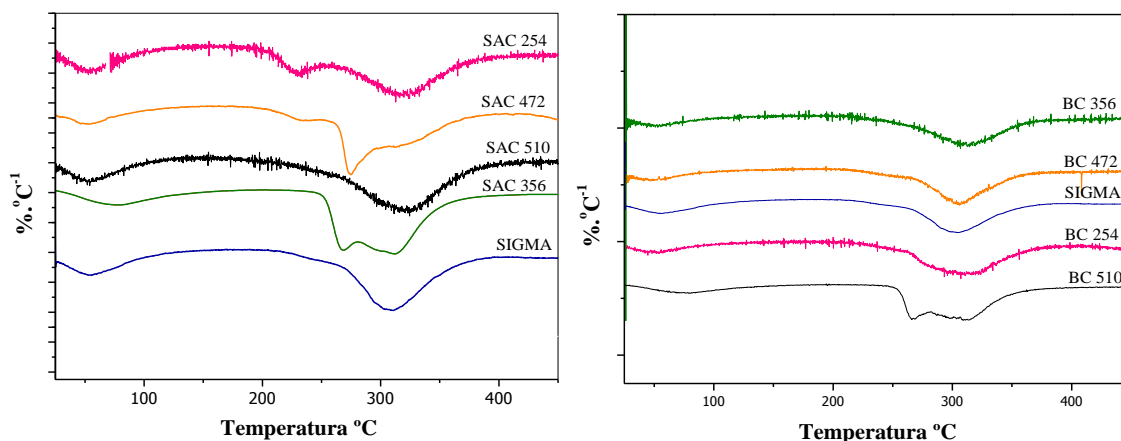


Figura 16: Curvas de DTGA de gomas xantana obtidas por *X. campestris* a partir de sacarose (SAC), bagaço de cana (BC) comparados a goma xantana Sigma.

De acordo com Faria et al (2011) a absorção de água pela goma de xantana é devido à presença de grupos polares na estrutura, especialmente OH. A presença de água em polímeros liofilizados pode estar associada com a rápida absorção de umidade durante a pesagem das amostras, uma vez que o processo de liofilização aumenta o caráter higroscópico do polímero.

Tabela 9: Eventos térmicos e porcentagens de perda de massa (Δm) referentes às gomas obtidas com as diferentes linhagens com a sacarose, bagaço de cana e a goma xantana padrão (Sigma).

		1° Evento	2° Evento/Eventos Conjugados	Resíduo à 500°C
		Δm_1 (%)	Δm_2 (%) / T_{onset}	%
Sacarose	Sigma	12,65%/28,4°C	57,42%/255,80°C	29,93
	356	13,16%/26,2°C	54,36%/249,44°C	32,48
	472	11,63%/27,0°C	55,2%/231,47°C	33,17
	254	15,0%/25,7°C	49,0%/207,00°C	36,00
	510	13,16%/27,0°C	34,84%/252,99°C	52,00
Bagaço	356	14,90%/25,7°C	49,10%/247,10°C	36,00
	472	13,19%/25,9°C	47,68%/251,55°C	39,01
	254	11,21%/27,8°C	55,49%/237,95°C	33,30
	510	11,21%/27,8°C	60,61%/252,08°C	28,18

Ao avaliar a curva de TGAA (Figura 15) da goma xantana Sigma, é possível constatar que a temperatura T_{onset} de goma xantana Sigma, goma xantana obtida com sacarose e bagaço de cana são 255,80°C, 235,22°C e 247,17°C, respectivamente. Isto indica que a xantana padrão é mais estável termicamente, e as gomas xantana obtidas com o bagaço de cana de diferentes linhagens se aproximaram da goma padrão Sigma.

Dados de TGAA de diferentes polissacarídeos, incluindo goma xantana, são relatados como por Zohuriaan e Shokrolahi (2004). Os autores obtiveram, para o primeiro estágio, uma temperatura máxima de perda de massa de 74,6 °C (8,7 %) para a goma de xantana (Aldrich) com um intervalo de temperatura de 30 – 91,3°C. O segundo evento (251,5 - 330,3°C) apresentou temperatura de perda de massa máxima em 290,8°C (41,6%). O estudo termogravimétrico da goma xantana, produzida por Faria et al (2011) a partir do caldo de cana como fonte de carbono, também mostra um único evento de decomposição após a perda de massa inicial referente à remoção da umidade da amostra, com máxima perda (50 %) a 280°C.

A goma xantana obtida a partir da bioconversão do bagaço de cana e de sacarose, e a goma xantana Sigma degradaram em temperaturas entre 200°C a aproximadamente 400°C com perda de massa cerca de 20% a 50% e apresentando uma perda máxima entre 250°C e 350°C. Assim, a goma de xantana obtida com a cepa 510 e sacarose como fonte de carbono mostram estabilidade térmica e comportamento semelhante à goma de xantana Sigma. A goma xantana obtida a partir do bagaço como fonte de carbono apresentou estabilidade térmica maior do que as gomas xantana obtidas com a fonte de carbono sacarose com todas as gomas obtidas a partir das várias

cepas utilizadas 254, 356 e 472, com exceção da cepa 356. Assim, é possível utilizar estas gomas em processos que exigem maiores temperaturas, por exemplo, no processo de extrusão com a função de plastificante para produção de filmes.

5.2.1.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de DSC foi usada para estudar as transições térmicas que ocorrem no decurso do aquecimento, sob uma atmosfera inerte. As curvas de DSC estão apresentadas nas Figuras 17. A partir das curvas de DSC dos polímeros obtidos através da bioconversão das diferentes fontes de carbono utilizadas, é possível observar que as gomas xantana apresentam comportamentos similares quando submetidos às mesmas condições de temperatura. Na Figura 16, observam-se dois eventos: um endotérmico e outro exotérmico. O primeiro evento ocorre na faixa entre 25°C e 150°C e um pico endotérmico a 86°C, referente à perda de água adsorvida, devido à umidade do polímero. O segundo pico, teve início a 250°C e refere-se à degradação do material. Na Figura 17, bagaço de cana como substrato fermentescível, é possível observar dois eventos característicos do perfil de goma xantana encontrado na literatura. O primeiro, variando entre 23,5°C a 164,5°C é referente à remoção da umidade da amostra. O segundo evento tem temperatura de início degradação do polímero em 235°C. Esses dados corroboram com os dados da análise termogravimétrica (Figura 16, Tabela 9).

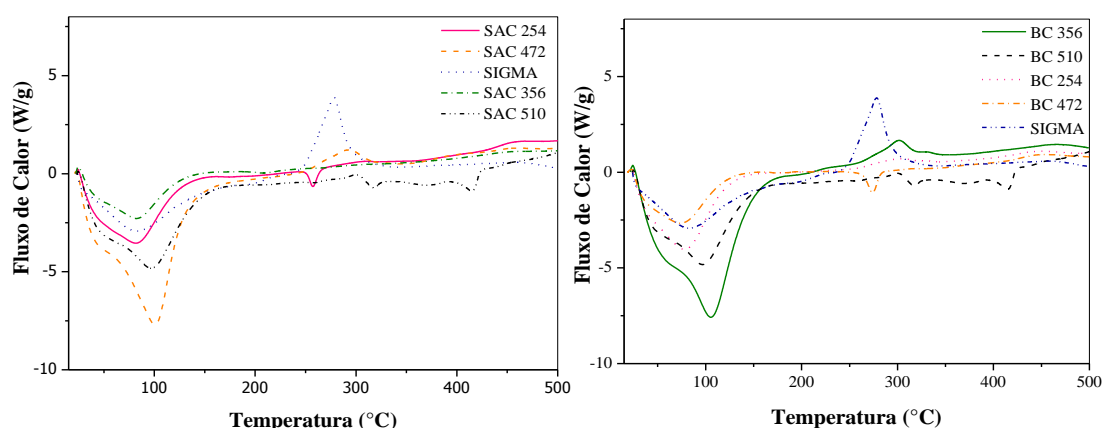


Figura 17: Curvas DSC de gomas xantana obtidas por *X. campestris* a partir de sacarose (SAC), bagaço de cana (BC) comparados a goma xantana Sigma.

A temperatura elevada favorece a hidrólise, que de polissacarídeos (ramificação da goma xantana), por exemplo, pode promover a quebra da ligação glicosídica (C-O),

com ruptura da cadeia principal do polímero e redução da sua massa molar. Essa quebra promove principalmente a redução do tamanho da cadeia polimérica e consequentemente a redução da viscosidade.

Villetti et al (2002) realizaram estudos de DSC a temperaturas acima de 300°C e observaram ainda um evento entre 400°C e 550°C, referente à carbonização da goma xantana. Em 750°C, foi observada a presença de resíduo, ou seja, material inorgânico. O valor de resíduo observado na goma xantana é devido à presença de íons Na⁺ em sua estrutura, tais íons podem formar diferentes compostos inorgânicos durante o processo de degradação (SOARES et al., 2005).

5.2.1.5. *Microscopia Eletrônica de Transmissão*

As micrografias eletrônicas por transmissão da goma xantana Sigma (padrão) é mostrada na Figura 18 (A), a Figura 18 B é da goma xantana obtida pela bioconversão da sacarose (fonte convencional) e a 18 (C e D) da goma xantana obtida com bagaço de cana.

Na micrografia da goma xantana padrão (Figura 18 A), a presença de uma estrutura de rede polimérica pode ser observada, e esta estrutura de rede de polímero é uma característica da goma xantana, como já relatado por LUDIN e HERMANSSON, (1995). Na Figura 18 C e D é possível observar que além da estrutura em rede da goma xantana, a presença de microfibrilas, o que indica a obtenção de goma xantana microfibrilada, mostrando que as bactérias além de converter parcialmente o bagaço de cana em goma xantana, à reduzem em microfibrilas. Isto possivelmente pode estar relacionado ao fato de ter ocorrido a hidrólise parcial do bagaço de cana pelas *Xanthomonas*, resultando na presença de microfibrilas de celulose.

Após visualização das micrografias é possível observar a presença das microfibrilas na estrutura da goma xantana produzida a partir de bagaço de cana de açúcar, efeito não apresentado nas morfologias da goma xantana padrão (Sigma) e a obtida com a fonte convencional sacarose, (Figura 18).

A fim de comprovar a existência de microfibrilas na goma xantana, foi realizada uma nova separação por GPC CLAE-IR até 80 min, a fim de observar o comportamento da amostra em um tempo de corrida maior. Foi obtido um pico em 43 minutos que poderia ser devido a presença de microfibrilas de celulose (Figura 18 B). Com o intuito de confirmar a presença destas microfibrilas foi realizado uma corrida com a celulose

microcristalina comercial (CMC), a qual demonstrou a presença de um pico no mesmo tempo de retenção do segundo pico da solução de goma xantana produzida por bagaço de cana (43 minutos).

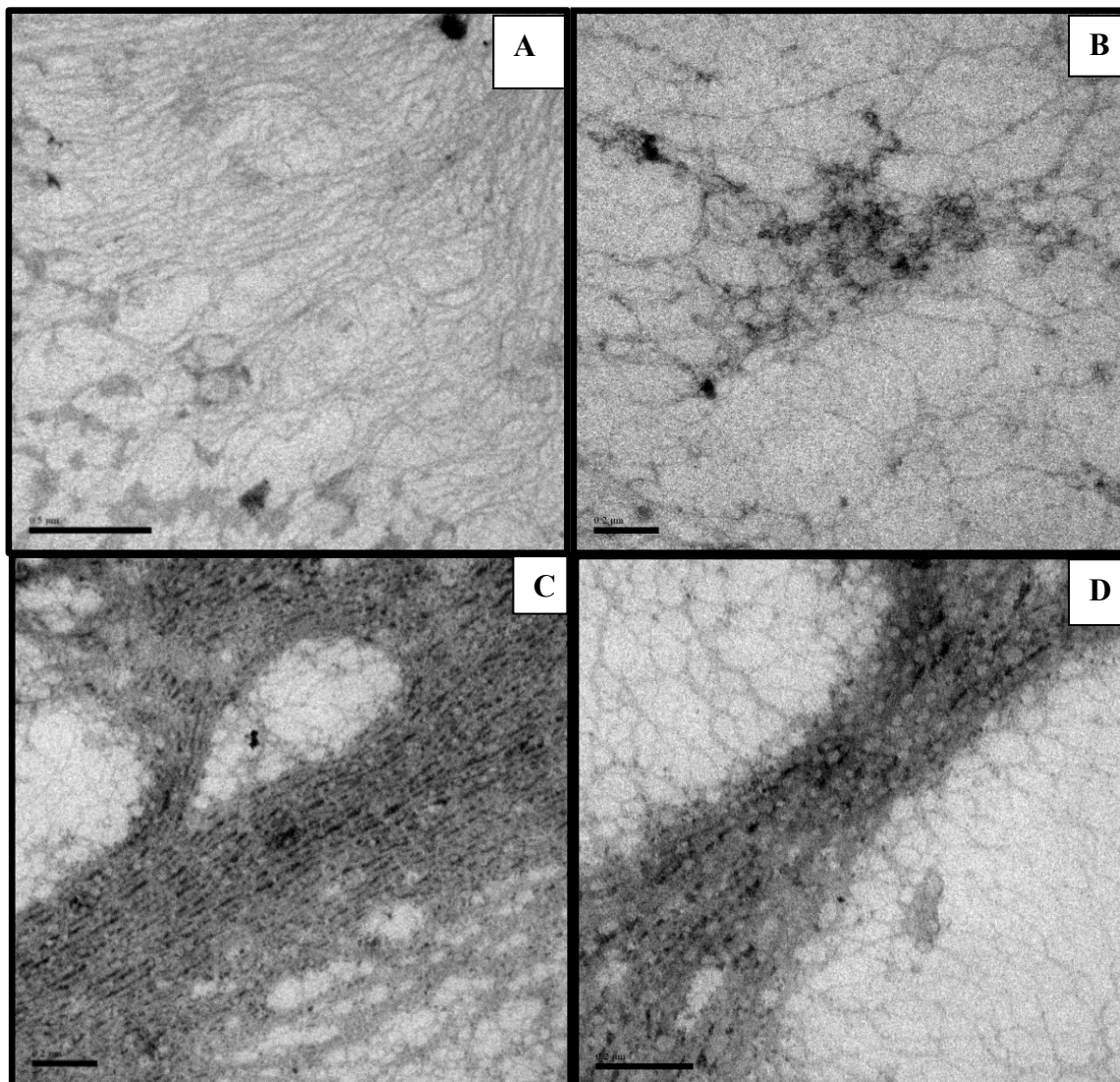


Figura 18: Microscopia eletrônica de transmissão da goma xantana Sigma em 0,5 μm (A), goma xantana obtida pela cepa de *Xanthomonas* 254 com sacarose 0,2 μm (B), e a goma xantana obtida pela cepa de *Xanthomonas* 254 com bagaço 0,2 μm (C e D).

A técnica cromatográfica permitiu a separação dos picos e constatou que há a presença de material fibroso na rede da goma xantana, mas o mesmo não está ligado à estrutura do biopolímero, uma vez que através da técnica de cromatografia líquida conseguiu-se separar os dois picos. A Figura 19 também mostra a micrografia, de uma alíquota do pico de 43 minutos separado pelo coletor de frações do equipamento. As

proporções da amostra injetada é 55,62 % de goma xantana e 44,38 % correspondente às microfibrilas de celulose do bagaço de cana.

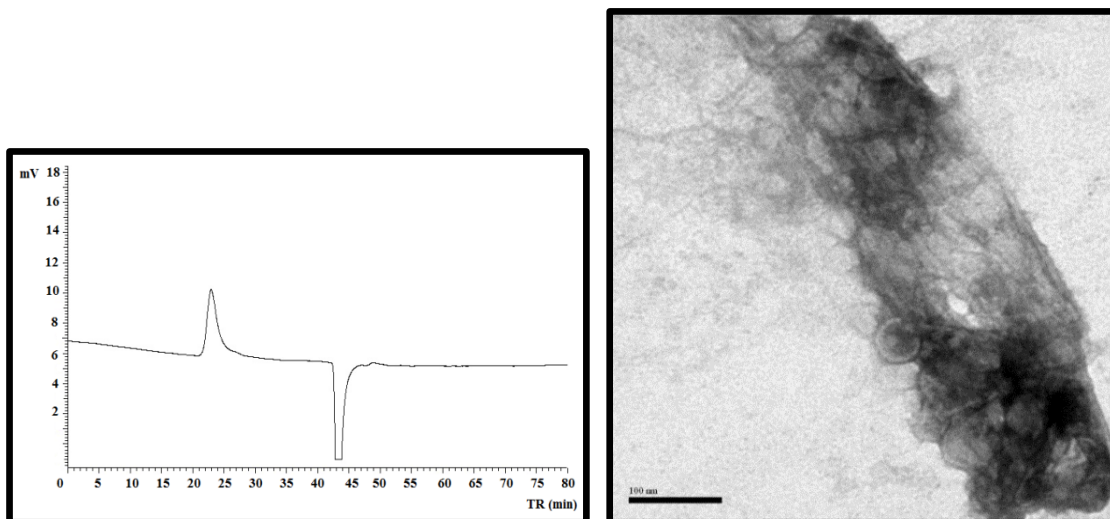


Figura 19: Cromatogramas (CLAE-IR) mostrando a distribuição da massa molecular da goma xantana obtida com bagaço de cana (A), com $Tr = 22,97$ min, e a Microscopia eletrônica de transmissão (B) da fração do segundo pico coletado das microfibrilas de celulose, com $Tr = 43,40$ min, da injeção da goma xantana obtida pela cepa de *Xanthomonas 254* com o bagaço de cana como fonte de carbono em 100nm.

Na morfologia da Figura 19 B observa-se a presença de microfibrilas na sua estrutura. Esta microscopia evidencia os resultados já apresentados, confirmando assim, que as amostras de goma xantana produzidas a partir da fermentação de bagaço de cana com *Xanthomonas* tem a presença de microfibrilas de celulose devido à degradação parcial dos polímeros do resíduo. Com objetivo de testar a capacidade da goma xantana microfibrilada foram formulados filmes de amido de mandioca com a goma xantana obtida a partir do bagaço de cana que serão apresentados no decorrer deste trabalho.

5.4.1.6. Análises de Difração de raios-X (DRX)

A Figura 20 mostra os difratogramas das amostras do bagaço de cana, da goma xantana padrão Sigma, das gomas xantanas obtidas com as diferentes fontes de carbono (bagaço e sacarose) com a linhagem de *Xanthomonas 254*, e da celulose, onde é possível visualizar as intensidades dos picos cristalinos e o halo amorfo das amostras

analisadas. Os picos estreitos representam grande grau de ordenamento estrutural, mostrando assim uma maior cristalinidade.

Quando os raios-X interagem com um material cristalino geram um padrão de difração, sendo que cada componente tem seu padrão, único e representa a sua identidade. Quanto maior o número de cristais de uma estrutura em um plano, mais intensos, pontiagudos e estreitos serão os picos no difratograma. A parcela amorfa gera picos mais largos e menores (BAUMHARDT NETO, 2003).

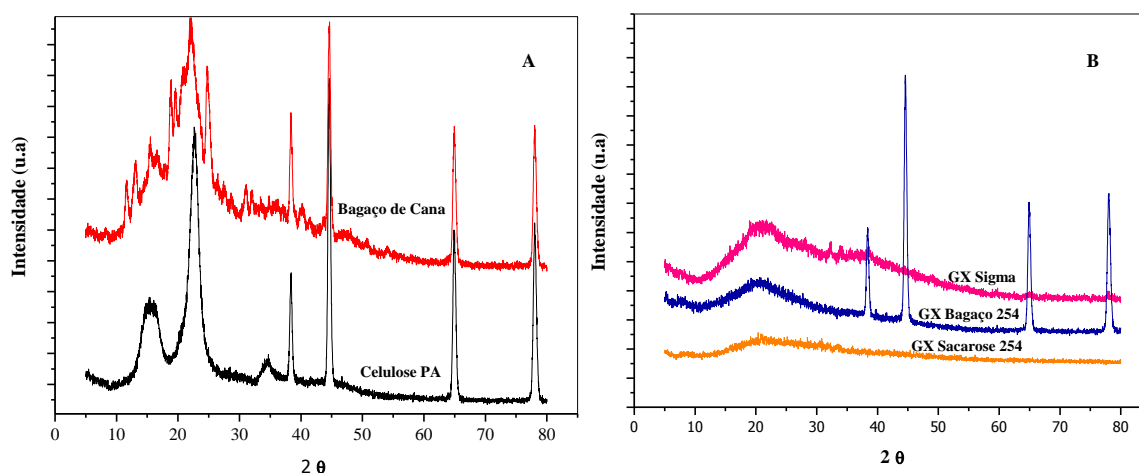


Figura 20: Difratomogramas do bagaço de cana-de-açúcar, goma xantana Sigma, goma xantana obtida com bagaço de cana e a cepa 254, goma xantana obtida com sacarose e a cepa 254 e celulose.

Nesse contexto a análise por difração de raios-X também permite identificar a presença da celulose nas amostras de gomas xantana obtidas com bagaço de cana, o que é atribuído à existência de domínios cristalinos maiores nessas amostras, diferente do que acontece com as amostras de goma xantana obtida com a fonte de carbono sacarose e goma xantana Sigma. Na Tabela 10 estão relacionados os índices de cristalinidade das amostras.

O resultado do DRX mostra que o índice de cristalinidade é maior para a celulose (93,96 %) e menor para a goma xantana Sigma (39,91 %). Os I_c do bagaço, celulose e a goma xantana obtida com o bagaço de cana são numericamente próximos, o que indica que além da goma produzida a partir do bagaço encontra-se a presença impregnada de microfibrilas de celulose.

Tabela 10: Índice de cristalinidade (Ic) do bagaço de cana, da celulose, goma xantana Sigma, gomas xantana obtida com as diferentes fontes de carbono (bagaço de cana e sacarose) e *Xanthomonas* 254.

Amostras	Índice de Cristalinidade (Ic) %
Bagaço de Cana	90,53
Celulose	93,96
Gomas Xantana Sigma	39,91
Goma Xantana Sacarose 254	53,09
Goma Xantana Bagaço 254	92,51

Considerando que nos difratogramas da goma obtida com bagaço, além do biopolímero semicristalino é possível observar picos bem definidos característico da presença de microfibrilas de celulose, levando ao aumento no índice de cristalinidade dessas amostras, corroborando com as micrografias das mesmas, onde também é possível observar as microfibrilas impregnadas no biopolímero produzido (Figura 18 C e D).

5.3. Efeito da variação da concentração de bagaço de cana-de-açúcar na produção e viscosidade da goma xantana pela bactéria selecionada em *Shaker*

Nesta etapa do trabalho foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de bagaço de cana em cultivo submerso empregando a cepa de *X. campestris pv. campestris* 254 na produção de goma xantana. A produção de goma xantana realizada com variação de 2 a 10 % de bagaço de cana no meio minimamente suplementado com 0,01 % de ureia e 0,1 % de fosfato de potássio em *Shaker* (28°C e 250 rpm), pode ser observado na Figura 21.

A produção de goma de xantana variou entre 0,54 g.L⁻¹ a 8,44 g.L⁻¹. A maior produção de goma xantana dentre estas concentrações testadas foi alcançada com a concentração de 4 % de bagaço de cana, resultando em 8,4 g.L⁻¹. Este valor foi de 3,50, 1,89, 2,58 e 15,56 maior do que os obtidos com 2, 6, 8 e 10 % de bagaço de cana. Com um aumento na concentração de bagaço, não favoreceu a produção de goma de xantana.

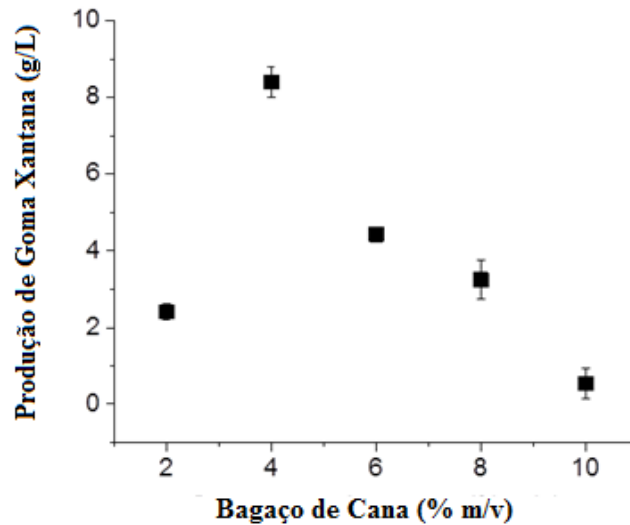


Figura 21: Produção de goma xantana por *X. campestris pv. campestris* 254 empregando diferentes concentrações de bagaço de cana. As barras de variação correspondem a um intervalo de confiança de 95%.

Com 6, 8 e 10% de bagaço de cana, há duas hipóteses que podem explicar a baixa produção. Com uma concentração elevada (10 % de bagaço de cana) o microrganismo não é capaz de produzir enzimas celulolíticas para converter a celulose em glicose, resultando em menor produção de goma xantana. Provavelmente o excesso de fonte de carbono causa limitação do desenvolvimento bacteriano. Por outro lado, a utilização de 2 % do resíduo que resultou na baixa produção, pode estar associado à insuficiência de fonte de carbono.

A sacarose é a principal fonte convencional de carbono estudada para produzir goma xantana. O fato que o meio de cultivo estar diretamente ligado com o custo final do produto, é essencial descobrir fontes alternativas como, por exemplo, o bagaço de cana. Para que o microrganismo metabolize o bagaço como uma fonte de carbono, é necessário que o mesmo degrade esta fonte, o que resulta em um maior gasto de energia.

Farias et al., 2011 avaliou caldo de cana como fonte de carbono para a produção de xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris* NRRL B-1459. Com um rendimento de xantana de 0,58 g·g⁻¹ por quantidade de sacarose e produtividade de 0,63 g.L⁻¹.h⁻¹ foram obtidas 25,0 e 35,0 g.L⁻¹ de goma xantana, respectivamente.

Nery et al. (2013) estudou a fermentação de *X. campestris campestris* 1866 com casca de coco verde como fonte de carbono, com produção de aproximadamente 2 g.L⁻¹

depois de 60 horas de bioprocesso. Assis et al. (2013) produziu goma xantana por fermentação de *X. axonopodis pv. manihotis* 1182 a 28°C, 120 horas e 250 rpm, com produção de 0,65 g.L⁻¹ and 2,40 g.L⁻¹ empregando glicerina e líquido de sisal, respectivamente como fontes de carbono. No entanto, Brandão et al. (2013) utilizando a cepa de *X. campestris mangiferaïndicae* 2103 e glicerina do biodiesel nas mesmas condições que Assis et al. (2013), relatam 7,23 g.L⁻¹ do polissacarídeo. A comparação entre os resultados deste estudo e os citados na literatura mostra que o bagaço de cana é uma fonte adequada para a produção de goma xantana empregando *Xanthomonas*.

Depois de obtida a goma xantana sob uma forma estável é necessário caracterizar o polissacarídeo. Neste sentido, foi possível determinar a viscosidade aparente das gomas nas temperaturas de 25°C, 45°C, 65°C e 85°C em função da taxa de cisalhamento, conforme (Figura 22) para todas as gomas xantana produzidas neste estudo. Em relação à temperatura, todas as viscosidades das gomas xantana diminuíram consideravelmente com o aumento da temperatura.

A pseudoplasticidade de soluções de xantana é afetada pelo tempo e a temperatura da fermentação. Gomas obtidas de processos acima de 55 horas de fermentação possuem altas viscosidades, enquanto que a temperaturas maiores que 28°C, o polímero apresenta baixos teores de acetato e piruvato e menor massa molecular; conseqüentemente, as soluções aquosas terão menores viscosidades. O aumento na concentração inicial de nitrogênio gera goma xantana com viscosidades menores (CASAS et al., 2000), porém, a viscosidade dessas soluções não é influenciada por mudanças de pH entre 1 e 11 (MORRIS, 1984).

Considerando a viscosidade aparente a 25°C e uma taxa de cisalhamento de 25 s⁻¹, (Figura 22 A), os valores deste parâmetro são 160,0 mPa.s, 120 mPa.s, 76,0 mPa.s, 64,0 mPa.s e 43,2 mPa.s para goma xantana produzida com 2 %, 4 %, 6 %, 8 % e 10 % de bagaço de cana, respectivamente. Os resultados mostram que há uma tendência inversamente proporcional entre a concentração de resíduo e a viscosidade aparente de goma xantana ($R^2 = 0,93$).

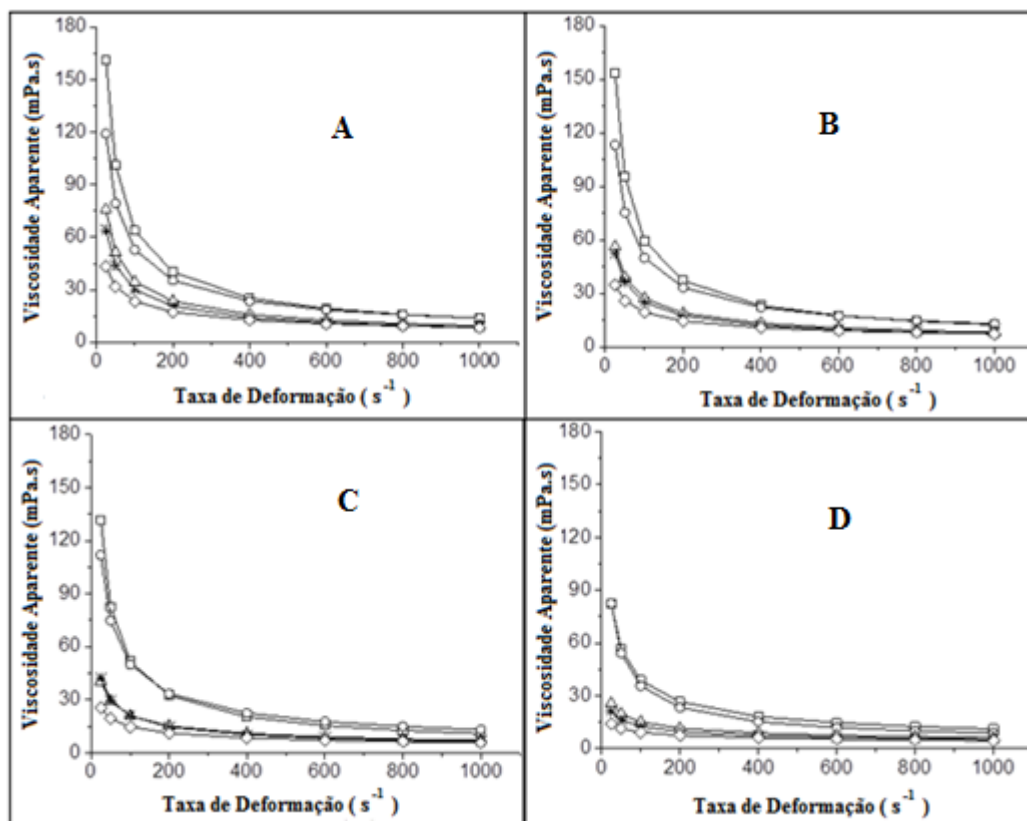


Figura 22: Viscosidade aparente de soluções de goma xantana (0,5% m/v) derivada do bagaço de cana 25°C (A), 45°C (B), 65°C (C) e 85°C (D) em diferentes concentrações de bagaço 2% (□), 4% (○), 6% (△), 8% (*) and 10% (◇).

As viscosidades das soluções aquosas das gomas xantanas a partir da bioconversão do bagaço de cana diminuíram com o aumento da temperatura entre 25°C e 85°C (Figura 22). Essa redução está associada com alterações conformacionais nas moléculas devido à elevação da temperatura, o que gera uma transição conformacional de uma estrutura ordenada rígida a uma estrutura desordenada (MILAS e RINAUDO, 1979; MEDEIROS et al., 2000).

As soluções de xantana sofrem uma transição conformacional de uma estrutura ordenada rígida a uma estrutura desordenada emaranhada por aquecimento a temperaturas acima do ponto de fusão (MEDEIROS et al., 2000).

O comportamento pseudoplástico das gomas xantana em solução aquosa foi confirmada por ajuste dos dados experimentais, pelo modelo de Ostwald-de Waele.

Todas as soluções aquosas de amostras de goma xantana a 0,5% (m/v), obtidas a partir de bagaço de cana, segundo a Equação 2 o coeficiente de correlação (R^2) variou na faixa 0,982-0,999 (Tabela 11). Além disso, o índice de fluxo foi menor do que 1, o que indica um comportamento pseudoplástico pronunciado. Os valores de índice de

consistência variaram de 93,68 a 1560 para as gomas obtidas com o bagaço de cana. Como esperado, a pseudoplasticidade da goma xantana diminuiu com o aumento da temperatura (Tabela 11).

Tabela 11: Parâmetros reológicos (n – índice de fluxo e K – índice de consistência) mostrando a pseudoplasticidade de goma xantana (0,5% m/v, 25 s-1, 25 a 85°C) por *Xanthomonas* 254 e bagaço como substrato.

Parâmetros Reológicos						
T (°C)	2% BC			4% BC		
	n	K	R²	n	K	R²
25	0,407	1560	0,999	0,414	784,52	0,989
45	0,392	1405	0,998	0,409	758,88	0,998
65	0,358	1237	0,999	0,420	723,18	0,999
85	0,554	93,68	0,997	0,392	582,86	0,984
T (°C)	6% BC			8% BC		
	n	K	R²	n	K	R²
25	0,396	1397	0,998	0,375	442,22	0,996
45	0,373	1249	0,998	0,382	388,33	0,996
65	0,394	482	0,991	0,416	299,71	0,995
85	0,460	123,95	0,982	0,512	97,27	0,984
T(°C)	10% BC			GX Sigma		
	n	K	R²	n	K	R²
25	0,292	1316	0,994	0,270	2541	0,989
45	0,307	1046	0,996	0,299	2046	0,999
65	0,356	528	0,996	0,357	1293	0,999
85	0,502	93	0,997	0,429	661	0,993

5.3.1. Caracterização das gomas xantana produzidas com diferentes concentrações de bagaço por *Xanthomonas* 254

5.3.1.1. Massa molecular média de goma xantana

Algumas condições, tais como meio de cultura, as cepas de *Xanthomonas* e as condições operacionais de processo podem afetar a massa molecular da goma xantana que pode variar de 2×10^6 a 20×10^6 Da (GARCÍA-OCHOA, 2000). As massas moleculares médias das gomas xantana obtidas com a variação da concentração de bagaço, presente no meio são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12: Massas Moleculares das gomas xantana produzidas por *Xanthomonas* 254 com meio contendo bagaço em diferentes concentrações.

Bagaço de Cana (%)	Tr (min)			MM (kDa)		
	máximo	ponderado	mínimo	LIMM ¹	MM ²	LSMM ³
2	30,91	30,05	29,61	177,58	321,74	437,52
4	31,14	30,11	29,74	7,89	352,09	2813,83
6	31,06	29,98	29,61	160,29	338,65	439,32
8	31,06	30,03	29,64	160,29	327,05	430,41
10	30,86	29,96	29,69	183,88	344,25	415,67
Sigma	31,16	30,03	29,71	1,05	327,05	1707,20

¹Limite inferior de massa molecular; ²Massa Molecular Média; ³Limite superior de massa molecular

A separação cromatográfica por GPC CLAE-IR (Tabela 12) mostra que a massa molecular média das gomas xantana obtidas a partir da cultura submersa em meio contendo diferentes concentrações de bagaço de cana variou de 321,74 a 352,09 kDa. A maior massa molecular foi produzida no meio contendo 4 % de bagaço de cana (352,09 kDa), seguido por 10 % de bagaço de cana (344,25kDa). Os valores obtidos são superiores aos relatados por García-Ochoa et al., (2000), e mais próximos da goma xantana padrão Sigma. Além disso, como a composição do meio pode influenciar na massa molecular da goma xantana, os resultados relatados no presente trabalho podem ser resultantes da fonte de carbono utilizada para a produção do polissacarídeo. Conforme relatado anteriormente, para utilizar este resíduo o microrganismo desenvolve um percurso metabólico diferente, o que resulta em um polímero com massa molecular diferente, mas mantendo as propriedades do polímero. Esta situação sugere o uso do bagaço de cana como fonte de carbono alternativa para a cultura de *Xanthomonas* 254

representando uma alternativa viável para a obtenção de goma de xantana de elevada massa molecular, em comparação com os biopolímeros obtidos em meio contendo sacarose (convencional).

A variação da concentração do bagaço de cana no meio de *Xanthomonas* exerce grande influência não somente na produção de goma xantana (Figura 21), e na viscosidade (Tabela 11), mas também na massa molecular e na distribuição da massa molecular (Tabela 12).

Diversos estudos têm mostrado a influência da linhagem de *Xanthomonas*, da agitação, da temperatura, sendo observadas variações na massa molecular. Os resultados de Shatwell et al. (1990) relatam valores de variações de $0,9 \times 10^3$ KDa a $1,27 \times 10^3$ KDa, quando utilizadas as linhagem *campestris* 646 e *phaseoli* 1128, respectivamente, pela técnica de espalhamento de luz. A massa molecular determinada pela técnica de viscosidade intrínseca oscilou entre $2,4 \times 10^6$ a $6,3 \times 10^6$ Da para essas cepas, respectivamente.

A massa molecular e a viscosidade dependem da associação entre as moléculas do biopolímero, que por sua vez depende também das cepas que vai realizar a bioconversão do substrato utilizado, a composição do meio de fermentação e as variadas condições de operação usadas no processo fermentação (BRANDÃO et al., 2013).

5.3.1.2. Análises Termogravimétricas

As curvas de TGA/DTGA das gomas xantana produzidas a partir de diferentes concentrações de bagaço de cana como fonte de carbono e demais nutrientes e micronutrientes estão apresentadas na Figura 23. Estas curvas mostram o mecanismo da decomposição térmica das gomas obtidas no bioprocesso. As gomas xantana obtidas com diferentes concentrações de bagaço de cana apresentam curvas termogravimétricas similares, onde se observa três eventos de perda de massa. O primeiro evento acontece numa faixa de temperatura de 29,6 a 181,1°C que é atribuído à desidratação da xantana. A absorção de água pela goma é devido à presença de grupos polares na sua estrutura, especialmente de grupos OH.

O segundo estágio refere-se à decomposição dos biopolímeros entre 222,1°C e 353,7°C (Figura 23). E terceiro estágio entre 484,11°C e 737,95°C, atribuído à decomposição de subprodutos da goma xantana ou substrato não bioconvertido.

Portanto, ao se comparar os valores da curva de TGAA das gomas xantana obtidas com bagaço com goma xantana Sigma, constata-se diferenças. Os valores médios de T_{onset} são de $30,7^{\circ}\text{C}$ e 206°C para as gomas produzidas a partir deste substrato, enquanto que para goma xantana Sigma (T_{onset} igual a $255,80^{\circ}\text{C}$). Isto significa que as gomas xantana obtidas com bagaço de cana-de-açúcar são mais estáveis termicamente quando comparadas a goma xantana Sigma. A Tabela 13 mostra os eventos e as perdas de massas referentes às gomas obtidas com a variação de concentração de bagaço de cana.

Das concentrações de bagaço de cana estudadas pode-se observar que a concentração 8 % resultou goma xantana com menor T_{onset} ($190,91^{\circ}\text{C}$) de degradação do polímero, seguida da goma xantana obtida na concentração de 4 % de bagaço que apresentou T_{onset} (207°C).

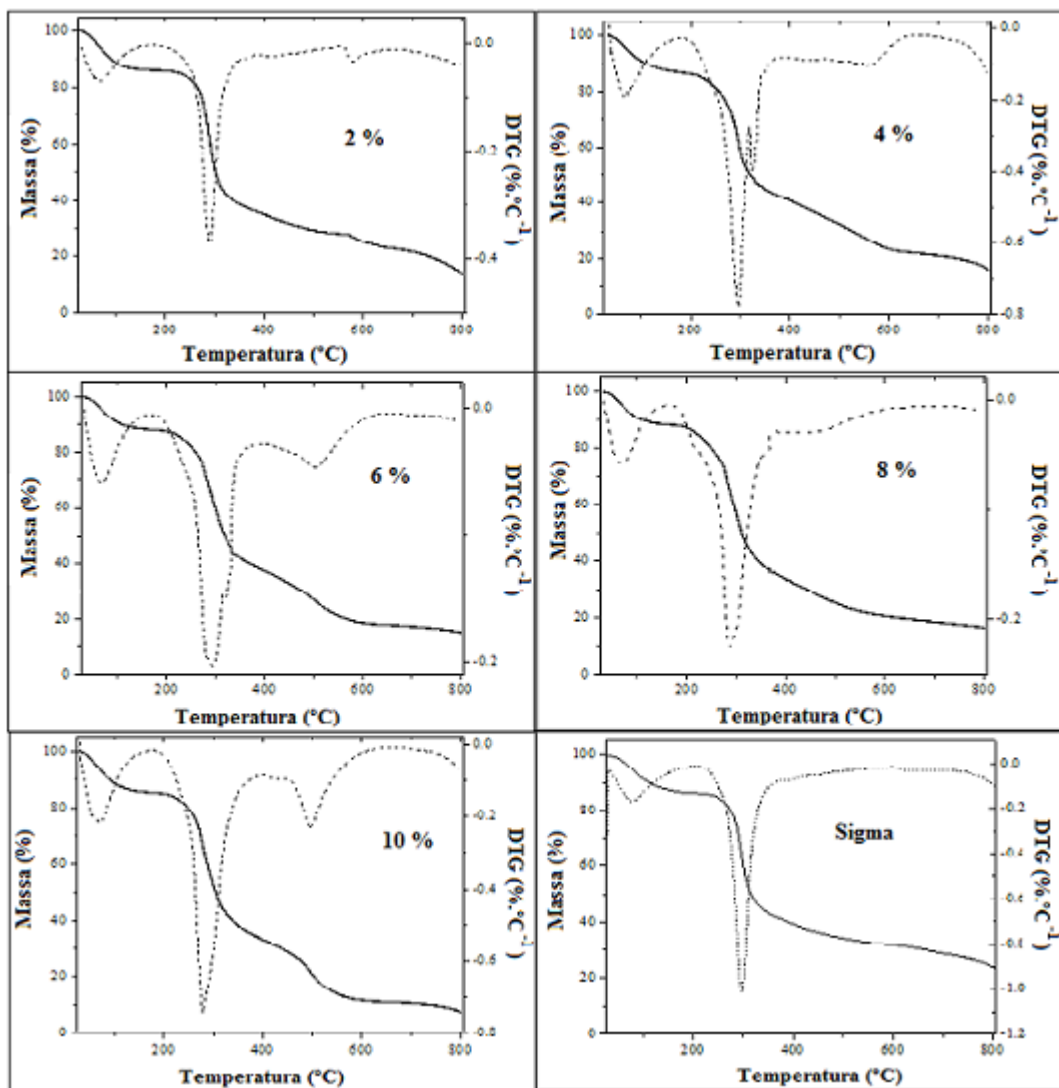


Figura 23: TGA (linha sólida) e DTGA (linha pontilhada) curvas de goma xantana obtidas com diferentes concentrações de bagaço: 2 %; 4 %,6 %; 8 %, 10 % , cepa de *X. campestris* 254 e Sigma.

Tabela 13: Eventos térmicos e porcentagens de perda de massa (Δm) referentes às gomas obtidas com as diferentes concentrações de bagaço de cana.

Bagaço (%)	1° Evento	2° Evento	3° Evento	Resíduo à 800°C
	Δm_1 (%)	Δm_2 (%) / T_{onset}	Δm_3 (%) / T_{onset}	%
2	13,93%/29,24°C	50,34%/214,75°C	6,1%/555,15°C	29,63
4	12,82%/34,22°C	52,79%/207,07°C	16,39%/519°C	18,00
6	13,97%/31,19°C	65,26%/210,92°C	20,15%/409,51°C	20,77
8	13,68%/32,30°C	63,53%/190,91°C	22,80%/390,86°C	22,79
10	15,50%/30,40°C	67,37%/210,19°C	20,63%/449,33°C	17,13

As demais gomas não apresentaram diferenças notáveis quando comparadas entre si. Os resultados de degradação térmica obtidos nesse estudo podem ser comparados com os dados de gomas xantana produzidas com caldo de cana pela bactéria *Xanthomonas* descritas por Faria et al. (2011). Os autores relatam que a goma xantana resultante apresentou um primeiro evento de perda de massa de 15% entre 30 e 140°C com máxima desidratação a 58°C, enquanto o segundo evento, referente à perda de mais de 40% do polímero, ocorreu entre 220 e 320°C com máxima decomposição em 283°C. Os resultados são similares aos obtidos por goma xantana produzida com bagaço de cana, entretanto os resultados de goma xantana obtida com caldo de cana foram realizados com taxa de aquecimento de 20°C.min⁻¹ sob uma atmosfera de N₂ a um fluxo de 30 mL.min⁻¹ até 600°C.

5.3.1.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 24 mostra o espectro de FTIR da goma xantana padrão Sigma e as gomas xantana obtidas com diferentes concentrações de bagaço. Todas as amostras de gomas xantanas apresentam bandas de absorção em torno de 1.027 cm⁻¹ que podem ser associados com o alongamento dos grupos C-C e C-O e a banda típica de C-H polissacarídeos (HASHEMI et al., 2014). Nos espectros de goma xantana, as bandas de vibração de hidrogênio ligado a O-H e C-H são observadas em 3416 cm⁻¹ e 2902 cm⁻¹, respectivamente (POOJA et al., 2014). Nessa região é comumente encontrada uma banda larga, correspondente à deformação axial de grupos hidroxila de ligações de hidrogênio intermoleculares de polissacarídeo. Absorções a 1.656 cm⁻¹ e 1.438 cm⁻¹ estão relacionados com vibrações de alongamento assimétricas e simétricas de anion carboxílico, que está presente na cadeia lateral do trissacárideo da goma xantana obtida com bagaço de cana e a linhagens 254 (HASHEMI et al., 2014; CAEL e

BLACKWELL, 1974). Independentemente da concentração de substrato (bagaço de cana), a bactéria *Xanthomonas* é capaz de bioconverter o bagaço de cana a goma xantana com os mesmos grupamentos funcionais do biopolímero, semelhantes a goma xantana padrão Sigma.

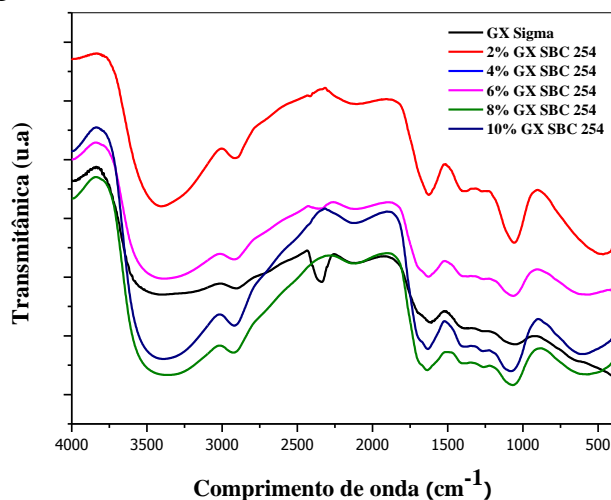


Figura 24: Espectros de FTIR de gomas xantana produzida utilizando diferentes concentrações de bagaço de cana (2%, 4%, 6%, 8% e 10%) e *Xanthomonas* 254 e da goma xantana Sigma (controle).

Os valores máximos de produção de goma xantana obtidos pelas cepas de *Xanthomonas campestris pv campestris* 254 em agitadores orbitais a 28°C, 250 rpm por 120h, foram obtidos com bagaço de cana a 4 % (8,4 g.L⁻¹). Contudo, as máximas viscosidades das soluções aquosas (0,5% m/v, 25°C, 25s-1) dos biopolímeros foram obtidas com o substrato a 2% (160 mPa.s), com comportamento pseudoplástico característico de goma xantana.

A massa molecular média das soluções aquosas das xantanas obtidas com esta cepa a partir de diferentes concentrações de bagaço de cana foram maiores para 4 % (352, 09 kDa) seguida da 10 % (344,25) ambas maiores que a goma xantana Sigma (327, 05), mas sem grande variação nas distribuições destas massas. Portanto, os valores de produção, de viscosidade aparente e massas moleculares das gomas xantana obtidas pela fermentação em batelada do bagaço de cana em agitador orbital foram influenciados pela concentração do substrato alternativo do meio fermentativo.

O perfil da goma xantana padrão e das gomas obtidas com bagaço de cana-de-açúcar pode ser um indicativo de que a bioconversão utilizando o bagaço de cana nas diferentes concentrações é promissora, levando-se em consideração tanto as características de produção dos biopolímero como a qualidade.

5.4. Influência da agitação e aeração nas propriedades de gomas xantana produzidas pela bactéria selecionada com bagaço de cana-de-açúcar em biorreator

Nesta etapa do estudo relata-se a influência das variáveis independentes agitação e aeração do processo de fermentação, nas condições selecionadas: bagaço de cana (4 %) e bactéria *Xanthomonas* 254 em biorreator de 1,5 L, nas respostas produção e viscosidade.

O controle da agitação e a aeração são parâmetros importantes para evitar condições de anaerobiose decorrentes da alta viscosidade do meio devido o aumento da formação do polissacarídeo, visto que a bactéria é estritamente aeróbia. Logo, a combinação adequada destes níveis, deve ser estudada para evitar a limitação na transferência de oxigênio ou condições de estresse hidrodinâmico (CASAS et al., 2000).

A Tabela 14 apresenta a matriz do planejamento fatorial composto de três repetições no ponto central com os valores reais, bem como as respostas produção e viscosidade aparente (0,5% (m/v), 25°C, 25s⁻¹) das gomas xantana obtidas em biorreator de 1,5 L, pela *X. campestris* pv. *campestris* 254 após 72 h de fermentação a 28°C de meio contendo 4 % de bagaço de cana.

Tabela 14: Matriz do planejamento fatorial com as respostas produção de xantana e viscosidade aparente após 72 h de fermentação com a *X. campestris* cepa 254 e 4% de bagaço de cana em biorreator de 1,5 L.

Ensaio	Aeração (vvm)	Agitação (rpm)	Produção (g.L ⁻¹) ¹	Viscosidade 25°C, 25 s ⁻¹ , 0,5% (mPa.s) ²
1	1,0	200	0,88	14,53
2	3,0	200	0,47	13,68
3	1,0	700	7,62	123,80
4	3,0	700	4,13	102,51
5	2,0	96	0,92	12,27
6	2,0	803	3,76	100,58
7	0,6	450	2,52	43,40
8	1,0	450	1,09	43,22
9*	2,0	450	1,60	45,92
10*	2,0	450	1,48	49,68
11*	2,0	450	1,71	35,17

¹ 4,0 % substrato bagaço de cana, 28°C, 72 h; ² 0,5% (m/v), 25°C, 25s⁻¹; Todos os ensaios foram realizados utilizando 4% de bagaço de cana como fonte de carbono suplementado com 0,01% de uréia e 0,1% de K₂HPO₄. *Pontos centrais

A variação das variáveis independentes aeração (1,0 a 3,0 vvm) e agitação (200 a 700 rpm) exercem grande influência na produção de goma xantana, com variação de 0,47 a 7,62 g.L⁻¹ (Tabela 14) da produção.

A maior produção de goma xantana foi obtida no Ensaio 3 (7,62 g.L⁻¹), com as seguintes condições de processo: 4,0% bagaço, 1,0 vvm e 700 rpm, conforme demonstrado na Tabela 14. A segunda maior produção de goma foi obtida pelo Ensaio 4 (3,0 vvm e 700 rpm) com 4,13 g. L⁻¹, seguidas do Ensaio 6 (2,0 vvm e 803 rpm) com produção de 3,76 g.L⁻¹ e do Ensaio 7 (0,6 vvm e 450 rpm) com produção de 2,52 g.L⁻¹, todas utilizando a concentração de 4% de bagaço de cana no meio de cultivo.

Ao passar da escala de *Shaker* (4 % bagaço de cana, 28°C, 250 rpm e 120 h), que resulta na produção 8,54 g.L⁻¹ e viscosidade de 120,30 mPa.s (25°C, 25 s⁻¹, 0,5 % goma xantana) para biorreator 1,5 L (4 % de bagaço de cana, 1,0 vvm e 700 rpm, 72 h) onde observa-se uma produção máxima de 7,62 g.L⁻¹ e viscosidade de 123,80 mPa.s, constata-se proximidade nestas respostas independente portanto do volume e condições de cada processo. No entanto, temos que levar em consideração que a transferência de massa em *Shaker* não é tão favorecida quanto em biorreator.

A produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 a partir de sacarose, em diferentes velocidades de agitação (100, 300, 500 e 800 rpm) com fluxo de ar de 1,0 vvm num volume de 1,5 L, foi testada por Casas et al. (2000). Os autores relatam que a 100 rpm (~4,0 g.L⁻¹) e 800 rpm (~2,5 g.L⁻¹) houve baixas produções de xantana, sendo a máxima produção também alcançada a 500 rpm (16 g.L⁻¹). Papagianni et al. (2001) avaliaram a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* ATCC 1395, em 100, 200, 300, 400, 600 e 800 rpm com 1,0 vvm em 1,0 L de meio contendo glicose. Nesse estudo, a produção de goma xantana quase dobrou quando a velocidade de agitação foi aumentada de 100 (3,0 g.L⁻¹) para 600 rpm (6,3 g.L⁻¹). Psomas et al. (2007) estudaram a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* ATCC 33913, com a agitação de 100 a 600 rpm, temperatura entre 25 e 35, fluxo de 10 vvm em 2,0 L de meio também contendo glicose, com máxima produção à 600 rpm (6,9 g.L⁻¹).

Com o objetivo de verificar a qualidade das xantanas produzidas nos onze ensaios, as gomas foram primeiramente dialisadas em membranas semi permeáveis de celulose, e após 48 h sob agitação constante, foram liofilizadas. Para verificar a qualidade das gomas xantanas produzidas, foram preparadas soluções aquosas à 0,5% (m/v) do

biopolímero e medidas as viscosidades aparentes, em mPa.s a 25°C e taxa de cisalhamento de 25 s⁻¹.

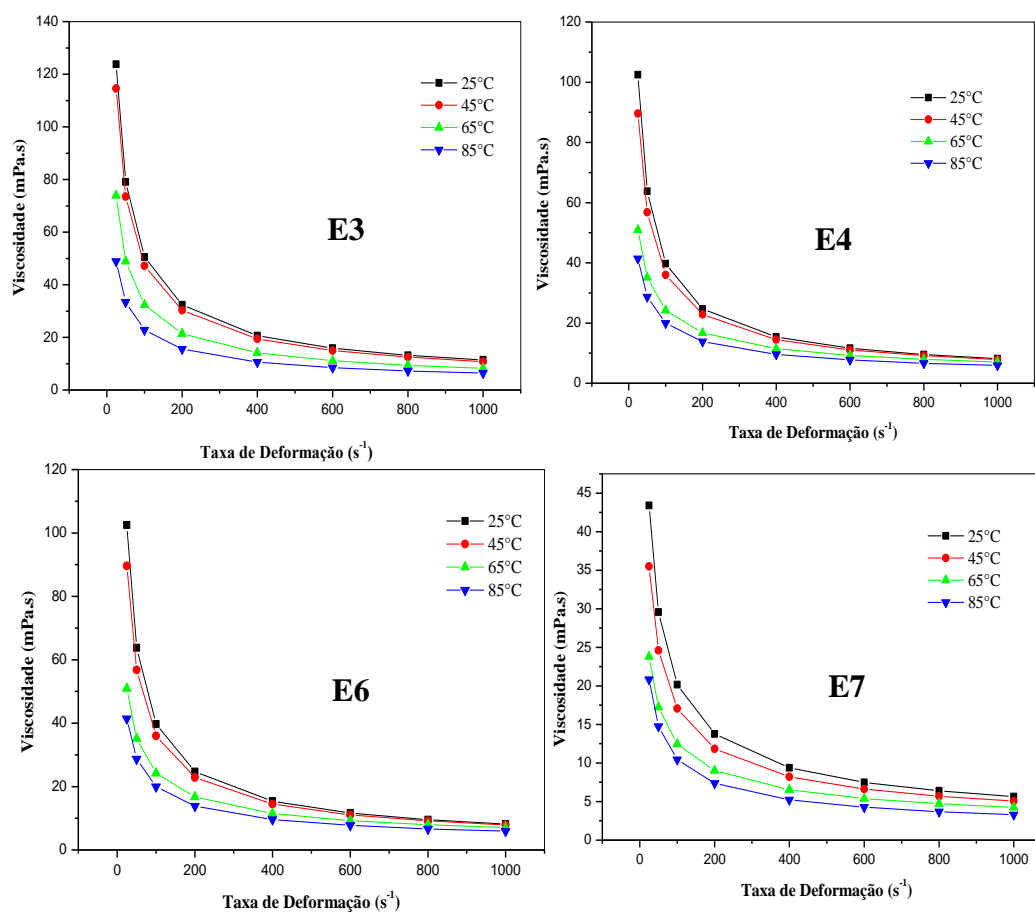


Figura 25: Comportamento da viscosidade aparente das gomas xantanas a 0,5% (m/v), 25°C a 85°C e taxa de cisalhamento de 25 a 1000 s⁻¹ obtidas nos quatro ensaios (E3, E4, E6 e E7) a partir das diferentes combinações de aeração e agitação utilizando bagaço de cana e *X. campestris* 254.

As variações das variáveis independentes aeração e agitação também exercem grande influência na viscosidade aparente das soluções aquosas de goma xantana, com variação de 12,27 a 123, 80 mPa.s, dependendo das condições utilizadas no processo fermentativo (Tabela 15). Pode-se observar que a goma que apresentou maior viscosidade também foi a obtida nas condições do Ensaio 3 (123,80 mPa.s com 3 vvm e 200 rpm), seguida pelo Ensaio 4 (102,51 mPa.s com 3 vvm e 700 rpm), Ensaio 6 (100,58 mPa.s com 2 vvm e 803 rpm) e Ensaio 7 (43,40 mPa.s com 0,6 vvm e 450 rpm).

A diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura destas quatro gomas (E3, E4, E6 e E7) pode ser visualizada na Figura 25, onde há evidência de um comportamento pseudoplástico típico de goma xantana, ou seja, a viscosidade aparente decresce com o aumento da taxa de cisalhamento conforme observado também por Caik et al., 2001; Rao et al., 2003 e Padilha, 2003.

A Figura 25 apresenta também o efeito de diferentes temperaturas (25°C, 45°C, 65°C e 85°C) e taxas de cisalhamento (25s⁻¹ a 1000 s⁻¹) sobre a viscosidade de soluções aquosas de goma xantana obtidas com o bagaço de cana e *X. campestris* 254 nos Ensaio 3, Ensaio 4, Ensaio 6 e Ensaio 7. O efeito do aumento de temperatura de 25°C para 85°C exerce diferentes efeitos nas gomas xantana obtidas nos Ensaio E3, E4, E6 e E7 com diminuição de viscosidade de 60,48%, 59,63%, 61,62% e 51,95%, respectivamente. A partir de 400 s⁻¹ de deformação a temperatura exerce menor influência na viscosidade independente da condição de agitação e aeração usada na produção, (Figura 25).

Tabela 15: Parâmetros reológicos mostrando a pseudoplasticidade da xantana sintetizada pela *Xanthomonas* cepa 254 com bagaço de cana e diferentes condições de agitação e aeração em biorreator (ensaio selecionados).

Parâmetros Reológicos						
T (°C)	Ensaio 3			Ensaio 4		
	n	K	R²	n	K	R²
25	0,354	990,06	0,982	0,315	928,58	0,982
45	0,360	897,58	0,995	0,342	744,01	0,989
65	0,494	502,42	0,999	0,464	286,01	0,995
85	0,449	288,44	0,993	0,473	225,55	0,999
T (°C)	Ensaio 6			Ensaio 7		
	n	K	R²	n	K	R²
25	0,439	290,10	0,996	0,448	256,78	0,997
45	0,459	210,42	0,977	0,472	194,36	0,999
65	0,519	111,71	0,995	0,533	107,02	0,998
85	0,476	101,91	0,985	0,501	103,95	0,986

*Solução aquosa da goma xantana obtida a partir do bagaço de cana nos quatro ensaios (0,5% m/v), 25s⁻¹.

O comportamento pseudoplástico das soluções das gomas dos quatro ensaios selecionados, foi confirmado através do ajuste do modelo de Ostwald-de-Waele aos dados experimentais, a partir da regressão de potência. Os coeficientes de correlação (R²) variaram entre 0,977 e 0,999, mostrando que o modelo pode ser usado na representação do comportamento das soluções de gomas. A pseudoplasticidade indica que o índice de consistência (K) diminui ao aumentar a temperatura, enquanto que o índice de fluxo aumenta com o incremento da temperatura (Tabela 15).

As amostras das soluções de goma xantana obtidas nos Ensaio 3, 4, 6 e 7 se comportaram de acordo com o modelo descrito, com todos os valores dos índices de fluxo (n) menores que a unidade, o que confirma um comportamento pseudoplástico

(Tabela 15). Os valores de índices de fluxo variaram de 0,315 a 0,533 a 25°C a variação de taxa de cisalhamento de 25s⁻¹ a 1000 s⁻¹. O valor do índice de consistência (K) indica o grau de resistência do fluido diante do escoamento; assim, quanto maior o valor de K mais viscoso será o fluido.

As propriedades reológicas são mensuradas como um indicador da qualidade do produto (SCAMPARINI, 1991). As altas tensões de cisalhamento são utilizadas para realizar estudos reológicos das condições do processamento de determinadas soluções ou produtos (SHAW, 1975).

Assim, a análise da viscosidade de soluções aquosas de xantana revela com maior precisão o potencial de aplicação industrial do biopolímero ao determinar a viscosidade aparente de soluções aquosas em baixa concentração (ANTUNES, 2000; RAO, 1999). Na medição da viscosidade, há interferência da estrutura molecular e da concentração de polímero, uma vez que a viscosidade da solução aquosa de uma goma está diretamente relacionada à rigidez da molécula o qual depende, principalmente, das estruturas primária e secundária. Estas propriedades, por sua vez, estão diretamente associadas à cepa produtora e às condições operacionais do processo (BRADSHAW et al., 1983).

Vale salientar que não se pode fazer uma comparação direta com dados da literatura, uma vez que as condições de análise reológica foram diferentes.

Borges (2007) para a caracterização de gomas xantana produzidas por 30 cepas de *X. campestris pv pruni* a 3% (m/v), reômetro Haake, modelo RS150 e sistema placa-placa com sensor PP35Ti, em taxa de deformação de 10 s⁻¹, relata valores de viscosidade entre 1.370 mPa.s à 12.700 mPa.s. Para uma amostra de xantana comercial testada, foi encontrada uma viscosidade 3.400 mPa.s.

Rottava (2005) relata que a viscosidade aparente de gomas obtidas da fermentação em *Shaker* de glicose e sacarose com cepas do presente trabalho, *X. campestris pv. manihotis* (1182), *X. campestris pv. campestris* (254; 607; 729; 1078) e *X. campestris pv. arracaciae* (1198) com viscosidade aparente de 360 mPa.s, 220 mPa.s, 230 mPa.s, 66 mPa.s, 37 mPa.s e 161 mPa.s, respectivamente, para uma taxa de deformação de 10,5s⁻¹.

Os dados de produção de goma xantana e viscosidade aparente (Tabela 16) com a cepa 254 foram tratados estatisticamente, sendo que cada resposta foi avaliada independentemente. O tratamento dos dados obtidos nesse estudo foi realizado utilizando-se o software Statistica 7 produzido pela StatSoft, na qual os resultados dos

ensaios do planejamento fatorial com *X. campestris* 254 foram tratados estatisticamente, sendo que cada resposta foi avaliada independentemente.

O valor do coeficiente “*p*” está ao nível de significância da variável independente sobre a variável resposta em estudo. Sendo assim, pode-se afirmar que, para valores de “*p*” inferiores 0,05, a influência da variável independente é considerada estatisticamente significativa (BARROS NETO et al., 2010).

Para a resposta produção de goma xantana (Tabela 14) foram calculados os coeficientes de regressão, mostrados na Tabela 16, na qual se observa que todas as variáveis (aeração e agitação), bem como suas interações, apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$) sobre a produção de goma xantana.

Tabela 16: Estimativa de efeitos das variáveis independentes agitação e aeração na resposta produção de goma xantana.

Termo	Coefficiente	p – valor
Constante	1,597	0,001
Agitação	1,802	0,000*
Agitação²	0,672	0,005*
Aeração	- 0,740	0,003*
Aeração²	0,404	0,014*
Agitação x Aeração	- 0,770	0,005*

Nota-se na Tabela 14, que para aeração mantida a 1,0 vvm, a alteração da agitação do valor mínimo valor (200 rpm, E1) para o máximo (700 rpm, E3) causou um aumento de 0,88 g.L⁻¹ para 7,62 g.L⁻¹ na produção de goma xantana. O mesmo comportamento ocorreu quando se manteve a aeração em 3,0 vvm com um acréscimo de 0,47 g.L⁻¹ para 4,13 g.L⁻¹ na produção. Por outro lado, a agitação mantida a 200 rpm e a aeração variando de 1,0 para 3,0 vvm, causou uma redução de 0,88 g.L⁻¹ para 0,47 g.L⁻¹ na produção de goma xantana, enquanto a mesma variação da aeração a uma velocidade de 700 rpm, causou uma redução na produção de 7,62 g.L⁻¹ para 4,13 g.L⁻¹. Logo, o uso de elevadas velocidades de agitação e baixas taxas de aeração resulta no acréscimo na produção de xantana.

O sumário da análise de variância para produção de goma xantana (Tabela 17), mostra valor de $R^2 > 0,80$, indicando, portanto, que o modelo foi bem ajustado aos

dados experimentais e que menos de 20 % do total das variações não podem ser explicadas pelo modelo proposto.

Tabela 17: Análise de variância para avaliação estatística do modelo de produção de goma xantana obtidas pela fermentação de bagaço de cana por *Xanthomonas* 254 em bioretator de 1,5 L.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Média Quadrática	F Calculado	F Tabelado
Regressão	35,552	5	11,851	2,804	5,05
Resíduo	8,453	5	4,226		
Falta de Ajuste	8,427		2,808	212,256	19,16
Erro Puro	0,026		0,013		
Total	44,005	10			
R²	0,808				

Resíduo = Falta de ajuste + erro puro. Regressão= Soma dos Efeitos e interações.

De acordo com Barros Neto et al., (2010) o valor de F calculado dever ser de 4 a 5 vezes maior que o F tabelado para o modelo ser preditivo. A predição do modelo deve ser verificada pelo fato do F calculado ser aproximadamente 4,06 vezes maior do que o F tabelado.

Para o modelo de regressão o valor do F calculado foi 1,8 vezes menor que o valor de F tabelado. Portanto, o modelo proposto não é preditivo a 95% de confiança. Assim, as variáveis independentes, não foram suficientes para descrever precisamente a resposta produção, e/ou suas faixas de variação não foram adequadas, sendo possível apenas descrever suas tendências (Tabela 17).

Para a resposta viscosidade das gomas xantana produzidas (Tabela 14) foram calculados os coeficientes de regressão, mostrados na Tabela 18, onde se observa que a variável agitação exerce efeito positivo significativo ($p < 0,05$) na resposta viscosidade.

Tabela 18: Estimativa de efeitos das variáveis independentes agitação e aeração na resposta viscosidade de goma xantana.

Termo	Coefficiente	p – valor
Constante	43,590	0,009
Agitação	40,373	0,004*
Agitação²	9,858	0,009*
Aeração	- 2,799	0,403
Aeração²	3,300	0,407
Agitação x Aeração	-5,110	0,307

Os sinais dos coeficientes da variável agitação ($p < 0,05$) indicam que, ao fixar a aeração em 1,0 vvm e alterar a agitação de 200 (Ensaio 1) para 700 rpm (Ensaio 3), constata-se um aumento de 14,53 mPa.s para 123,80 mPa.s na viscosidade. Fixando a aeração em 3,0 vvm e passando a agitação de 200 rpm (Ensaio 2) para 700 rpm (Ensaio 4), ocorreu um acréscimo de 13,68 mPa.s para 102,51 mPa.s na viscosidade (Tabela 14). Portanto, o aumento da agitação resulta no aumento da produção de goma xantana com maior viscosidade.

O sumário da análise de variância para viscosidade de goma xantana, apresentados na Tabela 19, mostrou o valor de $R^2 = 0,92$, indicando, portanto, que o modelo foi bem ajustado aos dados experimentais e que apenas 8 % do total das variações não podem ser explicadas pelo modelo proposto. Por outro lado, para o modelo de regressão o valor para F calculado foi apenas 1,5 vezes maior que o valor do F tabelado. Portanto, o modelo proposto não é preditivo a 95% de confiança.

Tabela 19: Análise de variância para avaliação estatística do modelo de viscosidade de goma xantana obtidas pela fermentação de bagaço de cana por *Xanthomonas* 254 em bioretator de 1,5 L.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Média Quadrática	F Calculado	F Tabelado
Regressão	13757,18	5	4585,73	7,50	5,05
Resíduo	1222,07	5	611,04	6,52	19,16
Falta de Ajuste	1108,66	0			
Erro Puro	113,41	0			
Total	14979,26	10			
R²	0,92				

Resíduo = Falta de ajuste + erro puro. Regressão= Soma dos Efeitos e interações.

5.4.1. Propriedades das gomas xantana selecionadas (E3, E4, E6 e E7).

5.4.1.1. Massa Molecular

As massas moleculares das amostras de gomas xantana que apresentaram maiores produções (Ensaio 3, 4 6 e 7) depois de dialisadas foram analisadas por GPC CLAE-IR. Soluções aquosas de padrões de dextranas com diferentes massas moleculares foram utilizadas para construção da curva de calibração $R^2 = 0,970$ ($y = -0,301x + 14,56$), conforme (Figura 11).

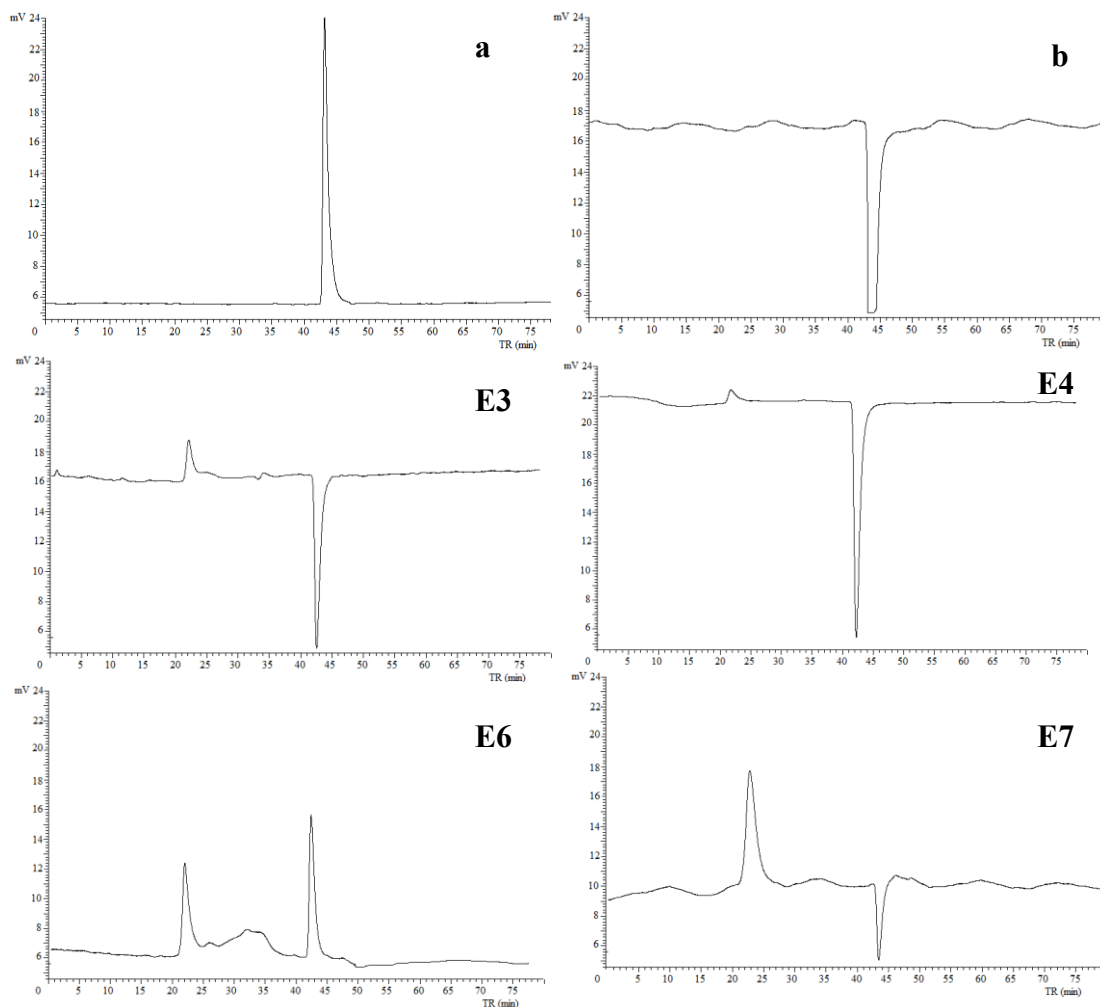


Figura 26: Cromatogramas das separações por GPC CLAE – IR a) nanowhiskrs de bagaço de cana; b) celulose microcristalina (CMC), obtidas nos Ensaios E3; E4; E6 e E7.

As separações das soluções de dextrana de diferentes massas moleculares de 102.000 a 5.900.00 Da. A combinação das variáveis independentes aeração e agitação exerce grande influência na massa molecular das gomas xantana com variação de 14,44 a $73,43 \times 10^6$ kDa, dependendo da condição utilizada no processo fermentativo (Tabela 14), conforme mostrado na Tabela 20.

De acordo coma Figura 26 nota-se que a massa molecular tem relação inversa com o tempo de retenção. Assim, a menor massa molecular foi separada em 44,48 minutos e a maior massa molecular em 22,23 minutos. Porém as gomas xantana obtidas neste trabalho apresentaram Tr menores do que 26,43 minutos, indicando, portanto, massas moleculares muito maiores que $5,9 \times 10^6$ Da (Figura 11, Tabela 20).

Tabela 20: Tempos de retenção (Tr), massas moleculares ponderadas (MM), limites inferiores (LIMM) e superior de massas moleculares, das separações GPC-CLAE-IR de soluções de nanowhiskers de bagaço de cana (NWBC), celulose microcristalina (CMC), e das a gomas xantanas obtidas nos Ensaios E3, E4, E6 e E7.

Amostra	Tr (min)			MM (Da)		
	máximo	ponderado	mínimo	LIMM	MM	LSMM
NWBC	45,17	42,80	42,25	8,95	46,35	67,90
CMC	45,28	43,45	42,37	8,29	29,52	62,47
E3.1 (1vvm;700 rpm)	23,55	22,37	21,72	29,38 x 10 ⁶	66,63 x 10 ⁶	10,46 x 10 ⁷
E3.2 (1vvm;700 rpm)	45,30	42,45	41,82	8,17	59,09	91,51
E4.1 (3vvm; 700rpm)	23,45	22,23	21,35	31,49 x 10 ⁶	73,43 x 10 ⁶	13,52 x 10 ⁷
E4.2 (3vvm; 700rpm)	45,21	42,32	41,43	8,70	64,67	119,95
E6 1 (2vvm; 803 rpm)	24,32	22,37	21,50	17,22 x 10 ⁶	66,63 x 10 ⁶	12,19 x 10 ⁷
E6.2 (2vvm; 803 rpm)	45,00	42,67	41,88	10,06	50,73	87,77
E7.1 (0,6 vvm; 450 rpm)	25,50	22,80	21,07	75,91 x 10 ⁵	49,44 x 10 ⁶	16,42 x 10 ⁷
E7.2 (0,6 vvm; 450 rpm)	45,46	44,48	43,87	7,32	14,44	22,06

Constatou-se que a mudança de escala de *Shaker* para Biorreator promoveu um aumento da massa molecular de aproximadamente 300 x 10³ Da para 66,631 x 10⁶ Da e variação de viscosidade de 120,30 mPa.s para 123,80 mPa.s. No Ensaio E7 baixas aeração e agitação resultam em goma xantana de menor massa molecular. As maiores aeração (E3 = 3 vvm) e agitação (E6 = 803 rpm) parece exercer a mesma influência na massa molecular, superiores a condição E7.

Vale ressaltar que na condição E3 foram obtidos as maiores produções de goma xantana associadas à maior viscosidade (Tabela 15). Portanto condições intermediárias de agitação e aeração (E4 = 3 vvm e 700 rpm) resulta em goma xantana de maior massa molecular, e produção intermediária de goma xantana e viscosidade.

Casas et al. (2000) relatam dois efeitos com o aumento da velocidade de agitação: aumento na taxa de transferência de massa de oxigênio e também um dano nas células. Nas maiores velocidades (800 rpm/min) o crescimento celular e a produção de goma xantana são menores, provavelmente devido ao dano celular por “stress” hidrodinâmico; e em velocidades baixas (100 rpm/min) também se observou baixo crescimento de biomassa e produção de goma xantana, devido à limitação na transferência de oxigênio. Para esse estudo foi utilizado um biorreator de 1,5 L, e a produção de goma xantana, alcançou um máximo quando a velocidade de agitação foi fixada em 700 rpm/min. Em velocidades de agitação mais baixas ocorre limitação de oxigênio, resultando em um decréscimo da massa molecular média, e também em um decréscimo nos parâmetros reológicos (Tabelas 16 e 21).

A aeração fornece oxigênio aos microrganismos, para que possam exercer as atividades metabólicas e também a manutenção em suspensão. A agitação permite regulação da transferência adequada de oxigênio tanto para a reprodução celular quanto para o acúmulo do polímero. Portanto, a agitação não apenas é importante na produção de células, mas também tem influência na formação do produto, sendo por isso essencial o controle da agitação (PAPAGIANNI et al., 2001).

Papagianni et al. (2001) observaram que o aumento do nível de agitação, resulta em níveis de produção de goma xantana. Nesse estudo, a produção de goma xantana aumentou quando a velocidade de agitação foi aumentada de 200 para 700 rpm, passando de 0,88 g.L⁻¹ para 7,62 g.L⁻¹.

A massa molecular não influenciou pela velocidade de agitação (100 – 600 rpm); de acordo com os resultados de CLAE, ficaram em redor de 500 kDa (PAPAGIANNI et al., 2001). A massa molecular da goma xantana é crítico para a viscosidade intrínseca e para as propriedades espessantes do polímero.

5.4.1.2. Composição Química das gomas xantana selecionadas

Com o objetivo de caracterizar os monossacarídeos que compõem o polímero das gomas sintetizadas, após hidrólise ácida, realizou-se a separação destes monômeros por CLAE- IR (Figuras 27 e 28).

A composição monomérica da goma xantana é fundamental para sua funcionalidade e aplicação. As gomas de interesse comercial devem ser capazes de formar estruturas secundárias, terciárias e, às vezes, quaternárias em meio aquoso (MORRIS, 1976).

As equações das retas e os valores de R^2 obtidos para as curvas de calibração construídas com as áreas dos picos de padrões dos monossacarídeos (glicose, manose, ácido glucurônico e ácido pirúvico) *versus* concentração (mg.L^{-1}), estão na Tabela 21.

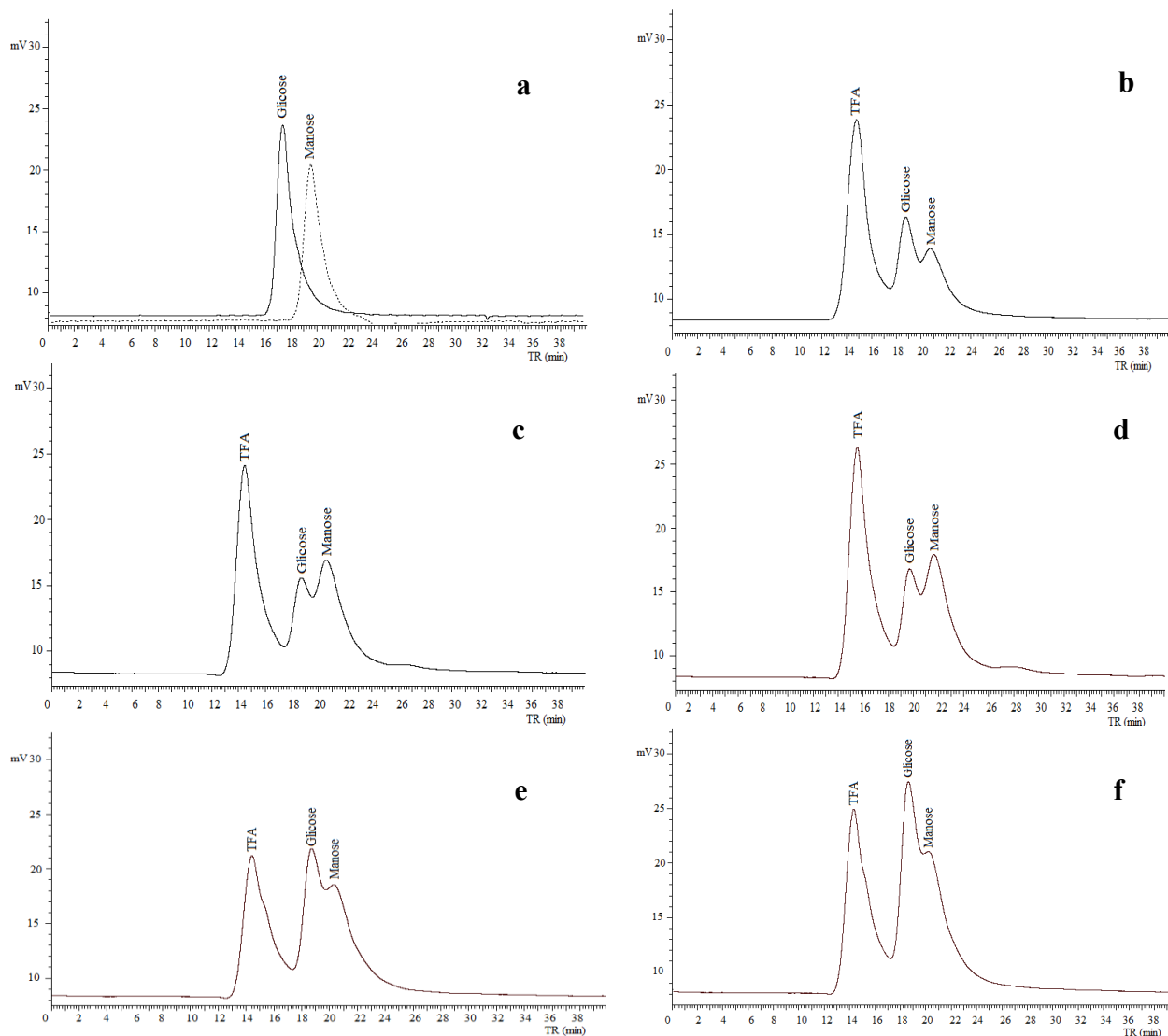


Figura 27: Cromatogramas CLAE-IR de padrões de glicose e manose; b) goma xantana Sigma; c) Gomas xantana obtidas nos ensaios E3; d) E4; d) E6; e) E7.

Tabela 21: Equação da reta e R^2 obtidos para as diferentes curvas de calibração dos padrões de açúcares e ácidos urônicos separados por CLAE-IR.

Monossacarídeos	Equação da Reta	R^2
Glicose	$y = 64068x$ (área do pico) - 3502	0,99
Manose	$y = 64015x$ (área do pico) - 2057	0,99
Ácido Glucurônico	$y = 1437x$ (área do pico) - 1726	0,99
Ácido Pirúvico	$y = 13209x$ (área do pico) - 13508	0,99

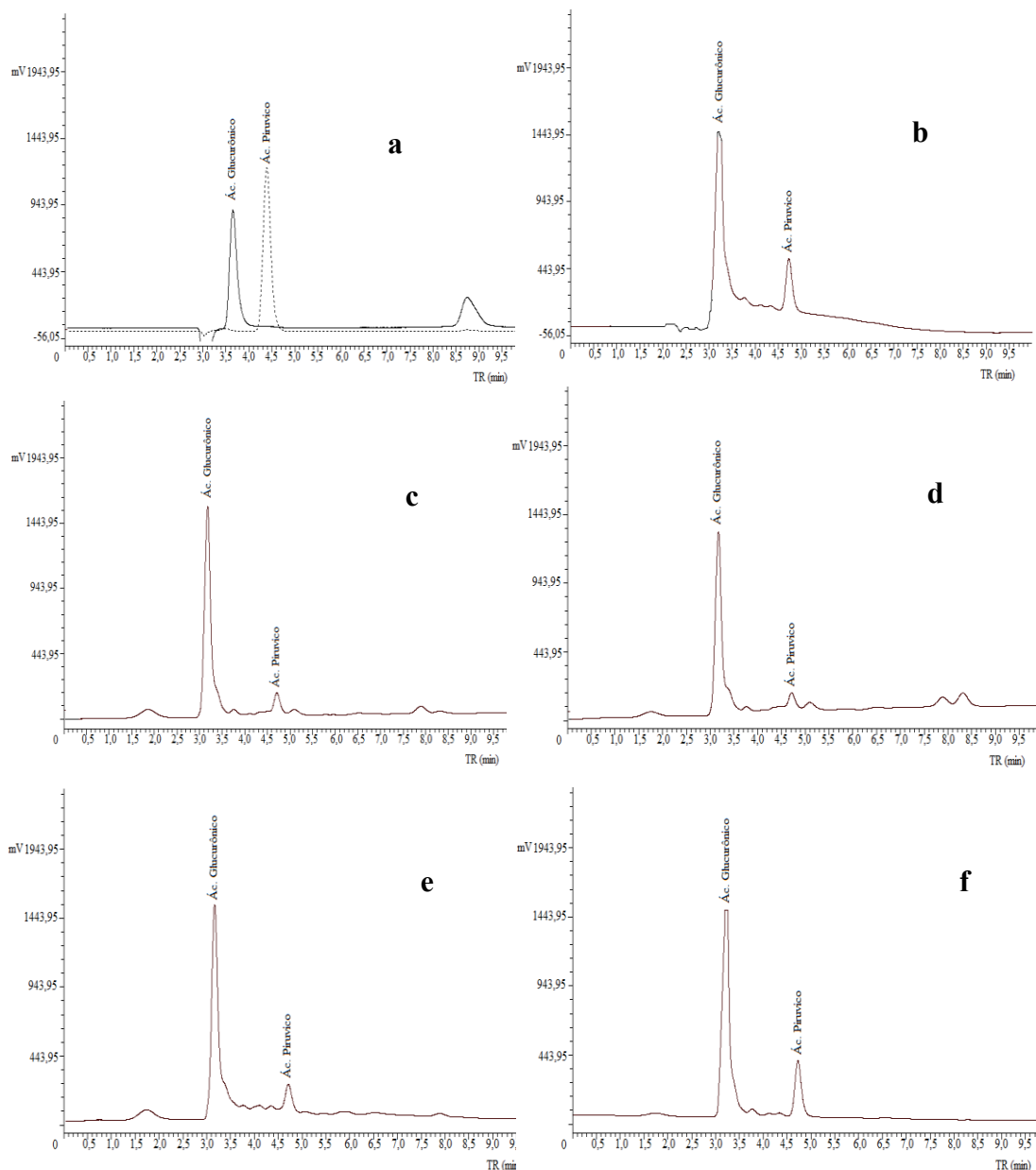


Figura 28: Cromatogramas CLAE-IR de a) padrões de ácido glucurônico e ácido pirúvico; b) goma xantana Sigma; c) e Gomas xantana obtidas nos ensaios E3; d) E4; e) E6; f) E7.

As percentagens dos teores de glicose, manose, ácido glucurônico e ácido pirúvico dos quatro ensaios em biorreator de 1,5 L estão apresentados na Tabela 22. A variação do valor de aeração e de agitação exerce influência na composição química da goma xantana obtida da fermentação de bagaço de cana por *Xanthomonas campestris* 254.

Tabela 22: Concentração dos açúcares e ácidos urônicos das gomas sintetizadas com a cepa 254 e bagaço de cana nos ensaios E3, E4, E6 e E7.

Ensaio	Glicose (%)	Manose (%)	Ácido Glucurônico (%)	Ácido Pirúvico (%)
E3 (1 vvm; 700 rpm)	96,17	3,43	0,34	0,06
E4 (3 vvm; 700 rpm)	28,12	71,81	0,06	0,01
E6 (2 vvm; 803 rpm)	85,97	13,93	0,02	0,08
E7 (0,6 vvm; 450rpm)	95,66	4,09	0,18	0,07
Sigma	70,78	29,07	0,10	0,05

Em todos os Ensaios selecionados E3, E4, E6 e E7 foram identificados glicose, manose, ácido glucurônico e ácido pirúvico nos biopolímero obtidos. A condição de aeração e agitação que resultou a maior produção de goma xantana e maior viscosidade (E3, Tabela 14) conduziu a biossíntese de um polímero com alto teor de glicose enquanto que as condições do E4 (3 vvm; 700 rpm) conduziram a formação de polímero com maior teor de manose (Tabela 22).

Os maiores teores de glicose, em torno de 96%, foram encontrados nas gomas xantana sintetizadas sob taxa de aeração igual ou inferior a 1,0 vvm (Ensaios 3 e 7), que são cerca de 17% maior que o teor de glicose encontrado para a goma xantana Sigma (79,78%). Seguidas pelas gomas xantana produzidas sob 2,0 vvm (85,97%) e sob 3,0 vvm (28,12%). A porcentagem máxima de manose (71,81%) foi encontrada na goma xantana sintetizada nos níveis máximos de aeração (3,0 vvm) e agitação (700 rpm), aproximadamente 60% maior do que a goma xantana Sigma.

As amostras analisadas, apresentaram, em geral, baixas concentrações de ácidos glucurônico e pirúvico (< 0,1 %). O grau de piruvação pode ter uma importante influência na efetividade de certas aplicações. A aplicação da goma xantana para melhorar a recuperação de óleo pode depender principalmente do grau de piruvação, devido à precipitação da goma xantana ou adsorção no solo (BRANDFORD e BAIRD, 1983).

Segundo Padilha, (2003), esta composição é a mais comumente encontrada na goma xantana, uma vez que os polímeros produzidos pelas cepas 289 e CA110 apresentaram a mesma composição de monossacarídeos.

Peters et al. (1989) demonstram que existe uma forte relação entre a demanda microbiológica de oxigênio e o grau de piruvação. A limitação de oxigênio, utilizado no estudo, em sistema de batelada ou contínuo, levou a uma concentração de piruvato mais baixa. A dependência da piruvação com relação ao fornecimento de oxigênio não é

inesperada. Por ser um componente altamente oxidado do polímero, o aumento do nível de oxigênio dissolvido em velocidades de agitação mais elevadas, pode explicar o aumento da quantidade de piruvato obtido (PAPAGIANNI et al., 2001).

5.4.1.3. *Análise Termogravimétrica das xantanas obtidas nos ensaios E3, E4, E5 e E6.*

Na Figura 29 são apresentadas as curvas de TGAA dos biopolímeros (E3, E4, E6 E E7) obtidos nos experimentos 3, 4, 6 e 7, indicando perfis similares com dois eventos principais.

O perfil termogravimétrico obtido a partir da goma xantana produzida no Ensaio 3 apresentou dois eventos de perda de massa. O primeiro evento (perda de massa de 14,7 %) é referente a perda de água superficial e intrínseca, ocorrendo no intervalo entre 25,71 e 122,49°C, com temperatura de velocidade máxima de perda de massa em 69,44°C. A absorção de água pela goma xantana é devido à presença de grupos polares na sua estrutura, especialmente o grupo -OH. A etapa seguinte, acompanhado por uma perda de massa superior (60%), ocorreu entre 212,73 e 369,07°C, sendo atribuído à degradação do polímero. A temperatura onde a degradação é máxima foi observada a 334,25°C.

Para o Ensaio 4 o primeiro evento (25,76 – 152,88°C) é atribuído à desidratação da xantana e corresponde em média a 16,55% de perda de massa. O segundo estágio inicial de decomposição da goma xantana está em torno de 174,47°C e o final em aproximadamente 409,13°C, com perda de massa média de 41,86 % (Figura 29). O terceiro evento tem temperatura inicial de 431,71°C e final em aproximadamente 496,22°C, com velocidade máxima de perda de massa de 467,87°C.

Para a goma xantana obtida no Ensaio 6 o primeiro evento ocorreu entre (26,59 – 139,40°C) e está relacionado à desidratação. O segundo estágio inicial de decomposição do biopolímero (207,16 - 404,79°C), com uma velocidade de decomposição máxima em 306,92°C. O terceiro estágio tem temperatura inicial de 463,36°C e final em aproximadamente 530,95°C, com velocidade máxima de perda de massa de 485,83°C pode estar relacionada à decomposição térmica ou pirólise de materiais orgânicos presente na estrutura do biopolímero. No Ensaio 7 o primeiro evento ocorreu entre (34,93 – 166,35°C) relacionado a perda de água e água ligada. O segundo evento ocorreu entre (205,91 – 424,93°C) referente à degradação do polímero. E o terceiro e último evento entre (464,49 – 532,38°C), com velocidade máxima de degradação em 491,62°C (Tabela 23).

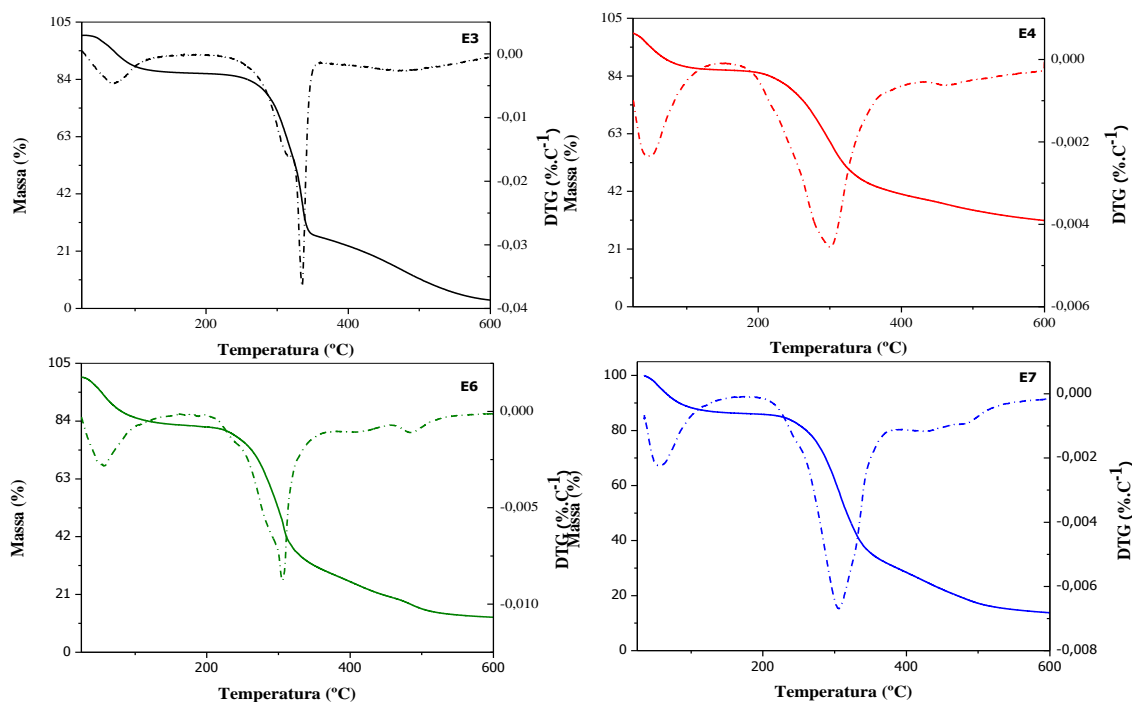


Figura 29: TGA (linha sólida) e DTGA (linha pontilhada) de gomas xantana obtidas nos diferentes Ensaio 3, 4, 6 e 7 em biorreator de 1,5 L.

Dados de TGAA de diferentes polissacarídeos, incluindo goma xantana são relatados por Zohuriaan e Shokrolahi (2004). Os autores obtiveram, para o primeiro estágio, uma temperatura máxima de perda de massa de 74,6°C (8,7 %) para a goma de xantana grau alimético (Sigma) com um intervalo de temperatura de 30 – 91,3°C. O segundo evento, na faixa de 251,5 - 330,3°C atingiu a temperatura de perda de massa máxima em 290,8°C (41,6%). As análises foram realizadas em TA-60 Shimadzu, atmosfera inerte (N₂), taxa de aquecimento de 20°C.min⁻¹, fluxo de 10 mL.min⁻¹ de 25 a 600°C.

Tabela 23: Evento térmico, intervalos de temperatura e porcentagens de perda de massa (Δm) referentes às gomas dos quatro Ensaio do planejamento fatorial em biorreator de 1,5 L.

Amostra	Evento Térmico	Intervalo de Temperatura (°C)	Perda de massa (%)
Ensaio 3	1º Saída da água superficial e estrutural	25,71 – 122,49	14,7
	2º Degradação do polímero	212,73 – 369,07	60,72
Ensaio 4	1º Saída da água superficial e estrutural	25,76 – 152,88	16,55
	2º Degradação do polímero	174,47 – 409,13	41,86
Ensaio 6	3º Decomposição térmica ou pirólise de materiais orgânicos	431,71 – 496,22	
	1º Saída da água superficial e estrutural	26,59 – 139,40	18,29
	2º Degradação do polímero	206,5 – 395,1	60,58
Ensaio 7	3º Decomposição térmica ou pirólise de materiais orgânicos	463,36 – 530,95	
	1º Saída da água superficial e estrutural	34,93 – 166,35	15,91
	2º Degradação do polímero	205,91 – 424,93	54,03
	3º Decomposição térmica ou pirólise de materiais orgânicos	464,49 – 532,38	

Análises termogravimétricas de gomas xantana obtidas a partir de caldo de cana foram avaliadas por Faria et al. (2011). As análises revelaram que o biopolímero apresentou no primeiro evento perda de 15% de massa entre 30 e 140°C com máxima decomposição em 58°C, enquanto o segundo evento, referente à perda de mais de 40% do polímero, ocorreu entre 220 e 320°C com máxima decomposição em 283°C.

5.4.1.4. DSC das gomas xantana obtidas nos ensaios E3, E4, E5 e E6.

A partir das curvas de DSC dos biopolímeros (Figura 30), pode-se visualizar que todas as amostras analisadas apresentaram comportamentos semelhantes quando submetidos às mesmas condições de temperatura, com exceção do Ensaio 3. Observando os quatro ensaios apresentou um evento endotérmico entre 40°C e 127°C, referente à perda de água adsorvida, atribuída à umidade do biopolímero, corroborando com dos dados de TGAA. O segundo evento, inicial exotérmico, teve início em aproximadamente 200°C e refere-se à degradação do material, no entanto é possível observar que a degradação dos biopolímeros (E4, E6 e E7) aconteceu gradativamente numa faixa larga de temperatura podendo ser visualizada nas curvas de DSC através de uma variação na linha de base das curvas. Na amostra E3 a curva de DSC mostra eventos mais definidos, este comportamento pode ser atribuído à distribuição da massa molecular e sua organização (cristais de tamanho variados), comportamento esperado considerando as variações nos parâmetros do biorreator, como aeração e agitação e/ou composição do meio fermentativo. A Tabela 24 apresenta os intervalos de temperatura dos picos referentes às gomas dos quatro ensaios do planejamento fatorial em biorreator de 1,5 L e a Figura 30 mostra as curvas de DSC.

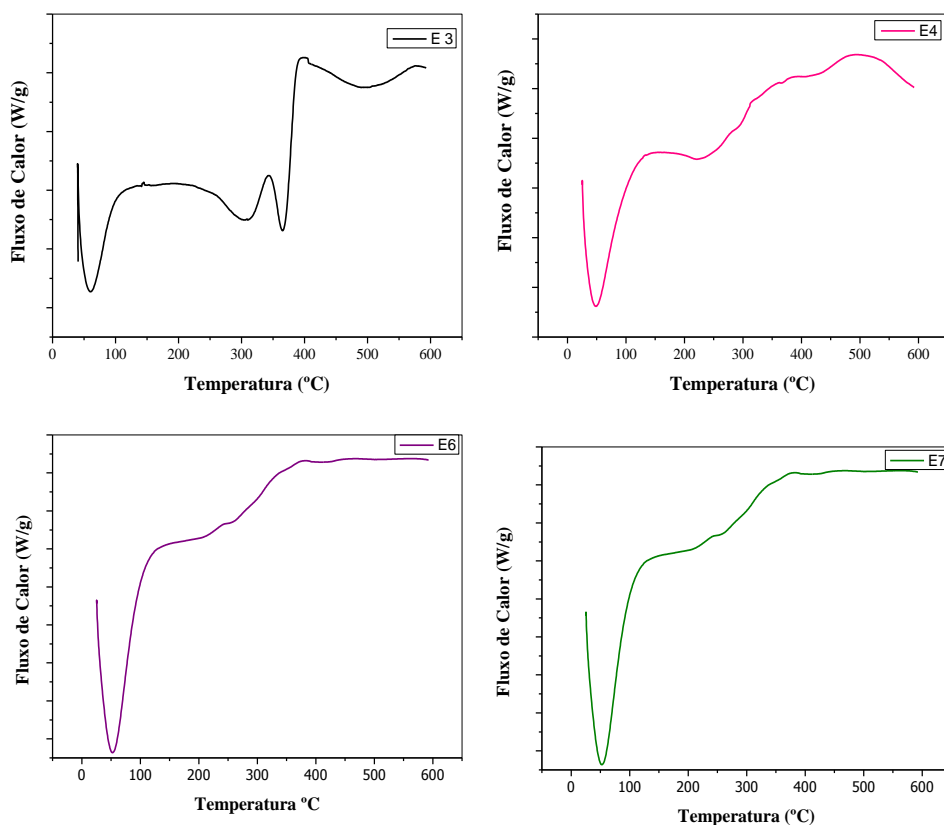


Figura 30: Curvas de goma xantana obtidas nos diferentes Ensaios 3, 4, 6 e 7 em biorreator de 1,5 L.

Tabela 24: Evento térmico e intervalos de referentes às gomas dos quatro Ensaios do planejamento fatorial em biorreator de 1,5 L.

Amostra	Evento Térmico	Intervalo de Temperatura (°C)
Ensaio 3	1° Saída da água superficial e estrutural	39,97 – 127,50 207 – 343,20
	2° Degradação/decomposição do polímero	343,20 – 395,1 395,10 – 575,10
	1° Saída da água superficial e estrutural	25,64 – 147,30
Ensaio 4	2° Degradação/decomposição do polímero	147,30 – 344,70
Ensaio 6	1° Saída da água superficial e estrutural	20,46 – 149,70
	2° Degradação/decomposição do polímero	149,70 – 379,80
Ensaio 7	1° Saída da água superficial e estrutural	20,46 – 177,00
	2° Degradação/decomposição do polímero	177 – 397,00

5.4.1.5. FTIR das gomas xantana obtidas nos Ensaios E3, E4, E5 e E6.

A Figura 31 mostra o espectro de FTIR da goma xantana Sigma e as gomas xantana obtidas nos quatro Ensaios realizados em biorreator de 1,5 L. Todas as gomas xantanas produzidas apresentaram similaridade para os quatro Ensaios. Em torno de 2910 cm^{-1} foi possível observar uma banda em todos os Ensaios. Segundo Pooja et.

(2014) é comum encontrar em espectros de goma xantana bandas de vibração de hidrogênio ligado a O-H e C-H em 3416 cm^{-1} e 2902 cm^{-1} , respectivamente. Para a goma xantana Sigma essa mesma banda pode ser observada em 2358 cm^{-1} .

É possível observar em todas as amostras uma banda em aproximadamente 1700 cm^{-1} inclusive na goma xantana Sigma. Esta banda é um comportamento típico da goma xantana, isto acontece devido aos estiramentos C=O dos resíduos de esterificação com o piruvil ($\text{CH}_3\text{-CO-COO}$) e acetil ($\text{CH}_3\text{-COO}$) e ao grupo -COOH do ácido glucurônico.

Independentemente das variáveis aeração e agitação, a bactéria *Xanthomonas* é capaz de bioconverter o bagaço de cana a goma xantana com os mesmos grupamentos funcionais do biopolímero, semelhantes a goma xantana padrão Sigma.

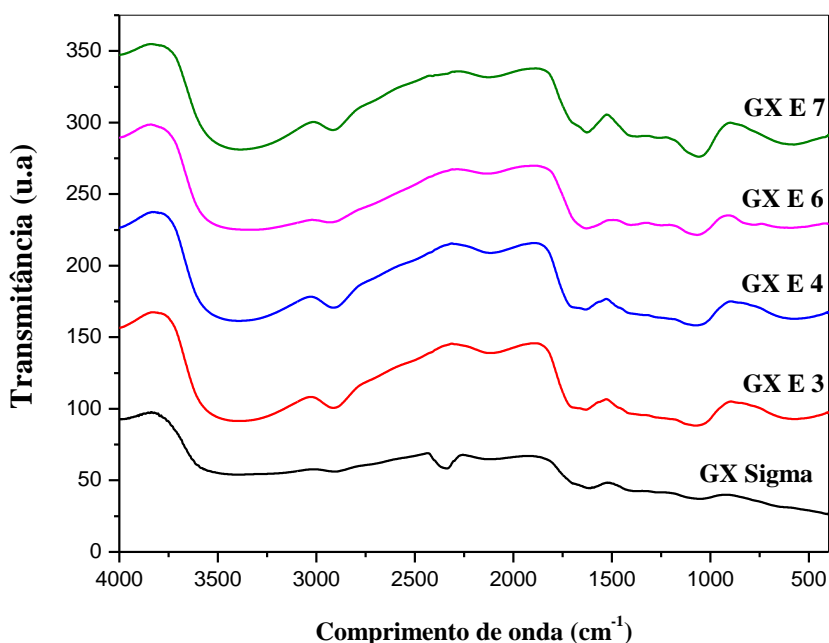


Figura 31: Espectros de FTIR das gomas xantanas obtidas nos Ensaios 3, 4, 6, 7 e a goma xantana padrão (Sigma).

5.4.1.6. DRX das gomas xantana obtidas nos Ensaios E3, E4, E5 e E6.

Pelos difratogramas apresentados na Figura 32 e os dados na Tabela 25, pode-se verificar que o índice de cristalinidade mostrou ser maior para a goma xantana obtida no Ensaio E4 (93,54 %) e menor para a goma xantana Sigma (39,91 %). Sabe-se que os polissacarídeos interagem naturalmente com água, levando a transições estruturais relacionadas às transições amorfo-cristalinos, com um grande impacto sobre a sua mobilidade molecular e propriedades funcionais (YAKIMETS et al., 2007). Os domínios cristalinos presentes nas gomas obtidas com o bagaço nos Ensaios E3, E4, E6

e E7 são diferentes do comportamento da amostra de goma xantana Sigma que é classificada como um material semi-cristalino.

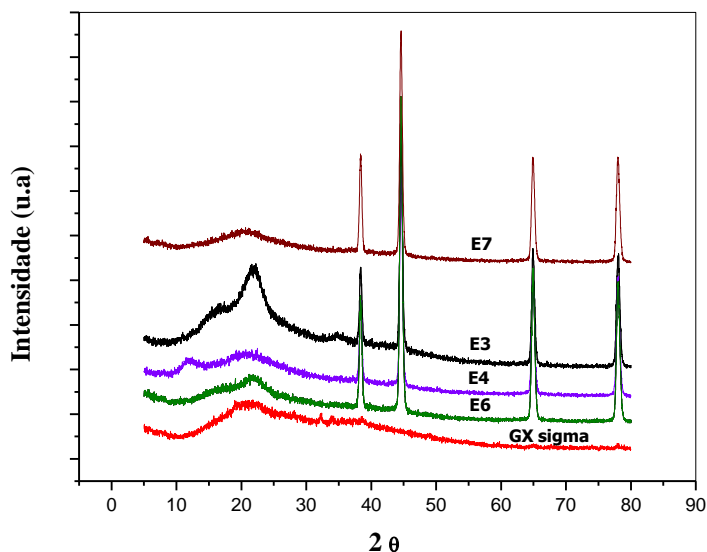


Figura 32: Difratogramas DRX das gomas xantanas obtidas nos Ensaios 3, 4, 6, 7 e a goma xantana padrão (Sigma).

Tabela 25: Índice de cristalinidade (Ic) das gomas xantana Sigma e as gomas obtidas nos Ensaios E3, E4, E6 e E7 com bagaço de cana e a linhagem de *Xanthomonas* 254.

Amostras	Índice de Cristalinidade (Ic) %
Gomas Xantana Sigma	39,91
E3 (1 vvm; 700 rpm)	92,59
E4 (3 vvm; 700 rpm)	93,54
E6 (2 vvm; 803 rpm)	89,04
E7 (0,6 vvm; 450 rpm)	89,89

A análise permitiu identificar que a celulose do bagaço (picos estreitos e longos), Figura 32, presente nas quatro amostras de gomas xantana obtidas com o bagaço e a cepa de *Xanthomonas* 254, apresentam comportamentos similares ao apresentado na Figura 19 deste trabalho, que relata o estudo de gomas xantana obtidas em *Shaker*.

Pelos resultados relatados anteriormente, identifica-se novamente à presença de picos cristalinos no difratograma (Figura 32), um indicativo da presença de microfibrilas de celulose na estrutura do biopolímero, ou seja, a bactéria *Xanthomonas* libera enzimas que degradam as regiões amorfas do polímero de celulose, enquanto as regiões cristalinas não são totalmente hidrolisadas, mantendo-se aglomeradas a goma xantana devido a alta viscosidade do biopolímero. Esse comportamento similar ao

discutido anteriormente pode ser melhor visualizado na Figura 33, onde é possível observar as microfibrilas impregnadas no biopolímero para todos os quatro Ensaios.

5.4.1.7. Microscopia eletrônica de transmissão das gomas xantanas selecionadas

Os resultados da microscopia eletrônica de transmissão das gomas xantana dos quatro Ensaios (E3, E4, E6 e E7) mostram novamente a existência da estrutura da rede polimérica formada pela goma xantana em todos os Ensaios. Entretanto é possível também observar a presença das microfibrilas proveniente do bagaço de cana utilizado no cultivo para obtenção do biopolímero. Os resultados obtidos nas micrografias corroboram com os dados já discutidos anteriormente (Figura 18) e com os dados obtidos pela análise de DRX (Figura 32).

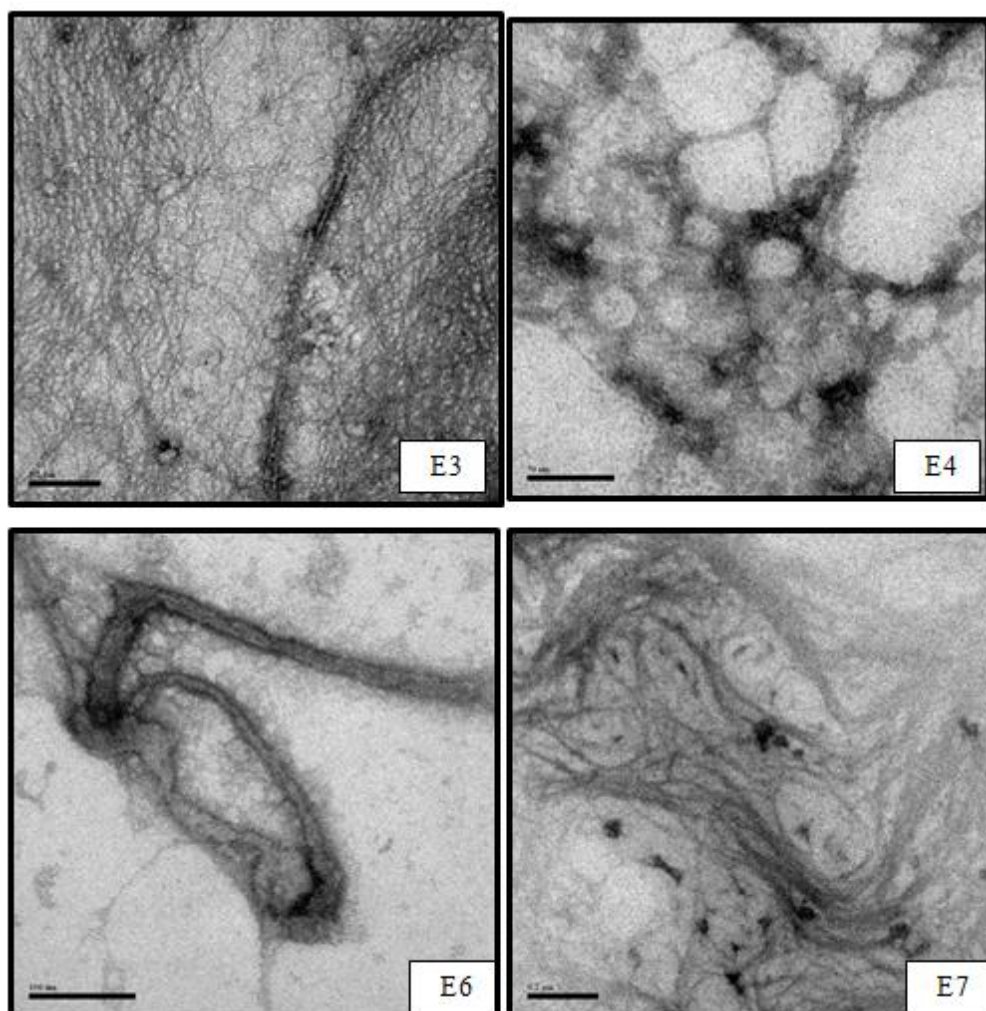


Figura 33: Micrografias obtidas da suspensões de goma xantana obtidas nos Ensaios 3, 4, 6 e 7 em escala 0,2 μm , 50 nm, 100 nm e 0,2 μm , respectivamente.

5.5. Aplicação da goma xantana produzida com bagaço de cana e a bactéria selecionada (melhores condições em biorreator), no desenvolvimento de filmes flexíveis de amido

Para confirmar o efeito das microfibrilas na goma xantana e a propriedade diferencial de reforço, que pode resultar nos filmes flexíveis, foram realizados testes preliminares para definir as faixas a serem estudadas no planejamento estatístico de formulações dos filmes compostos de amido (4 %), glicerol (1,5 % m/m) e goma xantana microfibrilada (0,015 %) como aditivo. Três formulações, A (amido 4 %, glicerol 1,5 % e goma xantana microfibrilada 0,015 %), B (amido 4 %, glicerol 1,5 % e goma xantana obtida com sacarose 0,015 %) e C (amido 4 %, glicerol 1,5 % e sem goma xantana, controle), foram avaliadas. A Tabela 26 mostra os resultados das análises das três formulações dos filmes.

Tabela 26: Caracterização de filmes flexíveis de amido de mandioca produzidos com goma xantana obtida com bagaço de cana (A), goma xantana obtida com sacarose (B), por bioprocessamento com *Xanthomonas* 254, e sem a presença de goma xantana (C).

Formulação	σ (MPa)*	E (MPa)*	ϵ (%) *	e (cm)*	A_a *	UR%*
A (GX BC)	6,6±2,0 ^a	182,70±4,90 ^a	17,1±3,5 ^a	0,12±0,01 ^a	0,62±0,09 ^a	16,8±0,10 ^a
B(GX SAC)	5,2±0,9 ^a	123,50±4,70 ^b	19,2±3,8 ^a	0,12±0,02 ^a	0,61±0,02 ^a	15,8±0,70 ^a
C (SEM GX)	4,5±0,4 ^a	83,50±4,10 ^c	24,8±4,7 ^a	0,15±0,06 ^a	0,64±0,06 ^a	14,7±0,10 ^a

A= formulação com 0,015 (% m/m) de goma xantana microfibrilada; 1,5 (% m/m) de glicerol e 4,0 (%m/m) de amido de mandioca;

B= formulação com 0,015 (% m/m) de goma xantana obtida da sacarose; 1,5 (% m/m) de glicerol e 4,0 (%m/m) de amido de mandioca;

C= formulação com 1,5% de glicerol e 4% de amido (controle).

σ = Tensão máxima

*E = Módulo de elasticidade;

ϵ = Deformação;

e = espessura do filme;

A_a = Atividade de água;

UR = Umidade Relativa;

Filmes previamente acondicionados a (25°C e 75 % UR).

A incorporação de goma xantana com microfibrilas de celulose influenciam as propriedades mecânicas dos filmes flexíveis de amido de mandioca. A resistência à tração (σ) aumentou 46,66 % (A) e 15,56 % (B), quando comparados aos filmes sem goma xantana (controle). Levando-se em consideração as duas formulações com a presença da goma xantana na sua composição é possível inferir que a formulação (A) apresentou um aumento de tensão máxima de 26,92 % em relação à (B). A deformação da (A) em relação à (B) apresentou uma diminuição de 10,94 % e o módulo de

elasticidade da (A) teve um aumento de 47,94 % em relação a (B). Esses resultados indicam mais uma vez que a presença da goma xantana microfibrilada (obtida com bagaço de cana) influenciou as propriedades mecânicas dos filmes, atuando como reforço. O aumento do módulo de elasticidade está atribuído à presença de microfibrilas que são cristalinas.

No que concerne à deformação mecânica (ϵ), observa-se uma diminuição nos valores de deformação, com a incorporação de goma xantana obtida com sacarose e mais acentuado com a goma xantana microfibrilada, o que indica aumento na rigidez dos filmes, em relação ao controle. Esses dados mostram que as propriedades mecânicas dos filmes flexíveis são favorecidas na presença de goma xantana contendo as microfibrilas, quando comparada com a goma xantana obtida com a sacarose e a mesma cepa de *Xanthomonas*.

Comparando os resultados dos filmes obtidos neste estudo com filmes com diferentes teores de amido de ervilha (3, 4 e 5%), goma xantana (0, 0,05 e 0,1%) e glicerol (proporção glicerol-amido de 1:5 p/p), processados por *casting* constata-se que foram encontrados valores relativamente próximos de tensão máxima na ruptura (condicionamento a 23°C e 50% UR), variando de 2,65 a 374 4,32 MPa (LIU et al., 2005).

De acordo com Sobral (2000), a espessura dos filmes influencia largamente as propriedades mecânicas. Quanto maior as espessuras, mais resistentes ruptura são os filmes. Os filmes do presente trabalho apresentaram valores aproximados de espessura, variando de 0,12 cm a 0,15 cm (Tabela 26).

Silva et al., 2012 estudou filmes de bionanocompositos de amido de mandioca (4 %) plastificado com sacarose (0,7 %) e açúcar invertido (1,4 %), reforçados por nanowhiskers de celulose preparados por *casting*. A adição de nanowhiskers (0,1-0,3%) aos bionanocompositos diminui a atividade de água e aumenta a tensão máxima de tração (superior a 90%) e o módulo de elasticidade (superior a 400%). De acordo com os autores, estas características tornam estes filmes adequados para embalagens de produtos alimentares.

Considerando estes resultados preliminares na tentativa de melhor avaliar o efeito da presença de microfibrilas das gomas xantana nas propriedades de filmes de amido, plastificante glicerol e a goma xantana microfibrilada foram usados como variáveis independentes no planejamento DCCR ($2^2 + 4$ axiais + 3 centrais) utilizando-se o software Statistica 7 produzido pela StatSoft na qual os dados obtidos nos Ensaios

do planejamento fatorial foram tratados, sendo que cada resposta foi avaliada independentemente, (Tabela 27).

Para a todas as resposta: umidade, atividade de água, espessura, tensão, alongação e módulo foram calculados os coeficientes de regressão, na qual se observa a influência das variáveis, bem como suas interações em relação aos efeitos significativos ($p < 0,05$) na produção dos filmes flexíveis.

A utilização da goma xantana, obtida do processamento do bagaço de cana-de-açúcar, simultaneamente com o glicerol utilizados como plastificantes aumentaram a resistência mecânica dos filmes flexíveis.

Tabela 27: Atividade de água (Aa), Umidade (%), espessura e propriedades mecânicas das diferentes formulações de filmes biodegradáveis de amido de mandioca, e diferentes quantidades goma xantana microfibrilada e glicerol.

Formulações	Aa	Umidade (%)	Espessura (mm)	Tensão (MPa)	Deformação (%)	Módulo (MPa)
Controle	0,640±0,06	14,70±0,10	0,150±0,01	4,50±0,40	24,80±4,70	83,50±4,10
F1(G=1,0;GXM=0,015)	0,663±0,18	12,14±1,22	0,131±0,00	3,46±0,23	27,12±2,99	30,45±5,65
F2(G=2,0;GXM=0,015)	0,678±0,18	19,56±1,22	0,156±0,02	1,21±0,13	18,27±3,35	6,54±0,60
F3(G=1,0;GXM=0,045)	0,651±0,12	14,51±2,07	0,127±0,01	3,54±0,49	26,55±3,71	33,22±8,59
F4(G=2,0;GXM=0,045)	0,683±0,03	21,85±1,80	0,151±0,01	1,34±0,06	20,61±3,14	7,17±0,58
F5(G=1,5;GXM=0,009)	0,635±0,10	16,79±1,21	0,250±0,02	12,29±1,64	23,45±7,06	91,68±22,80
F6(G=1,5;GXM=0,051)	0,625±0,09	21,71±1,39	0,220±0,00	13,39±3,86	22,99±4,78	93,23±29,77
F7(G=0,79;GXM=0,030)	0,662±0,05	13,63±2,05	0,220±0,02	34,41±8,03	13,96±3,31	1101±351,60
F8(G=2,21;GXM=0,030)	0,655±0,06	16,47±1,19	0,200±0,00	11,19±0,71	30,20±2,80	43,09±3,22
F9*(G=1,5;GXM=0,030)	0,637±0,11	20,79±2,18	0,140±0,00	23,30±2,23	26,49±2,34	108,1±24,10
F10*(G=1,5;GXM=0,030)	0,642±0,10	17,85±1,49	0,120±0,00	22,33±1,12	22,68±3,85	140,0±18,59
F11*(G=1,5;GXM=0,030)	0,645±0,07	19,32±2,22	0,160±0,00	18,64±3,42	26,81±7,90	107,2±26,37

*Pontos Centrais

¹G= Glicerol;

² GXM=Goma xantana microfibrilada nas condições selecionadas a partir da cepa 254 e bagaço de cana Controle = C= formulação com 1,5% de glicerol e 4% de amido (controle).

É consenso na literatura que o principal fator na estabilidade de um alimento não é a umidade, mas sim a disponibilidade da água para o crescimento de microrganismos e reações químicas. O conceito de atividade de água é universalmente adotado por cientistas e tecnologistas da área de alimentos para quantificar sua disponibilidade. O percentual de água presente nas embalagens biodegradáveis é um parâmetro importante para avaliar a vida de prateleira do produto a ser embalado.

A variação das variáveis independentes X1 (glicerol de 0,793 a 2,00%) e X2 (goma xantana de 0,009 a 0,051%) exerce influência na porcentagem de umidade dos filmes flexíveis obtidos, com variação de 12,14 a 21,85%, dependendo das concentrações das variáveis utilizadas (Tabela 26).

Para a resposta porcentagem de umidade e atividade de água (Tabela 27) foram calculados os coeficientes de regressão, mostrados na Tabela 28, onde se observa que apenas o efeito linear da concentração de goma xantana é significativo ($p < 0,05$). Para a resposta atividade de água observa-se que apenas o efeito linear da concentração de glicerol foi significativo ($p < 0,05$). Os demais efeitos apresentaram valor de $p > 0,05$.

A Formulação F4 foi a que apresentou uma maior atividade de água ($0,683 \pm 0,03$) e a F6 com menor atividade de água ($0,625 \pm 0,09$), enquanto que a F1 apresentou um menor percentual de umidade ($12,14 \pm 1,22$) e a F4 um maior percentual de umidade ($21,85 \pm 1,22$), o que pode estar relacionado com incorporação máxima de glicerol e goma xantana microfibrilada neste filme (F4). Vale ressaltar que a umidade destas formulações comparadas ao controle também sofreu aumento, entretanto houve manutenção da atividade de água dos filmes (Tabela 27).

No processo de obtenção dos filmes por '*casting*', as diferentes quantidades de goma adicionadas não afetaram significativamente ($p < 0,05$) a espessura dos filmes variando de (0,120-0,250 mm). Essa uniformidade na espessura dos filmes é de suma importância para a caracterização destes materiais e depende em grande parte da uniformidade do processo de produção, influenciando largamente nas propriedades mecânicas.

A adição de goma xantana e glicerol na composição dos filmes biodegradáveis de amido de mandioca resultaram em filmes com propriedades mecânicas variadas. O filme F7 mostrou maior resistência com valor de tensão máxima de 34,41 Mpa e módulo de 1101 Mpa, mostrando ser a combinação entre os componentes que levou a formulação com maior resistência mecânica. No entanto de todas as formulações estudadas apresentaram propriedades mecânicas adequadas para aplicações dos filmes com embalagens.

A variação das variáveis independentes X1 (glicerol de 0,793 a 2,00%) e X2 (goma xantana de 0,009 a 0,051%) exerce influência na atividade de água dos filmes flexíveis obtidos, com variação de 0,625 a 0,683, dependendo das concentrações das variáveis utilizadas (Tabela 28).

Tabela 28: Estimativa de efeitos de X1 (Glicerol) e X2 (goma Xantana) na porcentagem de umidade e atividade de água.

Termo	Umidade		Atividade de água	
	Coefficiente	p-valor	Coefficiente	p-valor
Constante	19,320	0,001	0,642	0,000
X1	2,904	0,107	0,005	0,100
X1*X1	-0,137	0,921	0,014	0,016*
X2	4,694	0,045*	-0,002	0,239
X2*X2	-4,337	0,072	0,000	0,892
X1*X2	-0,040	0,980	0,004	0,200

Nota-se na Tabela 27, que para a concentração de glicerol mantida a 1,0% a variação da concentração de goma xantana do mínimo nível (0,015%) para o máximo (0,045%) causou um aumento de 19,52% na porcentagem de umidade dos filmes. O mesmo comportamento ocorreu quando se manteve a concentração de glicerol em 2% com um acréscimo de 11,70% na umidade. A concentração de goma xantana mantida a 0,015% e a concentração de glicerol variando de 1,0 para 2,0% causou um aumento de 61,12% na porcentagem de umidade dos filmes flexíveis, enquanto, a mesma variação de glicerol com concentração de 0,045% de goma xantana, causou um aumento na porcentagem de umidade de 50,58%. Logo, o aumento das concentrações de glicerol e goma xantana resultam em aumentos nas porcentagens de umidade dos filmes flexíveis.

O sumário da análise de variância para as porcentagens de umidade, apresentados na Tabela 29, mostrou o valor de $R^2 = 0,82$.

Tabela 29: Análise de variância para avaliação estatística do modelo para porcentagem de umidade dos filmes flexíveis.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	89,505	5	29,835	3,06	5,05
Resíduo	19,446	5	9,723		
Falta de ajuste	15,124	3	5,041	2,33	19,16
Erro puro	4,321	2	2,160		
Total	108,952	10			
R^2			0,821		

A predição do modelo foi verificada pelo valor do F calculado da regressão, que foi 1,65 vezes menor que o valor do F tabelado da regressão (5,05), indicando assim, que o modelo proposto não é preditivo a 95% de confiança.

Nota-se na Tabela 27, que para a concentração de glicerol mantida a 1,0% a variação da concentração de goma xantana do mínimo nível (0,015%) para o máximo (0,045%) causou uma diminuição de 1,81% na atividade de água. O comportamento inverso ocorreu quando se manteve a concentração de glicerol em 2% com um acréscimo de 0,74% na atividade de água. A concentração de goma xantana mantida a 0,015% e a concentração de glicerol variando de 1,0 para 2,0% causou um aumento de 2,26% na atividade de água dos filmes flexíveis, enquanto, a mesma variação de glicerol com concentração de 0,045% de goma xantana, causou um aumento na atividade de água dos filmes de 4,91%. Logo, o aumento das concentrações de glicerol e goma xantana causa influencia nos valores das atividades de água dos filmes flexíveis.

O sumário da análise de variância para a atividade de água dos filmes, apresentados na Tabela 30, mostrou o valor de $R^2 = 0,49$.

Tabela 30: Análise de variância para avaliação estatística do modelo para atividade de água dos filmes flexíveis.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	0,001	5	0,000	0,64	5,05
Resíduo	0,001	5	0,000		
Falta de ajuste	0,001	3	0,000	26,42	19,16
Erro puro	0,000	2	0,000		
Total	0,003	10			
R^2			0,490		

Resíduo = Falta de ajuste + erro puro.

A predição do modelo foi verificada pelo valor do F calculado da regressão, que foi 7,89 vezes menor que o valor do F tabelado da regressão (5,05), indicando assim, que o modelo proposto não é preditivo a 95% de confiança.

Os modelos de regressão gerados para todos os parâmetros mecânicos dos filmes flexíveis apresentaram F-valor para o modelo de regressão $< F_{tab.5,5} (5,05)$, além do coeficiente de correlação (R^2) relativamente baixo 26,4 %, 48,4%, 11,6% e 53,9% para

a espessura, tensão, deformação e módulo de elasticidade, respectivamente, indicando que os dados experimentais de regressão não é preditivo a 95% de confiança.

Esses resultados demonstram que a combinação da adição da goma xantana e o glicerol na matriz polimérica de amido de mandioca contribuem para o desenvolvimento de filmes com propriedades mecânicas diferenciadas, podendo ter diferentes aplicações no setor farmacêutico, alimentício, químico e etc, visto que soluciona os problemas de baixa resistência mecânica dos filmes de amido biodegradáveis.

O processo de obtenção dos filmes flexíveis de amido de mandioca, utilizando glicerol e goma xantana (obtida da fermentação do bagaço de cana-de-açúcar), foi bastante eficiente para o desenvolvimento de filmes com propriedades de resistência à tração e módulo de Young diferenciados, contribuindo para o desenvolvimento de um novo biomaterial que pode ser utilizado como embalagem de diversos produtos.

6. Conclusões

É possível produzir goma xantana microfibrilada a partir de diferentes cepas nativas de *Xanthomonas* utilizando-se o meio fermentativo alternativo (bagaço de cana).

Uma considerável variação na produção de goma xantana entre as diferentes linhagens após a fermentação a 28°C, 250 rpm por 120 horas, em *Shaker*, variando de 1,28 a 22,05 g.L⁻¹ utilizando sacarose e 0,68 a 8,54 g.L⁻¹ utilizando bagaço de cana.

Todas as médias de produção e viscosidade diferem entre si a 95% de confiança, o que permite concluir que a cepa *Xanthomonas* 254 apresentou melhor adaptação ao meio alternativo (bagaço de cana) e conseqüentemente maior produção (8,54 g.L⁻¹) associada a maior viscosidade (120,30 mPa.s).

Com a variação da concentração de bagaço de cana os resultados demonstram que a concentração 4 % foi a que mais se destacou tanto para a produção de goma xantana como também para as características dos biopolímeros obtidos.

Foi possível constatar a presença de microfibrilas de celulose do bagaço de cana na goma xantana obtida com a concentração de 4 % (BC), mostrando morfologia diferenciada quando comparadas com a goma xantana Sigma e a obtida com a fonte de carbono sacarose.

Os resultados das fermentações de 4,0% de BC minimamente suplementada com 0,1% de K_2HPO_4 por *Xanthomonas campestris pv. campestris* 254, em diferentes aerações (1,0 – 3,0 vvm) e agitações (200 – 700 rpm) conduzidas em biorreator de 1,5 L a 28°C, levaram as seguintes conclusões:

- A produção de xantana em biorreator de 1,5 L foi influenciada, individualmente, pela aeração e agitação, sendo favorecida em baixa aeração ou elevada agitação, com máxima produção ($7,62 \text{ g.L}^{-1}$) a 700 rpm e 1,0 vvm.
- O aumento da velocidade de agitação no bioprocessamento possibilitou o aumento da viscosidade das soluções de xantana (0,5 %), sendo a máxima ($123,80 \text{ mPa.s}$) atingida com 700 rpm e 1,0 vvm .
- Os modelos empíricos obtidos para a produção e viscosidade das gomas xantana apresentaram um bom ajuste aos dados experimentais, porém não foram preditivos.

A adição de goma xantana microfibrilada se mostrou uma boa alternativa no reforço de filmes flexíveis de amido, melhorando as propriedades mecânicas do biomaterial. O acréscimo do aditivo provocou um aumento na tensão de ruptura e no módulo de elasticidade e uma diminuição na deformação dos filmes.

Os resultados para porcentagem de umidade mostraram que o aumento da concentração de goma xantana favorece o aumento da umidade no filme. Assim, a menor porcentagem de umidade (12, 14 %) foi obtida com 1,0 % de glicerol e 0,015 % de goma xantana.

Para a resposta de atividade de água observou-se que o aumento da concentração de glicerol proporcionou o aumento da umidade nos filmes. Sendo a menor resposta (0,625) obtida a 1,5 % de glicerol e 0,05 % de goma xantana.

Os modelos obtidos para umidade e atividade de água não apresentaram bom ajuste e não são preditivos. Concluiu-se que, a cepa de *Xanthomonas* 254 apresentou melhor adaptação ao meio contendo bagaço de cana, sendo capaz de produzir goma xantana impregnada de microfibrilas, podendo assim, ser empregada como em filmes biodegradáveis proporcionando melhores propriedades mecânicas.

7. Referências Bibliográficas

ABAM – Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca. Disponível em <<http://www.abam.com.br/prod.amido.est.php>>, acesso dia 28 de agosto de 2012.

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

ALBITER, V.; TORRES, L. G.; GALINDO, E. (1998), Recovery of xanthan from a heatstable slat-tolerant bacterial consortium. *Journal of Industrial Microbiology*, v.12, n. 2, p. 87-92.

ALVES, V.; COSTA, N.; HILLIOU, L.; LAROTONDA, F.; GONÇALVES, M.; SERENO, A. Design of biodegradable composite films for food packaging. *Desalination*, 199(1), 331- 333, 2006.

ANTUNES, A.E.C.; MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S.; VENDRUSCOLO, C.T. Screening of *Xanthomonas campestris pv pruni* strains according to their production of xanthan and its viscosity and chemical composition. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.6, p.317-322, 2003.

ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; VENDRUSCOLO, C. T. (2000), Síntese de Biopolímeros xantana em meios convencionais e alternativos: viscosidade x composição. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 6, n. 12, p.123-125.

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

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

ASSIS, D. de J., BRANDÃO, L. V.; COSTA, L. A. de S.; FIGUEIREDO, T. V. B.; SOUSA, L. S.; PADILHA, F. F. and DRUZIAN, J. I. *Appl Biochem Biotechnol*, 172, 2769-2785, (2014).

ASSIS, D. de J.; COSTA, L. A.; CAMPOS, M. I.; SOUZA, C. O.; DRUZIAN, J. I.; NUNES, I.; PADILHA, F. Influência da natureza do rejeito agroindustrial fermentado por *Xanthomonas axonopodis pv. manihotis* nas propriedades das gomas xantana resultantes. *Polímeros*, vol. 23, n. 6, p. 1-8, 2013.

ASTM. American Society for Testing and Materials. Standard test method for slow rate penetration resistance of flexible barrier films and laminates - F 1306-90 (Reapproved 2008). In: *Annual Book of ASTM Standards*. Philadelphia: ASTM, 1990.

ASTM. American Society for Testing and Materials. Standard test methods for water vapor transmission of material – D638-93. In: *Annual Book of ASTM Standards*. Philadelphia: ASTM, 1993.

ASTM. American Society for Testing and Materials. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting – D882-91. In: Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia: ASTM, 1996.

AVEROUS, L; LE DIGABEL, F., Properties of biocomposites based on lignocellulosic fillers, *Carbohydrate Polymers* 66, 480-493, 2006.

AZEVEDO, S.S.; MICHEREFF, S.J.; MARIANO, R.L.R. 2002. Epidemiologia comparativa da Podridão Negra e da Alternariose do repolho na agreste de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*, 27(1):21-23.

BAE, S.; SHODA, M. (2004), Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. *Biotechnology Progress*, New York, v. 20, p. 1366-1371.

BAIOCCO, L. M. (1997), Estudo de Parâmetros para a Produção de Inóculos Liofilizados de *X. campestris* pv. *manihotis*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, p.414, 2010.

BAUMHARDT NETO, R. Raio-X. In *Técnicas de Caracterização de polímeros*. CANEVAROLO JR., S.V., Ed. São Paulo: Artiber Editora, p. 41-60, 2003.

BECKER, A.; KATZEN, F.; PUHLER, A.; IELPI, L. (1998), Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 50, p. 145-152.

BEN SALAH, R., CHAARI, K., BESBES, S., KTARI, N., BLECKER, C., DEROANNE, C., ATTIA, H. Optimisation of xanthan gum production by palmdate (*Phoenix dactylifera L.*), juice by-products using response surface methodology. *FoodChem*.121, 627–633, 2010.

BERWANGER, A. L. da S. Produção e caracterização de biopolímeros sintetizados por *Sphingomonas capsulata*. (2005), *Dissertação de Mestrado*. Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões campus de Erechim.

BLANCO, M.; COELHO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; PAGES, J.. Calibration in non-linear near infrared reflectance spectroscopy: a comparison of several methods. *Analytica Chimica Acta*, p. 207 – 214, 1999.

BLIGH, E. G., AND DYER, W. J. 1959. "A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification," *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, Vol 37, pp 911-917.

BORGES, C. D. *et al.* (2009). The influence of thermal treatment and operational conditions on xanthan produced by *X. arboricola* pv *pruni* strain 106. *Carbohydrate Polymers*, v. 75, p. 262-268.

BORGES, C. D. Estudo das condições operacionais na produção de xantana por *X. arboricola pv pruni* para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo. 2007. 120p Tese. (Doutorado em Ciências e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

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

BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthan. In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. Biopolymers - biology, chemistry, biotechnology and applications. Weinheim: Wiley-VCH, p. 259-291. 2002.

BOROWSKI, J.M.; REDIES, C.R.; MICHELS, R.; BORGES, C.D.; VENDRUSCOLO, C.T. 2006. Xantana sintetizada por cepas de *X. campestris pv. pruni* em diferentes meios de produção. In: CIC – Congresso de Iniciação Científica, Pelotas, 2006. Anais... Pelotas, UFPEL, 4 p.

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

BRANDÃO, L. V.; ASSIS, D. J.; LÓPEZ, J. A.; ESPIRIDIÃO M. C. A., ECHEVARRIA, E. M. AND DRUZIAN, J. I. Bioconversion from crude glycerin by *Xanthomonas campestris* 2103: xanthan production and characterization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. Vol. 30, No. 04, pp. 737 - 746, 2013.

BRANDÃO, L. V. Goma xantana obtida por fermentação da Glicerina bruta residual do biodiesel: Produção, caracterização e aplicação para fluido de perfuração de poços de petróleo. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA, 2012.

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

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

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

BRANDFORD, P.A.; BAIRD, J. 1983. Industrial utilization of polysaccharide. In: G.O. ASPINALL (ed.), *The Polysaccharides* 2, New York, Academic Press, vol. 2, p. 411-490.

BRIASSOULIS, D.; ARISTOPOULOU, A.; BONORA, M.; VERLODT, I. Degradation characterisation of low-density polyethylene films. *Biosystems Engineering*, v. 88, n. 2, p. 131–143, 2004.

BURGI, R. (1985), Produção do bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum sp L.*) autohidrolisado e avaliação para ruminantes. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/ Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

CACIK, F.; DONDO, R.G.; MARQUÉS, D. 2001. Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. *Computers and Chemistry Engineering*, 25:409-418.

CADMUS, M. C., KNUTSON, C.A., LAGODA, A. (1978), Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. *Biotechnology and Bioengineering*, v.20, p. 1003-1014.

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

CAMPESTRINI, E. Utilização de Equipamento NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy) nos estudos de valores nutricionais (Composição química e digestibilidade) de Alimentos para não ruminantes. *Revista Eletrônica Nutritime*, v. 2, n.5, p. 240 – 251, 2005.

CANEVAROLO, S. V. Ciência dos Polímeros – Um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 2ª edição. Editora Artliber. 2007.

CANEVAROLO JR., S. V. Técnicas de Caracterização de Polímeros. São Paulo: Artliber, 2004.

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

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

CEN, H.; HE, Y.. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality trends. *Food Science and Technology*, v. 18, p. 72 – 83, 2007.

CHAIWANG, M. & SUPHANTHAKIRA, M. - *Food Hydrocoll.*, 20, p.641 (2006).

CHEN, S.; NUSSINOVITCH, A. The role of xanthan gum in traditional coatings of easy peelers. *Food Hydrocolloids*, v. 14, p. 319 - 326, 2000.

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

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

CHILLO, S.; FLORES, S.; MASTROMATTEO, M.; CONTE, A. GERSCHENSON, L.; DEL NOBILE, M. A., Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*, 88, 2, 159-168, 2008.

CHIUMARELLI, M.; PEREIRA, L. M. R.; FERRARI, C. C.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; HUBINGER, M. D. Cassava starch coating and citric acid to preserve quality parameters of fresh-cut “Tommy Atkins” mango. *Journal of Food Science*, v. 75, p. 297 - 304. 2010.

CHOI, W. S.; HAN, J. H. Physical and mechanical properties of pea-protein-based edible films. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 66, n. 2, p. 319-322, 2001.

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

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

COWLING E. B, KIRK T. K. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. *Biotechnol. Bioenginee. Symposium.*, 6: 95-123. Cowling & Kirk, 1976.

CULLITY, B. D. Elements of X-ray diffraction. Addison-Wesley Publishing Company, Inc. Massachusetts, 1978.

CUQ, B. et al. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as effected by film thickness. *J. of Food Sci.*, Chicago, v. 61, n. 3, p. 580-584, 1996.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P.; PASTORE, G. M.; OLIVEIRA, J. G. OLIVEIRA. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 411-414, 2003.

DE VUYST, L.; VAN LOO, J.; VANDAMME, E.J. 1987. Two-step fermentation process for improved xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Journal Chemical Biotechnology*, 39:263-273.

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

DRUZIAN, J. I. PAGLIARINI, A. P. Produção de goma xantana por fermentação do resíduo de suco de maçã. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 26-31, 2007.

DRUZIAN , J. I. PAGLIARINI, A. P. Produção de goma xantana a partir de fontes alternativas de carbono na fermentação. In: VII Seminário Integrado de Iniciação Científica, Camboriu - SC. VII Seminário Integrado de Iniciação Científica. Camboriu : Univali. Anais, v. único. p. 186. 2001.

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

DUTA, F.P.; FRANÇA, F.P.; LOPES, L.M.A. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in Rhizobium sp. using the response surface method. *Electronic Journal Biotechnol*, v. 9, p. 393-399, 2006.

DU TOIT, P. J.; OLIVIER, S. P.; VAN BILJON, P. L. (1984), Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. I. Characterization of bagasse with regard to monosaccharide. Hemicellulose and amino acid composition. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 26, p. 1071-1078.

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

FORNARI, R.C.G. (2006), Aproveitamento de soro de queijo para produção de goma xantana. *Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos*. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, RS.

FRANCO, C. M. L. et al. Propriedades gerais do amido. Séries: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill. v. 1, 2001.

FUNAHASHI, H.; TOSHIOMI, Y.; TAGUCHI, H. 1987. Effect of glucose concentration on xanthan gum production by *X. campestris*. *Journal of Fermentation Technology*, 65(5):603-606.

GALINDO, E. (1994), Aspects of the process for xanthan production. London: Institution of Chemical Engineers, v. 72, p. 227-237.

GALINDO, E. Improved shake-flask test for the screening of xanthan producing microorganisms. *World Journal. Microbiology and Biotechnology* v.9, p.122– 4, 1993.

GARCIA, L. C.; PEREIRA, L. M. R.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; HUBINGER, M. D. Selection of an edible starch coating for minimally processed strawberry. *Food Bioprocess and Technology*, v.3, p. 834 - 842, 2010.

GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; Casas, J. A.; Gomez, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. Research review paper, *Biotechnol Advences*; 18: 1 – 31. 2000.

GARCIA-OCHOA , F. *et al.* (2000). Xanthan gum: production, recovery and properties, *Biotechnology Advances*, n. 7, v. 18, p. 549-579.

GAUDIN, S.; LOURDIN, D.; FORSELL, P. M.; COLONNA, P. Antiplasticisation and oxygen permeability of starch-sorbitol films. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v.43, p.33-37, 2000.

GAUDIN, S.; LOURDIN, D.; LE BOTLAN, D.; ILARI, J. L. Colonna P. Plasticisation and mobility in starch-sorbitol films. *Journal of Cereal Science*, London, v.29, p.273-284, 1999.

GIAVAGIS, I.; HARVEY, L. M.; McNEIL, B. Gellan gum. *Critical Reviews Biotechnonology*, 20:3, p. 177-211, 2000.

GOMES, G. V. P, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil, 2008.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J-L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, v.58, n.1, p.206-211, 1993.

GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GORRIS, L. G. M. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Food Science & Technology*, v. 29, n.1,2, p.10-17, 1996.

GUILBERT, S.; GONTARD, N. Technology and applications of edible protective films. In: *BIOTECHNOLOGY AND FOOD RESEARCH – “New shelf-life technologies an safety assessments”*, n. 7, 1995, Helsink (Finlândia). *Anais. Helsink*, p.49-60, 1995.

GUPTE, M. D.; KAMAT, M. Y. Isolation of wild *Xanthomonas* strains from agricultural produce, their characterization and potencial related to polysaccharide production. *Folia Microbiologica*, Praha, v. 42, n. 6, p. 621-628, 1997.

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

HASHEMI, M. M.; AMINLARI, M., MOOSAVINASAB, M. *Food Science and Technology*, 57, 594-602, 2014.

HASSLER, R. A.; DOHERTY, D. H. (1990), Genetic Engineering of Polysaccharide Structure: Production of Variants of Xanthan Gum, *Xanthomonas campestris*, *Biotechnology Progress*, v. 6, p. 182-187.

HASSLER, R. A.; Doherty, D. H. (1990), Título. *Biotechnology Process, Local*, v. 6, n., p. 182-187, 1990.

HATAKEYAMA, T. AND QUINN, F.X. *Thermal Analysis: Fundamentals and applications to polymer science*. New York, Jonh Wiley and Sons, 1994.

HATAKEYAMA, T.; QUINN, F. X. *Termal Analysis*. Ed. John Wiley & Sons, Grã-Bretanha, 3ª edição, 1994.

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

HELPER, G. A.; FERRÃO, M.A. ; FERREIRA, C. DE V. ; HERMES, N. Aplicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, n. 4, 2006.

HENRIKSSON, M.; Cellulose Nanofibril Networks and Composites.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P. Utilização de biofilmes na conservação pós-colheita de morango (*Fragaria ananassa* Duch) cv IAC CAMPINAS. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 19, n. 2, p. 231–233, maio/ago. 1999.

HERNÁNDEZ-URIBE, J.P. Caracterización termica y reologica de almidones de maiz aislados de diferentes híbridos. 2003. (Tesis de Licenciatura) - Universidad Autonoma del Estado de Morelos, Cuernavaca.

JANA, A.K.; GHOSH, P. 1997. Stimulation of xanthan production by *Xanthomonas campestris* using citric acid. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 13:261-264.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Carbohydrate Research, Amsterdam, v. 45, p. 275 – 285, 1975. JOHN, M. J.; THOMAS, S. Biofibres and biocomposites. Carbohydrate Polymers, 71, 343 - 364, 2008.

JOHN, M. J.; THOMAS, S. Biofibres and biocomposites. Carbohydrate Polymers, 71, 343 -364, 2008.

JOKAY, L.; NELSON, E. G.; POWELL, E. L. Development of edible amylaceous coatings for foods. Food Technology, v. 21, p. 12-14, 1967.

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

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

KENNEDY, J. F., BRADSHAW, I. J., 1984. Production, properties, and applications of xanthan. Prog. Ind. Microbiol. 19, 319–371.

KENNEDY, J.F.; JONES, P.; BAKER, A. 1982. Factors affecting microbial growth and polysaccharides production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures. Enzyme Microbiology and Technology, 4(1):39-43.

KIM, C.; YOO, B. Rheological properties of rice starch-xanthan gum mixtures. Journal of Food Engineering, v. 75, p. 120 - 128, 2006.

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

KOGAN, G.; ŠOLTÉS, L.; STERN, R.; Gemeiner, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. (2007), *Biotechnology Letters*, 29, 1, 17-25.

KOGAN, G., SADOVSKAYA, I., CHAIGNON, P., CHOKR, A. & JABBOURI, S. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol Lett* 255, 11–16.2006.

LACHKE, A. Xanthan – a versatile gum. *Resonance*, p. 25 - 33, 2004.

LEONEL, M., CEREDA, M.P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. V.22, n.1, p. 65-69, 2002.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biocologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., v.3, 125-154, 2001.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biocologia: tecnologia das fermentações*. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. v.1.

LIU, Z.; HAN, J. H. Film-forming characteristics of starch. *Journal of Food Science*, v. 70, n. 1, p. 31-36, 2005.

LOPEZ, M. J.; GARCIA, M. C. V.; ESTRELLA, F. S.; MORENO, J. Properties of xanthan obtained from agricultural wastes acid hydrolysates. *Journal of food Engineering*, 63, 111-115, 2004.

LÓPEZ, M. J.; MORENO, J.; RAMOS-CORMENZANA, A. (2001), *X. campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. *Water research*, New York, v. 35, n. 7, p. 1828-1830.

LOURDIN, D.; COIGNARD, L.; BIZOT, H.; COLONNA, P. Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials. *Polymers*, v. 38, n. 21, p. 5401-5406, 1997.

LOUZAS, A. *Biocologia Solução Nacional*. *Jornal de UNESP - SP*. Nº 187, abril. 2004.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. *Caracterização de polímeros: Determinação de Massa molecular e Análise Térmica*. Editora E-papers Serviços Editoriais. Rio de Janeiro – RJ, Brasil, p. 151-323, 2001.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. *Caracterização de Polímeros – Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica*. Rio de Janeiro: Ed. Epapers,

2001.

LUNDIN, L. AND HERMANNSON, A. M. (1995). Supermolecular aspects of xanthan-locust bean gum gels based on rheology and electron microscopy. *Carbohydr. Polym.* 26 (2), 129-40.

MAEDA ,R. N.; SERPA,V. I.; ROCHA, V. A. L. Rocha, R. A. A. Mesquita, L. M. M. Santa Anna, A. M. de Castro, C. E. Driemeier, N. Pereira Jr., I. Polikarpov, *Process Biochemistry*, 46, 1196–1201, (2011).

MALI, S.; GROSSMAN, M V. E. Effects of yam starch films on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 24, p.7055-7011, 2003.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Effects of yam starch films on storability and quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, p.7055-7011, 2003.

MANO, E. B. *Introdução a Polímeros*. 2ª ed., Edgard Blücher: São Paulo, 1985.

MARGARITIS, A.; PACE, G. W. Microbial polysaccharides. In: Moo-Young, M., *Comprehensive Biotechnology*. Oxford: Pergamon Press, p.1006-1041, 1985.

MARSUL Proteínas Ltda. Ficha técnica de proteína texturizada de soja. [S.l.], 2004.
Meyer, E. L.; Fuller, G. G.; Clark, R. C.; Kulicke, W. M. Investigation of xanthan gum solution behavior under shear-flow using rheoptical techniques. *Macromolecules*, 26(3):504-511. 1993.

MAUGERI, F. (2001), *Produção de Polissacarídeos*. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, v. 3, p.125-150.

MATOS, T. A. MATOS, (2005), *Curso sobre tratamento de resíduos agroindustriais*, Universidade Federal de Viçosa.

MATTA JUNIOR M. D. *Caracterização de Biofilmes Obtidos a Apartir de Amido de Ervilha Associado à Goma Xantana e Glicerol*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo. Piracicaba- São Paulo. 2009.

MEADOWS, C. *The effects of ageing on biodegradable starch plastic films*. 1998. Thesis (Bachelor of Engineering) - The University of Queensland, Austrália.

MEDEIROS, A. S; MOREIRA, A. S; VENDRUSCOLO, C. T; CONCEIÇÃO, J. J; VENDRUSCOLO, J. L. Influência do método de recuperação e purificação de xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 06. In: *Anais do XVII Congresso de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 3, 2000.

MESOMO, M. C.; SILVA, M. F.; PADILHA, F. F.; BONI, G.; LUCCIO, M. D.;

TREICHEL, H. (2007), Otimização da produção de goma xantana em biorreator utilizando meio à base de soro de queijo. XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, Curitiba, Paraná.

MEYER, E.L.; FULLER, G.G.; CLARK, R.C.; KULICKE, W.M. (1993), Investigation of xanthan gum solution behavior under shear-flow using rheo-optical techniques. *Macromolecules* 26, 3:504-11.

MILAS, M.; RINAUDO, M. Conformational investigation on the bacterial polysaccharide xanthan. *Carbohydrate Research*, Kidlington, v. 76, p. 189 – 196, 1979.

MISAKI, A. Structural Aspects of Some Functional Polysaccharides. In: Nishinari, K.; DOI, E. *Food hydrocolloids: structures, properties, and functions*. New York: Plenum Press, 1993. p.1-19.

MORAINE, R. A.; ROGOVIN, P. Kinetics of the Xanthan Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 15, p. 225-237, 1973.

MORAINE, R. A., ROGOVIN, P. Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH control. *Biotechnology and Bioengineering*, v.13, p.381-391, 1971.

MOREIRA, A. N.; DEL PINO, F. A.; VENDRUSCOLO, C. T. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através da inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia sp 7070*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23:2, p. 300-305, 2003.

MOREIRA, A.S. Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. 2002. 73f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, UFPel, 2002.

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

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

MORRIS, E. R. (1995), Polysaccharide rheology and in mouth perception. In: STEPHEN, A. M. *Food Polysaccharides and their Application*, 654 p.

MORRIS, E. R. Rheology of hydrocolloids. In: Phillips, G. O.; Wedlock, D. J.; Williams, P.A. *Gums and stabilisers for the food industry*. Oxford: Pergamon Press, 1984.

MORRIS, E. R. Molecular origin of xanthan solution properties. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, Washington, v. 172, p. 19 – 19, 1976.

NACHTIGALL, A. M., SOUZA, E. L., MALGARIM, M. B., ZAMBAZI, R. C. Geléias Light de Amora-Preta. B. CEPPA, Curitiba, v. 22, nº 2, p. 337 – 354, jul – dez. 2004.

- NAVARRO, F. N. Fundamentos de reologia de polímeros. EDUCS: Caxias do Sul, 1997.
- NERY, T. B. R.; CRUZ, A. J. G.; DRUZIAN, J. I. Use of Green Coconut Shells as an Alternative Substrate for the Production of Xanthan Gum on Different Scales of Fermentation. *Polímeros*, vol. 23, n. 5, p. 602-607, 2013.
- NERY, T. B. R.; BRANDÃO, L. V.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. *Química Nova*, v. 31, n. 8, p. 1937-1941, 2008.
- NERY, T. B. R. (2007), Estudo da Produção e Caracterização de Goma Xantana obtida com novas culturas liofilizadas de *Xanthomonas campestris* pv. utilizando resíduos industriais. *Dissertação de Mestrado*. Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, 108 p.
- NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L.F. (2001), Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. Campestris* C7L. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, 21:1,82-85.
- NITSCHKE, M.; THOMAS, R.W.S.P. Xanthan gum production by wild-type isolates of *Xanthomonas campestris*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 11, n. 5, p. 502-504, 1995.
- NUNESMAIA, M. F. A Gestão de Resíduos Urbanos e Suas Limitações. *TECBAHIA Revista Baiana de Tecnologia*, v.17, n.1, p.120-129. 2002.
- NUSSINOVITCH, A. 1997. Hydrocolloid application – Gum technology in the food and other industries. Londres, Blackie Academic e Professional, p. 155-169, 354 p.
- NUSSIO, L.G. Efeitos de níveis de concentrado sobre o desempenho de bovinos e digestibilidade de dietas a base de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp L.) tratado sob pressão de vapor. Piracicaba, SP: ESALQ, 1993. 147p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo, 1993.
- OLIVEIRA, L.H.S.; DIAS, F.G.; DUARTE, I.C.S.; OLIVA-NETO, P.; CRUZ, R.; MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, C.T. 2000. Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de goma xantana. *Revista Científica Plural*, 1:115-120.
- OLIVEIRA, L. M. et al. Ensaios para avaliação de embalagens plásticas flexíveis. Campinas: Centro de Tecnologia de Embalagem, CETEA, 1996. 219 p.
- OLIVEIRA, M. A.; CEREDA, M. P., Efeito da película de mandioca na conservação de goiabas. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2, 1-2, 97-102, 1999.
- ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. (2006). *Biomateriais: Fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- ORÉFICE R. L.; PEREIRA M. M. P.; MANSUR H. S.. "Biomateriais - Fundamentos e Aplicações". 538 páginas. Editora Cultura Médica (2005).

PACE, G. (1991), Polímeros microbianos. In : BU'LOOCK, John ; KRISTIANSEN, Bjorn. *Biotecnología Básica*. Traducción : Paloma Liras Padín. Zaragoza: Acribia, p. 449-462.

PACE, G. W.; RIGHELATO, R. C. (1981), Production of extracellular microbial polysaccharides. *Advances in Biochemical Engineering*, v. 15, p. 41- 70.

PADILHA, F.F. Produção de Biopolímeros por Microorganismos Modificados Geneticamente. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2003.

PARETA, R.; EDIRISINGHE, M. J. A novel method for the preparation of starch films and coatings. *Carbohydrate Polymers*, v. 63, p. 425 - 431, 2006.

PARKER, R.; RING, S. G. Aspects of the physical chemical of starch. *Journal of Cereal Science*, v. 34, p. 1-17, 2001.

PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S.K.; BATSILAS, L.; PARAS, S.V.; KYRIAKIDIS, D.A.; LIAKOPOULOUK YRIAKIDES, M. 2001. Xanthan production by *X. campestris* in batch cultures. *Process Biochemistry*, 37(1):73-80.

PARRA, D. F.; TADINI, C. C.; PONCE, P.; LUGÃO, A. B. Water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films. *Carbohydrate Polymers*, 58, 7, 475-481, 2004.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; Mohan, R. (2000), *Bioresouce Technology*, v. 74, p. 81-87.

PETERS, H. U., H. HERBST, P. G. M. HESSELINK, H. LUNSDORF, A. SCHUMPE, W.D. DECKWER. (1989), The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*, *Biotechnol. Bioeng.*, v. 34, p. 1393–1397.

PETTITT, D. J. 1982. Xanthan gum. In: M. GLICKSMAN (ed.), *Food Hydrocolloids*. Boca Raton, Ed. CRC Press, vol. 1, p. 127-149.

PINHO, J. de J. R. G. Desenvolvimento de comprimidos de cloridrato de metformina de liberação convencional e modificada: influência dos excipientes sobre o perfil de dissolução e avaliação termoanalítica. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos. Universidade de São Paulo - USP, 1999.

POLYMERS. Virtual Text of Organic Chemistry. Disponível em: < <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/polymers.htm>>. Acesso em: 15 jan 2012.

PONS, A.; DUSSAP, C.G.; GROS, J.B. 1990. Xanthan batch fermentations: Compared performance of a bubble column and a stirred tank fermentor. *Bioprocess Engineering*, 5:107-114.

- PONS, A.; DUSSAP, C.G.; GROS, J.B. 1989. Modelling *X. campestris* batch fermentation in a bubble column. *Biotechnology Bioengineering*, 33:394-405.
- POOJA, D.; PANYARAM, S.; KULHARI.; RACHAMALLA, H. S. S.; SISTLA, R. *Carbohydrate Polymers*, 110, 1-9, (2014).
- PORTILHO, M. Avaliação da produção de exopolissacarídeo insolúvel por duas linhagens de *Agrobacterium sp.* Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de ciência de alimentos, UNICAMP, p 86. 2002.
- POTULSKI, D. C. EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE MICROFIBRILAS DE CELULOSE SOBRE AS PROPRIEDADES DO PAPEL. Dissertação de Mestrado, Mestrado em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, 73 p, 2012.
- PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e Intermediários Químicos. São Paulo: CGEE, 119p. 2006.
- PREPARATION, STRUCTURE AND PROPERTIES. American Chemical Society Publications. 2008.
- PSOMAS, S.K; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D.A.. Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. v. 35 p. 273–280, 2007.
- RAO, Y. M.; SURESH, A. K.; SURAIHKUMAR, G. K. Free radical aspects of *Xanthomonas campestris* cultivation with liquid phase oxygen supply strategy. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1301-1310, 2003.
- RAO, M.A. Rheology of fluid and semisolid foods: principles and applications. New York: Aspen Publishers, p. 433, 1999.
- ROCKS, J.K. Unusual rheological properties and heat, acid, and salt stabilities make glucose-derived hydrocolloid a versatile food additive. *Food Technology*, v. 25, p. 476-484, 1971.
- ROSALAM, S. and ENGLAND, R. (2006), Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris sp.*, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 197– 207.
- ROTTAVA, I. (2005), Seleção de linhagens de *Xanthomonas sp* para produção de goma xantana. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil, 95p.
- REGULY, J. C. Biotecnologia dos processos fermentativos. v.3. Pelotas: Gráfica Universitária, 218p, 2000.
- SANDERSON, G.R. Polysaccharides in foods. *Food Technology*, v.35, n.7, p.50-57, 83, 1981.

SANDFORD, P. A. AND BAIRD, J., Industrial utilisation of polysaccharides. In *The Polysaccharides*, Vol. 2, ed. G. O. Aspinall. Academic Press, New York, pp. 419–485. 1983.

SANDFORD, P. A. (1979), Exocellular microbial polysaccharides. *Advance in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v. 36, p. 265-313.

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; MANFREDI, M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; CALDAS, C. S.; SOARES, F. E. F. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. *Quim. Nova*, Vol. 37, No. 1, 56-62, 2014.

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T.; *Quim. Nova* 2012, 26, 1004.

SANTOS-EBINUMA, V. C.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; PESSOA JR, A. Improving of Red Colorants Production by a New *Penicillium purpurogenum* Strain in Submerged Culture and the Effect of Different Parameters in Their Stability, *Biotechnol. Prog.*, 2013, Vol. 29, No. 3, 778-785.

SARANTÓPOULOS, C. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V. & GARCIA, E. E. C. - "Embalagens Plásticas Flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades", CETEA/ ITAL, Campinas (2002).

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

SEGAL, L.; CREELY, J.; MARTIN JR., A. E; CONRAD, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, v. 29, p. 786–794, 1959.

SENAI, Resposta Técnica – Alimentos e Bebidas. Rio Grande do Sul, 31 de maio. 2005 a.

SERRA, A.C.S., A influência de aditivos de lama de perfuração sobre as propriedades geoquímicas de óleos. Rio de Janeiro: Tese de doutorado-UFRJ. 2003. 163p.

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

SHAW, D. J. (1975), Introdução a química dos colóides e de superfícies. São Paulo: Edgard Blucher, p. 180.

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

SILVA, J. B. A.; PEREIRA, F. V.; DRUZIAN, J.I.D. Journal of Food Science. (2012).

SILVA, L. F.; ALVES, F. G.; RODRIGUES A. Á. ; MOREIRA, A. S. ; VENDRUSCOLO, C. T. . Caracterização do Caldo Fermentado de *Xanthomonas arboricola pv pruni* submetido à Tratamento Térmico. In: CIC UCPel - 17º Congresso de Iniciação Científica, 7ª Mostra de Pós-Graduação, 4ª Mostra de Extensão, 2008, Pelotas. CIC UCPel - 17º Congresso de Iniciação Científica, 7ª Mostra de Pós-Graduação, 4ª Mostra de Extensão, 2008.

SILVA, M. F.; FORNARI, R. C. G.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F. F. & CICHOSKI, A. J. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. J. Food Eng. 90, p.119 (2009).

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Tradução: Ricardo Bicca de Alencastro – Rio de Janeiro: LTC, p. 70-122, 2007.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.; CLAYTON; MORRIL, TERENCE C. Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1994. 387p.

SIQUEIRA, J. F.:(2011). Prospecção e síntese de poli(ácido láctico) para desenvolvimento de suportes na engenharia tecidual / Juliana de Faria Siqueira. -- Campinas, Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

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

SOARES, R.M.D., LIMA, A.M.F., OLIVEIRA, R.V.B., et al., "Thermal degradation of biodegradable edible films based on xanthan and starches from different sources", Polymer degradation and stability, v.90, pp. 449-454, 2005.

SOBRAL, P. J. A. Proteínas de origem animal na tecnologia de biofilmes. Tese de Livre Docência, Universidade de São Paulo, Pirassununga - SP, 2000.

SOBRAL, P. J. A. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. Ciência & Engenharia, Uberlândia, v. 8, n. 1, p. 60-67, 1999.

SOUW, P.; DEMAIN , A. L. (1979), Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Applied and Environmental Microbiology, v. 37, n. 6, p.1186-1192.

SOY Protein Council. (1997), Soy protein products: characteristics, nutritional aspects and utilization. [S.l.].

SPENCE, K. L. Processing and Properties of Microfibrillated Cellulose. 2011. 269p. Dissertação (PhD Forest Biomaterials) - North Carolina State University.

SPENCE, K. L.; VENDITTI, R. A.; HABIBI, Y.; ROJAS, O. J.; PAWLAK, J. J.. Aspects of Raw Materials and Processing Conditions on the Production and Utilization of Microfibrillated Cellulose. International Conference of Nanotechnology for the Forest Products Industry. Technical Advances and Applications in Nanotech Products. Otaniemi, Espoo, Finland. 2010.

SPENCE, K. L.; VENDITTI, R. A.; HABIBI, Y.; ROJAS, O. J.; PAWLAK, J. J..

STEFFE, J. F. (1996), Rheological Methods in Food Process Engineering. Michigan: Ed. Freeman Press, p.428.

STREDANSKY, M., & CONTI, E. Xanthan production by solid state fermentation. Process Biochemistry, 34, 581–587. 1999a.

STREDANSKY, M., CONTI, E., NAVARINI, L., & BERTOCCHI, C. Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. Process Biochemistry, 34, 11–16. 1999b.

SUN, S; SONG, Y.; ZHENG, Q., Thermo-molded wheat gluten plastics plasticized with glycerol: Effect of molding temperature. Food Hydrocolloids, 22, 6, 1006-1013, 2008.
Vicentini, N. M.; Cereda, M. P.; Câmara, F. L. A., Revestimentos de fécula de mandioca, perda de massa e alteração da cor de frutos de pimentão. Scientia Agrícola, 56, 3, 713-716, 1999.

SUTHERLAND, I. W. (2001), Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. International Dairy Journal, Kidlington, v. 11, p. 663-674.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. Trends Biotechnology, 16, 41 – 46. 1998.

SUTHERLAND, I. W.; KENNEDY, L. 1996. Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas* spp. Microbiology, 142:867-872.

SUTHERLAND, I.W.; Tait, M.I. Biopolymers. Encyclopedia of Microbiology, 1992, 1, p.339-349.

SUTHERLAND, I. W. (1990). Biotechnology of Exopolysaccharides. Cambridge: Cambridge University Press.

SUTHERLAND, I. W. (1983), Extracellular polysaccharide. In: REHM, H. J.; REED, G. (Ed.). Biotechnology. Weinheim: Verlag Chemie, v. 3, p. 531-574.

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

THIRRE, R.M.S.M.; SIMAO, R.A.; ANDRADE, C.T. High resolution imaging of the

- microstructure of maize starch films. *Carbohydrate Polymers*, v.54, p.149-158, 2003.
- TIMMER, P.V., Zitko, SE, Gottwald, TR, e Graham, JH *Phytophthora podridão parda de citros: temperatura e umidade efeitos sobre a infecção, produção esporângio e dispersão. Doença de planta* 84:157-163, 2000.
- TORVINEN, K.; HELIN, T.; KIISKINEN, H.; HELLÉN, E.; HOHENTHAL, C.; KETOJA, J. TAPPI. *International Conference on Nanotechnology for Renewable Materials*, 2011.
- URLACHER, B.; DALBE, B. 1992. Xanthan gum. In: A. IMESON (ed.), *Thickening and Gelling Agents for foods*. Londres, Blackie Academic Professional, p. 206-226.
- VAN SOEST, P.J. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants: voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. *Journal of Animal Science*, v.24, p.834-843, 1965.
- VASCONCELOS, S. M.; SANTOS, A. M. P.; ROCHA, G. J. M. R. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. *Bioresource Technology*, 135, 46–52, 2013.
- VEIGA-SANTOS, P., OLIVEIRA, L., CEREDA, M., ALVES, A., SCAMPARINI, A. Mechanical properties, hydrophilicity and water activity of starch-gum films: effect of additives and deacetylated xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 341 – 349, 2005.
- VEIGA-SANTOS, P.; SCAMPARINI, A. R. P. Indicador irreversível de temperatura utilizando carboidratos. Patente protocolizada n. 4.315. (INPI). 23/08/2004.
- VÉLEZ, G.; FERNANDEZ, M.A.; MUÑOZ, J.; WILLIAMS, P.A.; English, R.J. 2003. Role of hydrocolloids in the creaming of oil in water emulsions. *Agricultural and Food Chemistry*, 51:265-269.
- VENDRUSCOLO, C. W. Goma xantana e galactomanana (M. scabrella): desenvolvimento de matrizes hidrofílicas para liberação modificada de teofilina. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, 2005.
- VENDRUSCOLO, C.T.; FORESTI, A.P.; MOREIRA, A.S. 2002. Utilização de fibra de soja para redução de custo no processo de obtenção de xantana. In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre, 2002, p. 1074-1077.
- VERGELATI, C.; PEREZ, S. Molecular modelling of the xanthan chain conformations. *International Journal of Biological Macromolecules*, Amsterdam, v.9, p.211-218, 1987.
- VICENTINO, S. L.; FLORIANO, P. A.; DRAGUNSKI, D. C. Filmes de amidos de mandioca modificados para recobrimento e conservação de uvas. *Química Nova*, Vol. 34, No. 8, 1309-1314, 2011.
- VILLETTI, M.A., CRESPO, J.S., SOLDI, M.S. "Thermal degradation of natural polymers", *Journal of thermal analysis and calorimetry*, v. 67, pp. 295-303, 2002.

WANG, B.; SAIN, M.. Isolation of nanofibers from soybean source and their reinforcing capability on synthetic polymers. *COMPOSITES SCIENCE AND TECHNOLOGY*. V.67, p.2521–2527, 2007.

WANG, S.; CHENG, Q.; RIALS, T. G.; LEE, S. H. Cellulose microfibril/nanofibril and its nanocomposites. 8 Pacific Rim Bio-Based Composites Symposium. Tennessee Forest Products Center, University Tennessee, 2006.

WHISTLER; J.N.; BEMILLER, R.L. 1993. Xathan, gellan, wellan, e rhamosan. In: Kang, K.S.; Pettit, D.J., *Industrial gums – Polysaccharides and their derivatives*. New York, Academic Press, p. 342-371.

WOIECHOWSKI. A. L. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 153p, 2001.

XIE, M.H; XIA, J. Y; ZHOU, Z; ZHOU, G.Z; CHU, J; ZHUANG, Y. P. Power consumption, local and average volumetric mass transfer coefficient in multiple-impeller stirred bioreactors for xanthan gum solutions. *Chemical Engineering Science*, 106, 144-156, 2014.

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

YAKIMETS , I., PAES, S. S., WELLNER, N., SMITH , A. C., WILSON, R. H., & MITCHELL , J. R. (2007).Effect of water content on the structural reorganization and elastic properties of biopolymer films: A comparative study. *Biomacromolecules*, 8, 1710–1722.

YANO, H.; NAKAGAITO, A. N.; IWAMOTO, S.. Nano-fibrillation of pulp fibers for the processing of transparent nanocomposites. *Applied Physics A – Materials Science & Processing*. n.89, p. 461–466, 2007.

YANO H.; NAKAGAITO A. N.. The effect of morphological changes from pulp fiber towards nano-scale fibrillated cellulose on the mechanical properties of high-strength plant fiber based composites. *Applied Physics A – Materials Science & Processing*. n.78, p. 547–552. 2004.

YOO, S.D.; HARCUM, S.W. Xanthan gum production from waste sugar beet pulp. *Bioresource Technology*. v.70, n.1, p.105-109, 1999.

YOSHIMURA, M; TAKAYA, T.; NISHINARI, K. Effects of xyloglucan on the gelatinization and retrogradation of corn starch studied by rheology and differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, v.13, n. 2, p.101 - 111, 1999.

YOUNG, H. Fractionation of starch. In: WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J.N.; PASCHALL, E.F. (Ed). *Starch Chemistry and Technology*. 2.ed. Orlando (USA): Academic Press, 1984. p.249-283.

YOUNG, H. Fractionation of starch. In: WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J.N.; PASCHALL, E.F. (Ed). Starch Chemistry and Technology. 2.ed. Orlando (USA): Academic Press, 1984. p.249-283.

ZOHURIAAN, M. J., SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. Polym. Test., 23, 575-579, 2004.