



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**IGOR CARVALHO FONTES SAMPAIO**

**PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM REATOR AERADO**  
**UTILIZANDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE ENERGIA**

Salvador

2021

**IGOR CARVALHO FONTES SAMPAIO**

**PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM REATOR AERADO UTILIZANDO  
RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE ENERGIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

Salvador

2021

S192 Sampaio, Igor Carvalho Fontes.

Produção de goma xantana em reator aerado utilizando resíduos da indústria de energia/Igor Carvalho Fontes Sampaio. – Salvador, 2021.  
80 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021.

Inclui referências.

1. Água produzida. 2. *Xanthomonas campestris*. 3. Glicerina bruta.  
4. Estresse celular. 5. Espectroscopia Raman. I. Almeida, Paulo  
Fernando de. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 577.1

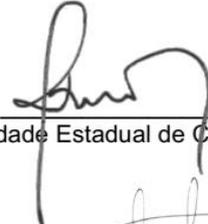
## IGOR CARVALHO FONTES SAMPAIO

### Produção de goma xantana em reator aerado utilizando resíduos da indústria de energia

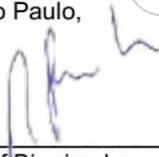
Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

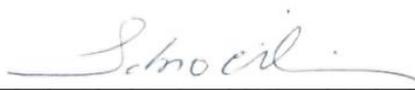
Aprovada em 21 de junho de 2021.

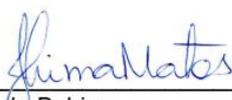
#### BANCA EXAMINADORA:

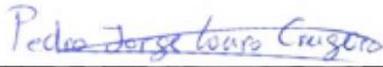
Paulo Fernando de Almeida – Orientador   
Doutor em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas,  
UNICAMP, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.

Landulfo Silveira Junior   
Doutor em Ciências pela Universidade de São Paulo,  
USP, Brasil.  
Universidade Anhembi Morumbi.

Antônio Luiz Barbosa Pinheiro   
Doutor em Clinical Dentistry pela University Of Birmingham,  
UBHAM, Inglaterra.  
Universidade Federal da Bahia.

Fábio Alexandre Chinalia   
Doutor em Environmental Microbiology pela University of Aberdeen,  
ABDN, Escócia.  
Universidade Federal da Bahia.

Josilene Borges Torres Lima Matos   
Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia,  
UFBA, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.

Pedro Jorge Louro Crugeira   
Doutor em Biotecnologia pela RENORBIO/Universidade Federal da Bahia,  
UFBA, Brasil  
Universidade Federal da Bahia.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Doutor Paulo Almeida, pelas oportunidades proporcionadas, pela orientação, ensinamentos e condução rumo à concretização do projeto, sem o qual não teria ocorrido. Ao professor Doutor Paulo Almeida, o qual ao longo de 9 anos, participou direta e indiretamente de minha formação, conduzindo-me à sabedoria. Ao professor Doutor Antônio Luiz Barbosa Pinheiro, pelos ensinamentos, ajuda na condução desse trabalho e que, por seu empenho, viabilizou a escrita e publicação célere de um artigo científico. Ao professor Doutor Fabio Alexandre Chinalia, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pela correção de artigos e ajuda na condução dos trabalhos. À professora Doutora Josilene Borges Torres Lima Matos, por todos os ensinamentos e ajuda na condução da pesquisa. À equipe do Centro de Biofotônica, em especial ao Doutor Guilherme Pinheiro e ao Pedro Crugeira, pela ajuda com os experimentos de Espectroscopia Raman. Ao professor Doutor Landulfo Silveira, que ajudou a viabilizar a análise e escrita da publicação. À Joalene Ferreira e ao Pedro Crugeira pelos muitos experimentos, pela amizade e ajuda na condução dessa jornada. Aos estudantes de Iniciação científica Hévlín, Yasmin e a todos que me ajudaram e participaram dessa pesquisa. Ao Jacson Nunes, pela ajuda no laboratório. Ao Edmundo, por sempre estar disposto a ajudar. À toda equipe do LABEM, pelos bons momentos proporcionados e ajuda na condução do projeto. À toda equipe do projeto “Alternativas biotecnológicas sustentáveis para aumento do fator de recuperação de petróleo de reservatórios carbonáticos”. À Petrogal, pelo financiamento do projeto, bolsas de estudos e viabilização de sua realização. Ao corpo de professores do Instituto de Ciências da Saúde. Ao LAMUME/UFBA, pelas análises de microscopia eletrônica. À Isabela, pela amizade, companheirismo e alegria proporcionada. À minha família e aos meus pais, Aurélio e Vanilda pelos ensinamentos, apoio e confiança. Aos meus avós, Vivaldo e Lourdes.

SAMPAIO, Igor Carvalho Fontes. Produção de goma xantana em reator aerado utilizando resíduos da indústria de energia. 2021. Orientador: Paulo Fernando de Almeida. 80 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2021.

## RESUMO

O gerenciamento sustentável da água produzida (AP) e a recuperação de petróleo representam grandes desafios à indústria de petróleo. Por esses motivos, avaliou-se uma estratégia biotecnológica para reúso da AP com a produção simultânea de goma xantana por *Xanthomonas campestris* em culturas contendo AP em distintas concentrações (10, 15, 25, 50 e 100%) ou AP dialisada (APD), sacarose, glicerina bruta e constituintes de meio salino mineral, bem como a aplicação do estresse celular alcalino e do surfactante Triton X-100. Esse trabalho se propõe a resolver as limitações de uso da AP e produção de goma xantana para reaproveitá-los na cadeia extrativa de petróleo. Foi constatada produção de xantana até a concentração de AP25%, sendo superior aos achados com o controle produzido em meio com água destilada (AD), esse último semelhante à produção com APD (8,55 g/L). Em reator aerado, APD produziu 17,3 g/L de goma xantana contra os 13,9 g/L obtidos com AD ( $p < 0,01$ ). Houve redução da viscosidade de goma xantana com o aumento da concentração de AP, bem como a incorporação na goma xantana de sais e metais oriundos da AP, como verificado por meio das técnicas de espectroscopia de raios X por dispersão em energia e microscopia eletrônica de varredura. AP10% resultou em soluções com viscosidade total de 308 mPa.s/L, semelhante a AD (320 mPa.s/L), mas superior a AP25% (58,7 mPa.s/L), sugerindo o uso de AP10% para produções sem a prévia diálise. Resultados termogravimétricos indicam maior termoestabilidade da xantana produzida com APD que o controle comercial. A análise por Espectroscopia Raman demonstrou que os produtos apresentaram perfil químico característico de xantana e a intensidade do pico de  $\sim 1090 \text{ cm}^{-1}$  indicou que a concentração de AP influenciou a composição molecular da goma xantana, especialmente quanto à redução do teor de constituintes de xantana (glicose, manose, ácido glicurônico) e aumento do teor de piruvato. O estresse alcalino (pH 9,5) aumentou a população microbiana ( $p < 0,01$ ), bem como a produção de goma xantana de baixa viscosidade com o uso de AD e AP15%, a exceção de APD que resultou em maior produção e viscosidade de goma xantana ( $p < 0,0001$ ). A cultura também demonstrou tolerância frente à

aplicação do surfactante Triton X-100, resultando em aumento da viscosidade da goma xantana quando utilizada a concentração de 0,5% do surfactante nos meios de produção com AD e APD, sugerindo melhora das interações intermoleculares da goma xantana. A associação do estresse alcalino e aplicação do surfactante apresentou como melhores resultados o aumento da produção de goma xantana em 88,7% e da viscosidade de suas soluções em 190,4% ( $p < 0,0001$ ), no meio contendo APD, produto esse contendo todas características espectrais de goma xantana, como observado por Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. Não obstante a elevada salinidade, foi demonstrada a produção de goma xantana em AP, bem como a influência desse constituinte na composição molecular, reologia e termoestabilidade da goma xantana. A tecnologia desenvolvida “*surfactant/alkali-stress*” possibilitou o aumento do rendimento e viscosidade de goma xantana para aplicação na cadeia extrativa de petróleo.

**Palavras-chave:** Água produzida. *Xanthomonas campestris*. Glicerina bruta. Estresse celular. Espectroscopia Raman.

SAMPAIO, Igor Carvalho Fontes. Production of xanthan gum in an aerated reactor using wastes from the energy industry. 2021. Thesis advisor: Paulo Fernando de Almeida. 80 s. ill. Thesis (Doctor in Biotechnology) – Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2021.

## ABSTRACT

Sustainable produced water (PW) management and oil recovery pose major challenges to the oil industry. Was evaluated a biotechnological strategy for PW reuse and the simultaneous production of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* in cultures containing PW at different concentrations (10, 15, 25, 50 and 100%) or dialyzed PW (DPW), sucrose, crude glycerin and mineral saline medium constituents, as well as an alkaline cellular stress and the Triton X-100 surfactant application. This work aims to solve the limitations in PW use and the xanthan gum production to reuse them in the oil extractive chain. Xanthan production was achieved up to PW25% concentration and it was higher than the findings with the control medium with distilled water (DW), which was similar to the production with DPW (8.55 g/L). DPW yields 17.3 g/L of xanthan gum in an aerated reactor against 13.9 g/L obtained with DW ( $p < 0.01$ ). There was a reduction in the viscosity of xanthan gum with the increase of PW concentration, as well as the incorporation of salts and metals from PW into xanthan gum, as verified through the techniques of energy dispersion X-ray spectroscopy and scanning electron microscopy. PW10% resulted in solutions with a total viscosity of 308 mPa.s/L, a similar value obtained with DW (320 mPa.s/L), but higher than PW25% (58.7 mPa.s/L). This suggests the use of PW10% for productions without a prior dialysis. Thermogravimetric results indicated a greater thermostability of the xanthan produced with DPW than the commercial control. Raman spectroscopy analysis of the products showed a chemical profile characteristic of xanthan and the peak intensity of  $\sim 1090 \text{ cm}^{-1}$  indicated that the PW concentration influenced the molecular composition of the xanthan gum, especially regarding the reduction in xanthan constituents' content (glucose, mannose, glucuronic acid) and an increased pyruvate content. Alkaline stress (pH 9.5) enhanced the microbial population ( $p < 0.01$ ) and the production of low-viscosity xanthan gum with the use of DW and PW15%, but DPW resulted in higher production and viscosity of xanthan gum ( $p < 0.0001$ ). The microbial culture showed tolerance to the application of the Triton X-100 surfactant, resulting in an increase in the viscosity of the xanthan gum when using the surfactant at a concentration of 0.5% in the production media with DW and DPW. It

suggests an improvement in the intermolecular interactions of the xanthan gum. The combination of alkaline stress and surfactant showed as best results the increasing of xanthan gum production by 88.7% and the viscosity of its solutions by 190.4% ( $p < 0.0001$ ) in the medium containing DPW and Fourier Transform Infrared Spectroscopy showed all the spectral characteristics of xanthan gum in the products. Despite the high salinity, it was demonstrated the production of xanthan gum in PW as well as the influence of this constituent in xanthan molecular composition, rheology and thermostability. The developed technology “surfactant/alkali-stress” made it possible to increase the yield and viscosity of xanthan gum for the application in the petroleum extractive chain.

**Keywords:** Produced water. *Xanthomonas campestris*. Crude glycerin. Cell stress. Raman Spectroscopy.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura molecular da goma xantana. ....	17
<b>Figura 2</b> - Representação dos experimentos de produção em frascos de agitação. ....	22
<b>Figura 3</b> - Esquema dos testes conduzidos nesse trabalho. ....	25
<b>Figura 4</b> - Experimento de estímulo microbiano por estresse alcalino e aplicação de surfactante. ....	27
<b>Figura 5</b> - Coloração com laranja de acridina de <i>Xanthomonas campestris</i> . ....	29
<b>Figura 6</b> - Possíveis efeitos da AP sob <i>Xanthomonas campestris</i> . ....	30
<b>Figura 7</b> - Produção de goma xantana em distintas concentrações de AP. ....	31
<b>Figura 8</b> - Teste de produção em biorreator, com e sem correção de pH em batelada de 24 h. ....	33
<b>Figura 9</b> - Aspecto do caldo de produção. ....	33
<b>Figura 10</b> - Produção de goma xantana em biorreator. ....	35
<b>Figura 11</b> - Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios X por dispersão em energia. ....	37
<b>Figura 12</b> - Teor total de Carbono e Oxigênio e sais e metais determinado por Espectroscopia de raios X em dispersão de energia. ....	38
<b>Figura 13</b> - Termogravimetria (TGA) e suas derivadas (dTGA). ....	39
<b>Figura 14</b> - Espectroscopia Raman. ....	41
<b>Figura 15</b> - Quantificação microbiana antes, após e ao final de um cultivo em condição de estresse alcalino. ....	42
<b>Figura 16</b> - Produção de goma xantana sob condição de estresse alcalino. ....	44
<b>Figura 17</b> - Mecanismos de estresse alcalino e seus efeitos sob a produção de goma xantana. ....	47
<b>Figura 18</b> - Triagem das concentrações de Triton X-100 sob <i>Xanthomonas campestris</i> . ....	49
<b>Figura 19</b> - Efeito do surfactante Triton X-100 sob <i>Xanthomonas campestris</i> . ....	50
<b>Figura 20</b> - Efeito simultâneo do estresse alcalino e surfactante sob a produção de goma xantana. ...	51
<b>Figura 21</b> - Efeito de surfactante em <i>Xanthomonas campestris</i> . ....	53
<b>Figura 22</b> - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. ....	54
<b>Figura 23</b> - Efeitos positivos ou negativos das variáveis sob os parâmetros avaliados no projeto de doutorado. ....	55

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>14</b>
3.1 GERAL .....	14
3.2 ESPECÍFICOS .....	14
<b>4. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
4.1 ÁGUA PRODUZIDA .....	15
4.2 EXOPOLISSACARÍDEOS .....	16
4.3 GOMA XANTANA .....	16
4.4 ESTÍMULO POR ESTRESSE ALCALINO E SURFACTANTE.....	19
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
5.1 COLETA E ANÁLISE DA ÁGUA PRODUZIDA.....	19
5.2 MICRORGANISMO E PREPARO DE INÓCULO .....	20
5.3 EXPERIMENTOS DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM FRASCOS DE AGITAÇÃO.....	21
5.4 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM BIORREATOR DE TANQUE AGITADO .....	22
5.5 ANÁLISE GRAVIMÉTRICA E DE VISCOSIDADE .....	23
5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA .....	23
5.7 TERMOGRAVIMETRIA .....	24
5.8 ESPECTROSCOPIA RAMAN DAS AMOSTRAS DE GOMA XANTANA .....	24
5.9 PRODUÇÃO EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE ALCALINO E ADIÇÃO DE SURFACTANTE.....	25
<b>5.9.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier</b> .....	<b>26</b>
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA PRODUZIDA.....	27
6.2 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA .....	30
<b>6.2.1 Experimentos em frascos agitados</b> .....	<b>30</b>
<b>6.2.2 Experimentos em biorreator</b> .....	<b>32</b>
6.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA E ESPECTROSCOPIAS DE DISPERSÃO DE RAIOS X.....	36
6.4 TERMOGRAVIMETRIA .....	39

6.5	ESPECTROSCOPIA RAMAN .....	40
6.6	ESTRATÉGIAS PARA ESTÍMULO MICROBIANO E PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA.....	42
6.6.1	Estresse alcalino.....	42
6.6.2	Adição de surfactante.....	47
6.6.3	Estresse alcalino e adição de surfactante simultaneamente .....	50
6.6.4	Análise dos produtos por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....	53
7.	CONCLUSÃO .....	55
8.	REFERÊNCIAS .....	57
9.	APÊNDICES.....	77
9.1	APÊNDICE I: COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DE MANUSCRITO .....	77
9.2	APÊNDICE II: COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DE CAPÍTULO .....	78
9.3	APÊNDICE III: COMPROVANTE DE DEPÓSITO DE PATENTE I.....	79
9.4	APÊNDICE IV: COMPROVANTE DE DEPÓSITO DE PATENTE II .....	81

## 1. INTRODUÇÃO

A água é crucial para a produção industrial, seja de papel, têxteis, geração de eletricidade, mineração, exploração de óleo e gás, ou farmacêutica. Estima-se que a demanda global de água seja de 4600 km<sup>3</sup> por ano e projeta-se que alcance cerca de 6000 km<sup>3</sup> em 2050. Desse montante, cerca de 20% corresponde à demanda da indústria (BORETTI; ROSA, 2019). Por esses motivos, novas tecnologias para o reaproveitamento de água são essenciais, a fim de reduzir os custos de produção industrial e conservar esse recurso que tende a se tornar cada vez mais escasso.

Dentro dessa temática tem-se a água produzida (AP), que é um dos principais subprodutos gerados na cadeia de produção de petróleo e gás, possuindo concentrações relativamente elevadas de hidrocarbonetos, metais e outros poluentes (AL-GHOUTI et al., 2019). Os destinos dados à AP envolvem o seu descarte, a injeção em poços de petróleo e o reúso. Em todos os casos, é necessário o seu tratamento a fim de atender demandas específicas, como ambiental, operacional ou da atividade produtiva que irá reutilizá-la (FULAZZAKY; SETIADI; FULAZZAKY, 2020). Outro subproduto industrial amplamente produzido é a glicerina bruta (GB). Suas aplicações incluem a alimentação animal, tratamento de águas residuais, produção de biogás, óleoquímica, dentre outros (POLARIS MARKET RESEARCH, 2021). Dado o aumento das atividades industriais, a geração de AP e GB tem aumentado, levando a busca de novas alternativas do seu reaproveitamento.

Devido aos aspectos ambientais e econômicos de reaproveitamento dos resíduos AP e GB, sugere-se o uso dessas substâncias como substrato à produção de goma xantana, a qual possui elevada importância comercial e também aplicabilidade em processos extrativos de petróleo. A hipótese desse trabalho é que os constituintes da AP podem ser utilizados na composição de meio de cultura para produção de goma xantana, contribuindo para a gestão sustentável desse resíduo, da GB e valorização da comódite sacarose. Dessa forma, propõe-se a produção de goma xantana em meio contendo AP, sacarose e GB, bem como o teste da produção de xantana em condições de estímulo microbiano, por meio de alcalinização e adição de surfactantes.

## 2. JUSTIFICATIVA

A AP constitui um dos principais resíduos da indústria do petróleo e o desenvolvimento de uma tecnologia para o seu tratamento é um importante desafio com implicações ambientais. A associação do tratamento de AP à produção de um bioproduto que possa ser empregado no aumento da recuperação de petróleo representa um ganho de importâncias econômica e ambiental.

## 3. OBJETIVO

### 3.1 GERAL

Produzir goma xantana em meio contendo AP, sacarose e GB, bem como promover a estimulação da produção de xantana por meio do estresse alcalino e adição de surfactante não catiônico e analisar os produtos resultantes por métodos físico-químicos.

### 3.2 ESPECÍFICOS

- Coletar a AP e determinar os parâmetros físico-químicos da mesma: pH, potenciais de oxidação/redução, salinidade, cloretos, sólidos totais dissolvidos, hidrocarbonetos totais de petróleo, mistura complexa não resolvida, total de óleo e graxas e metais;
- Realizar a produção do exopolissacarídeo goma xantana em frascos agitados com meio de cultura preparado com AP dialisada (APD) à concentração de 100% e AP bruta em distintas concentrações (10, 15, 25, 50 e 100%);
- Efetuar o aumento de escala das produções em biorreator de tanque agitado em bateladas de 2,0 L de produção;
- Proceder a análise gravimétrica e de viscosidade das produções;
- Realizar microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios x por dispersão em energia para a análise da superfície e da composição elementar da goma xantana produzida;
- Realizar a Termogravimetria para determinação de perda de massa, faixas de temperatura e temperatura máxima de degradação térmica da goma xantana;

- Analisar a composição química dos produtos por Espectroscopia Raman;
- Testar a produção de goma xantana sob as condições de estresse alcalino, adição do surfactante Triton X-100 e ambas as condições simultaneamente; bem como proceder a análise gravimétrica, de viscosidade, e química por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier dos produtos gerados;

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 ÁGUA PRODUZIDA

O subproduto AP é uma mistura complexa de constituintes orgânicos e inorgânicos com variada composição química, dependendo principalmente das características geológicas do reservatório e do estágio de recuperação de petróleo (SOSA-FERNANDEZ et al., 2018). Dentre seus constituintes orgânicos, alguns podem servir como substrato à atividade microbiana: hidrocarbonetos, possível fonte de C (SARKAR et al., 2017); sulfato e fósforo que atuam como macronutrientes; metais, tais como manganês, ferro e cálcio, conhecidos como cofatores enzimáticos (HAUSINGER, 2019). Por outro lado, em alguns casos, a AP pode apresentar elevada salinidade, característica deletéria a organismos não halófilos.

Mundialmente, o volume de geração de AP é, aproximadamente, de 281,7 milhões de barris por dia e no Brasil de 8,6 milhões de barris ao dia (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, 2021), considerando a produção mundial de petróleo de 2020 – 93,9 milhões de barris por dia (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2021), e a relação de 3 entre os volumes de AP e petróleo (NEFF; LEE; DEBLOIS, 2011). Em 2020, o mercado global de tratamento da AP foi de 7,65 bilhões de dólares, projeta-se que alcance 8,1 bilhões em 2021 e 11 bilhões em 2026 (360IRESEARCH, 2021a). Regulações estritas relativas aos limites de descarte desse subproduto levaram a um aumento da busca do desenvolvimento de tecnologias avançadas para separação de óleo/água e para aumentar a eficiência da recuperação de petróleo (FULAZZAKY; SETIADI; FULAZZAKY, 2020).

Apesar de sistemas biológicos poderem ser utilizados para o tratamento da AP (FULAZZAKY; SETIADI; FULAZZAKY, 2020; OJAGH; FALLAH; NASERNEJAD, 2020), poucos estudos demonstraram o uso desse subproduto para geração de produtos de valor agregado.

## 4.2 EXOPOLISSACARÍDEOS

Exopolissacarídeos (EPS) são moléculas compostas por unidades repetidas de açúcares, algumas vezes ligados a carreadores lipídicos e associados a moléculas de proteínas, lipídeos, compostos orgânicos e inorgânicos, íons metálicos e mesmo DNA e podem ser excretados como polímeros solúveis ou insolúveis. As funções e papel específico dessas moléculas dependem de suas unidades estruturais e nicho ecológico dos microrganismos hospedeiro (RANA; UPADHYAY, 2020). Dentre os EPS, existem aqueles que inicialmente são produzidos ao longo da fase Log de crescimento microbiano e estão associados à membrana – capsula de EPS, e aqueles produzidos na fase estacionária e que se acumulam no meio de cultura e que são produzidos industrialmente, como a goma xantana (KORCZ; VARGA, 2021).

A excreção de EPS por bactérias está relacionada à reserva energética e também à proteção a condições adversas no ambiente tais como compostos tóxicos, dessecação, estresses (incluindo desequilíbrio nutricional), antibióticos, metais e álcool (ALMANSOORY; ALBALDAWI; HAZAIMEH, 2020), conferindo aumento de sua habilidade de competir e sobreviver, bem como mecanismos de adesão, formação de biofilme e relações simbióticas (MATHIVANAN et al., 2021). Essas substâncias possuem grande potencial biotecnológico nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e de exploração de óleo e gás. EPS também podem ser utilizados como agentes de descontaminação em áreas contaminadas por petróleo (LI et al., 2021) e metais pesados (LAL et al., 2018).

## 4.3 GOMA XANTANA

Gomas são substâncias orgânicas hidrofílicas, mas que em sua grande maioria não se dissolvem em solventes orgânicos. Essas substâncias também possuem características de serem não tóxicas, sem odor e sabor. Essas substâncias podem ter origem animal, vegetal, fúngica ou bacteriana (ABU ELELLA et al., 2020). Dentre as de origem microbiana, a goma xantana tem recebido pertinente atenção, dada sua vasta gama de aplicações industriais (ABU ELELLA et al., 2020).

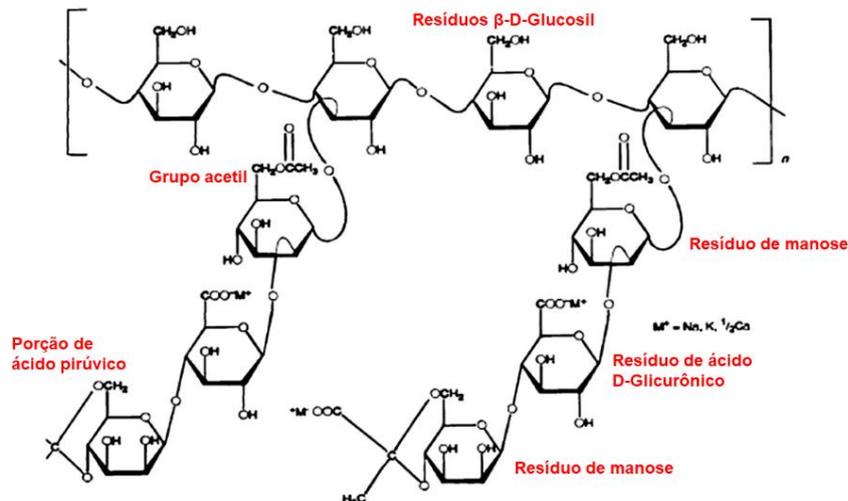
A goma xantana é produzida por bactérias do gênero *Xanthomonas*, o qual é um representante de patógenos vegetais. Os patovares de *Xanthomonas* infectam uma larga seleção de plantas, incluindo algumas de interesse agrícola, e.g. repolho, batata e feijões. Suas células são bacilos gram negativos e dotados de um flagelo polar o qual confere motilidade às mesmas

(ABU ELELLA et al., 2020). Fisiologicamente, a goma xantana desempenha papéis como: proteção contra a dessecação e outros estresses, proteção a ataques de microrganismos, bem como um fator de virulência, por aumentar a ligação dessa bactéria a superfícies de plantas através da formação de biofilmes (BIANCO et al., 2016). Devido a suas propriedades físico-químicas, a goma xantana é empregada como aditivo na indústria alimentícia, de higiene, cosméticos e farmacêutica, como estabilizante, emulsificante e espessante. Ultimamente tem sido utilizada na indústria petrolífera, como agente de Recuperação Microbiológica Avançada do Petróleo (MEOR) e em fluidos de perfuração (NIU et al., 2020), pois mesmo em baixas concentrações, apresenta elevada viscosidade, pseudoplasticidade e estabilidade na presença de sais, amplas faixas de pH e elevadas temperaturas (ABU ELELLA et al., 2021).

Historicamente, a goma xantana foi descoberta em 1950 no *Northern Regional Research Laboratory of the United States Department of Agriculture* por Allene Rosalind Jeanes e seus colaboradores (JEANES et al., 1976). Essa substância foi isolada da cepa *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, durante as pesquisas para o uso e produção de dextranas como expansores de plasma sanguíneo (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2017). Dadas suas propriedades reológicas, não-tóxicas e não alergênicas, foi aprovada como aditivo alimentar sem nenhuma restrição pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos (ABU ELELLA et al., 2020).

A cadeia principal da goma xantana consiste de unidades D-glicose ligadas nas posições 1 e 4 (Figura 1). As cadeias laterais de trissacarídeos contêm um ácido D-glicurônico entre as duas unidades de D-manose ligadas à posição O-3 de todos outros resíduos de glicose na cadeia principal.

**Figura 1** - Estrutura molecular da goma xantana.



Fonte: Adaptado de KUPPUSWAMI (2014).

Aproximadamente metade das D-manose terminais contém resíduos de ácido pirúvico ligados via grupamentos ceto às posições 4 e 6, com uma distribuição desconhecida. A presença de resíduos de ácidos pirúvico e acético (na forma de acetil) confere propriedades aniônicas a esse polissacarídeo. Ademais, acredita-se que um maior teor de resíduos de ácido pirúvico aumente a viscosidade (PINHEIRO et al., 2020; ROMERO-ZERÓN; ESPINOSA, 2020) e estabilidade térmica das soluções de goma xantana (DE JESUS ASSIS et al., 2014).

A principal característica que dá significância industrial à goma xantana é sua reologia em soluções aquosas, nas quais a goma xantana apresenta altos níveis de pseudoplasticidade – propriedade na qual a viscosidade aparente é reduzida com o aumento da tensão de cisalhamento, mas tendo a capacidade de retornar à sua condição inicial cessado o cisalhamento (HABIBI; KHOSRAVI-DARANI, 2017). Essa pseudoplasticidade está relacionada à formação de ligações de hidrogênio no emaranhado polimérico (KUPPUSWAMI, 2014). A alta viscosidade e a baixa tensão de cisalhamento são devidas a moléculas imóveis e altamente ordenadas no emaranhado de goma xantana. Isso faz dessa molécula um excelente espessante, estabilizante, emulsificante e como meio de suspensão. A desorganização e alinhamento das moléculas de xantana em direção à força de cisalhamento provoca redução da viscosidade, a qual quando cessada, possibilita o retorno quase que instantâneo ao estado original da solução de xantana (KUPPUSWAMI, 2014).

Em 2020, o mercado global de goma xantana foi estimado em 897 milhões de dólares e projeta-se que alcance 1,4 bilhões de dólares em 2026 (360IRESEARCH, 2021b) devido a crescente demanda por aditivos para alimentos e bebidas sem glúten, bem como por produtos para operações de recuperação avançada de petróleo.

Atualmente o custo de produção da goma xantana é maior do que o polissacarídeos tradicionais como amido de milho e os derivados de celulose e gomas vegetais que dominam o mercado (KUPPUSWAMI, 2014). De uma perspectiva econômica e ambiental, novas estratégias nutricionais têm sido buscadas para o barateamento da produção de goma xantana, sendo o uso de resíduos ou subprodutos industriais de baixo valor (DEMIRCI et al., 2019; OZDAL; BAŞARAN KURBANOGU, 2019) uma alternativa às fontes usuais empregadas para produção de goma xantana, como o xarope de milho empregado pela CP Kelco (KUPPUSWAMI, 2014).

#### 4.4 ESTÍMULO POR ESTRESSE ALCALINO E SURFACTANTE

Dada a importância da goma xantana, novas estratégias de redução de custo, bem como maximização de produção, têm sido buscadas. Uma possível abordagem é o estresse fisiológico provocado pela exposição de microrganismos a ambientes alcalinos (SAMPAIO et al., 2021), havendo uma série de alterações metabólicas como resposta emergencial a esse tipo de estímulo (GIOTIS et al., 2008, 2010). Adicionalmente, estudos relatam uma maior produção de goma xantana em condições de elevado pH (MELLO et al., 2015; TRINDADE; MUNHOZ; BURKERT, 2018) e tem-se tentado explorar o estresse alcalino como forma de otimizar a produção dessa substância, apesar dos mecanismos de como essa produção é induzida ainda não estarem completamente elucidados (SAMPAIO et al., 2021).

Da mesma forma, sabe-se que o uso de detergentes pode aumentar a produção de metabólitos microbianos, tais como álcools graxos (LIU et al., 2020), goma xantana (GHASHGHAEI et al., 2018), bem como a atividade enzimática de comunidades microbianas (YIN et al., 2019). Por esses motivos, essas substâncias têm sido empregadas como forma de elevar os resultados de bioprocessos. É relatado que sua aplicação pode promover maior transferência de oxigênio e, portanto, melhorar a produção de goma xantana, bem como a interação com essa substância pode melhorar as características reológicas do mesmo (GHASHGHAEI; SOUDI; HOSEINKHANI, 2016).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 COLETA E ANÁLISE DA ÁGUA PRODUZIDA

A AP foi coletada de um campo de petróleo carbonático em estado de recuperação primária localizado no nordeste brasileiro. O material foi mantido em frascos de vidro borossilicato estéreis e refrigerado a 4 °C. A AP foi então avaliada para mensuração de parâmetros físico-químicos para o pH, potenciais de oxidação/redução (ORP – *Oxidation and reduction potential*), salinidade, cloretos, sólidos totais dissolvidos, hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH – *total petroleum hydrocarbons*), mistura complexa não resolvida, total de óleo e graxas e metais. Foram utilizados os respectivos métodos padrão para as análises supracitadas:

SM-4500 H<sup>+</sup> B; SM-2580 B; SM-2520 B; SM-4500-Cl<sup>-</sup> B; SM- 2540 C; USEPA 8015D; EPA - 6020A (CAMPISANO et al., 2017; RICE; BAIRD; EATON, 2017).

Para a diálise da AP, foram utilizadas membranas regeneradas de celulose com limite de retenção do peso molecular de 1000 a 50000 pontos para a realização da diálise da AP (Spectra/Por™ 3 Dialysis Tubing 3500 Dalton MWCO, Thermo Fisher Scientific, Inglaterra) contra AD, a qual foi trocada a cada 8 h até redução da condutividade a valores inferiores a 300 µS/cm (FiveEasy Benchtop FP30, conductivity Meter, Powai Mumbai, India) (PINHEIRO et al., 2020). Após isso, a AP foi acondicionada em frascos de vidro borossilicato a 4 °C para posterior uso.

## 5.2 MICRORGANISMO E PREPARO DE INÓCULO

A cepa *Xanthomonas campestris* IBSBF 2103 foi gentilmente doada pela Escola de Farmácia da Universidade Federal da Bahia. O procedimento para o preparo do inóculo consistiu em inverter o conteúdo de um criotubo com a cultura inativa (500 µL) em 20 mL de meio YM (JEANES et al., 1976) contido em um frasco do tipo Ernlmeyer de 150 mL de volume. A cultura foi então incubada a 28 °C e 150 rpm em um agitador horizontal orbital (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, US). Após 32h, 10% da cultura crescida foi repicada em novo meio YM e incubada por mais 16 h, quando então estava apta para os experimentos de produção de goma xantana (SAMPAIO et al., 2021).

A fim de verificar a suscetibilidade do microrganismo à AP foi realizado um teste piloto para quantificação microbiana pelo método do número mais provável (NMP) e visualização microscópica com laranja de acridina (CRUGEIRA et al., 2019; JARVIS; WILRICH; WILRICH, 2010; JOHNSEN, 2010). Um inóculo (preparado como descrito acima) foi adicionado em meio YM preparado com AP como soluto, sendo utilizado como controle meio YM preparado com AD, as culturas foram então diluídas em série e incubadas a 28 °C por 120 h. Após isso, foi realizada a quantificação por NMP e uma avaliação microscópica com laranja de acridina. Os meios foram esterilizados por filtração através de filtros de 0,22 µm.

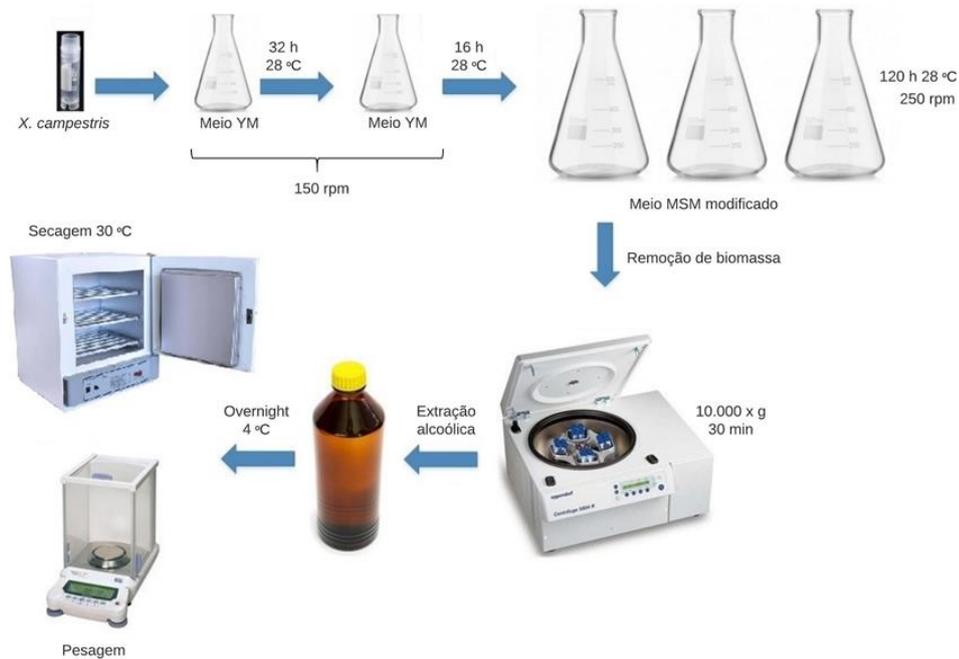
### 5.3 EXPERIMENTOS DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM FRASCOS DE AGITAÇÃO

Experimentos de batelada foram realizados com triplicatas de cinco concentrações distintas de AP (10, 15, 25, 50 e 100% de AP), APD e o controle com AD. A produção foi iniciada pelo inóculo de 5 mL de cultura ativada em 45 mL de meio salino mineral modificado, denominado MSM (DORN et al., 1974). Sua composição inclui: (w/v): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,277 %); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1 %), Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (0,00713 %), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 %), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,02 %), extrato de levedura (0,05 %), sacarose (2,5 %), e GB (2,0 %).

A GB foi obtida de uma planta de produção de biodiesel (SENAI/CIMATEC, Salvador, BA, Brasil) e foi obtida através da transesterificação de óleo de soja e gordura animal (8:2), utilizando metóxido de sódio (0,6%) e metanol (17% em excesso). Apresentava-se amarela e líquida a temperatura ambiente. Dependendo do grupo de estudo, esse meio foi preparado através da dissolução dos constituintes em AD, AP ou APD. Após o preparo do referido meio, o mesmo foi pasteurizado a 65 °C por 30 minutos e, em seguida, imediatamente resfriado a 4 °C.

A produção de goma xantana se deu em frascos Erlenmeyer de 250 mL de volume e contendo 45 mL de meio MSM, sob agitação orbital de 250 rpm (BRANDÃO et al., 2013) e temperatura de 28 ± 0.25 °C em um agitador orbital pelo período de 120 h (I26 Incubator Shaker Series, New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, US). O volume de inóculo foi de 5 mL (10% do volume final). Após a produção, o conteúdo de cada frasco Erlenmeyer foi centrifugado a 10.000 × g pelo período de 30 minutos a 4 °C (Eppendorf 5804 R, Westbury-NY, USA). Posteriormente, 150 mL de álcool etílico a 99,5% foi adicionado ao sobrenadante e mantido a 4 °C por 16h para insolubilização da goma xantana (BRANDÃO et al., 2013). O material insolubilizado foi então recuperado por centrifugação a 10.000 x g por 30 min. A goma xantana extraída, foi então disposta para secagem a 30 °C até a obtenção de peso constante, verificado em uma balança analítica ATY224 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Um esquema do processo desse experimento está representado abaixo (Figura 2).

**Figura 2** - Representação dos experimentos de produção em frascos de agitação.



Fonte: Autoria própria (2021).

#### 5.4 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM BIORREATOR DE TANQUE AGITADO

Após os experimentos em agitador orbital, foram realizados testes de aumento de escala de produção em reator aerado. Foram realizadas produções de goma xantana em meio MSM produzido a base de água destilada (AD) e APD. Foi utilizado um biorreator de tanque agitado de 5L de volume SCR05 Duo (Allbiom, Cajuru, Brasil). O inóculo microbiano foi preparado da mesma forma como descrito anteriormente. A fim de garantir a adequada aeração, foi utilizado o volume final de trabalho de 2,0 L, dos quais 200 mL constituíram o inóculo microbiano. A aeração foi realizada através do bombeamento de ar (3,0 L/min) previamente filtrado em filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . A agitação foi mantida a 300 rpm e a temperatura a  $28 \pm 2$  °C. Preliminarmente foram testadas bateladas com e sem correção de pH, por meio da injeção automática de NaOH 5M estéril para manutenção do pH em 7,0. Esse experimento preliminar foi conduzido pelo período de 24 h. Os demais experimentos foram conduzidos apenas com correção de pH e em bateladas de 54 h de duração.

O crescimento microbiano foi monitorado através da técnica do número mais provável – NMP (JOHNSON, 2010) e a produção de goma xantana através de sua extração e posterior pesagem. Resumidamente, o processo consistiu na coleta de 32 mL do meio de cultura com o

auxílio de um amostrador acoplado ao bioreator e uma bomba a vácuo. Desse volume, alíquotas de 100 uL (triplicatas) foram dispersas em 900 uL de meio de cultura YM estéril contido em poços de placas “deep-well” cada um com 1,6 mL de capacidade (Axygen, Inc) e diluído em série até  $10^{-12}$ . O meio utilizado para a técnica de NMP foi aditivado de 0,1% de iodonitrotetrazólio (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) como indicador de crescimento microbiano (CHINALIA; PATON; KILLHAM, 2008). As diluições que apresentaram crescimento foram detectadas por meio da mudança de cor do meio, de amarelo para rosa/roxo e então contadas para estimar a concentração microbiana por NMP (JARVIS; WILRICH; WILRICH, 2010).

Para quantificação de goma xantana, alíquotas de 10 mL (triplicatas) foram dispersas em tubos de centrifugação de 50 mL. O material foi centrifugado para remover biomassa e o sobrenadante utilizado para insolubilização da goma xantana como descrito anteriormente.

## 5.5 ANÁLISE GRAVIMÉTRICA E DE VISCOSIDADE

Após secas, as amostras foram pesadas e acondicionadas para posterior análise físico-químicas (Microscopia eletrônica, Espectroscopias de raios X por dispersão em energia e RAMAN). A viscosidade foi analisada em um viscosímetro digital rotacional modelo Brookfield MVD-8 (Marte científica, Santa Rita do Sapucaí, Minas Gerais, Brasil). Soluções de 1,0% de goma xantana foram utilizadas para mensuração da viscosidade a 60 rpm utilizando os sensores de cisalhamento (spindles) 1, 2, 3 e 4 como descrito por Miladinov e Hanna (1996). A análise estatística das gravimetrias e viscosidades foi realizada por meio do teste t de Student ou por ANOVA com comparação múltipla de tukey.

## 5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para investigar detalhes da superfície da goma xantana (KUMAR; SINGH; AHUJA, 2009) obtida com AP. As amostras foram metalizadas em ouro (10 min, 2mbar) em um sistema de preparação Desk V (Denton Vacuum, NJ, EUA) e foram observadas por SEM em um JSM-6610LV (JEOL Brasil Instrumentos Científicos, Mirandópolis, São Paulo) a 10 kV e ampliações de 100 e 2000x. A análise elementar das amostras foi realizada por Espectroscopia de raios X por dispersão em

energia (EDS) em um detector X-Max de 20 mm<sup>2</sup> (Oxford Instruments, Oxfordshire, Inglaterra).

## 5.7 TERMOGRAVIMETRIA

Experimentos não isotérmicos foram realizados no instituto de Química da Universidade Federal da Bahia – Brasil em um equipamento *Pyris TGA Thermogravimetric Analyzer* (PerkinElmer, Inc) utilizando um módulo detector termogravimétrico 60H (Shimadzu, Corp) acoplado a um analisador térmico, utilizando uma taxa de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com uma taxa de fluxo de aproximadamente 20 mL/min. As curvas de TGA e suas derivadas (dTGA) foram utilizadas para determinar a perda de massa (em %), as faixas de temperatura (em °C), e a temperatura máxima de degradação térmica, respectivamente. As massas de amostras requeridas de goma xantana produzida em biorreator com APD e goma xantana comercial (Carboflex, São Sebastião do Passé, BA, Brasil) foram de cerca de 6,8 mg. A temperatura máxima do *holder* de alumínio foi de 500 °C. As curvas de TGA foram obtidas com o Pyris software Manager (PerkinElmer, Inc) e as derivadas e gráficos foram construídos com o software OriginPro 8.5 (OriginLab Corp, Northampton, MA, EUA).

## 5.8 ESPECTROSCOPIA RAMAN DAS AMOSTRAS DE GOMA XANTANA

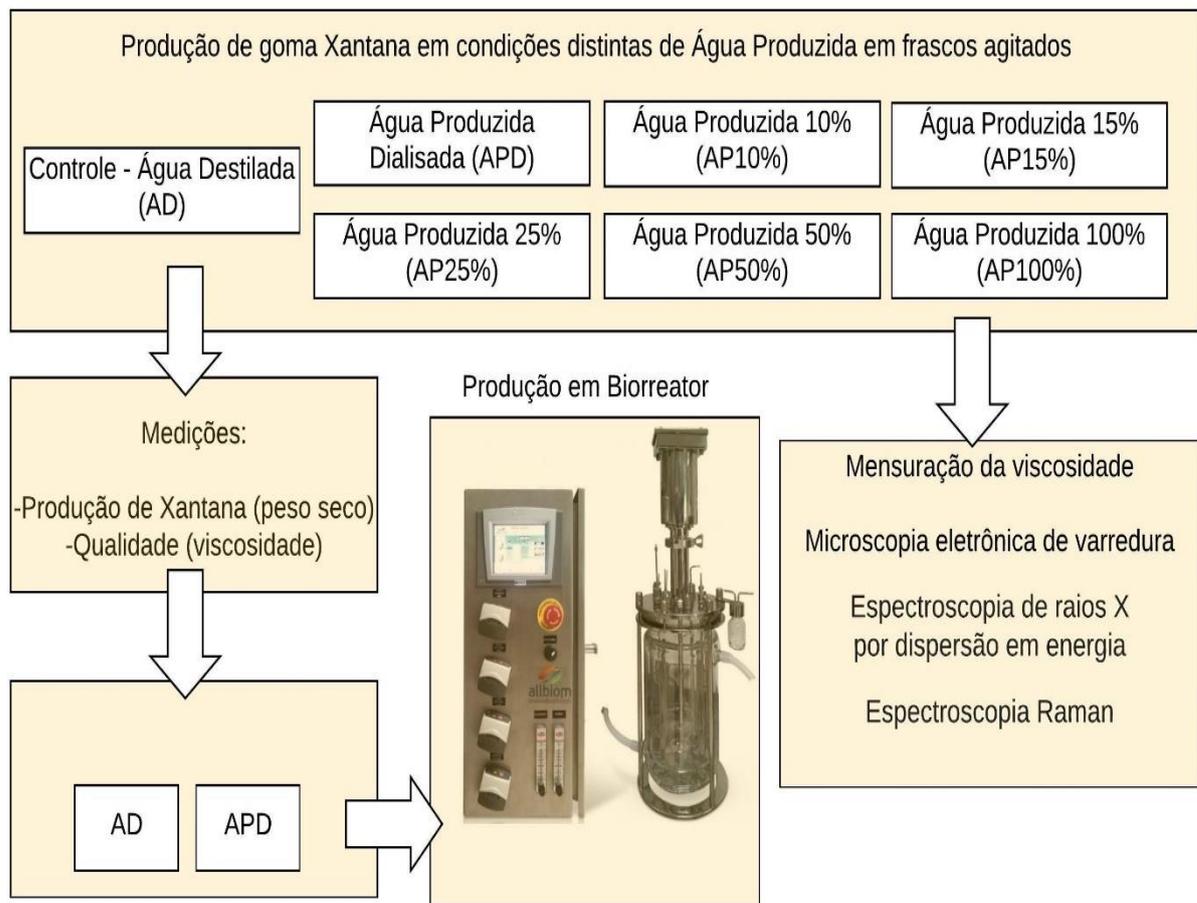
Os experimentos de espectroscopia Raman foram realizados como descrito na literatura (SAMPAIO et al., 2020) e conduzidos e analisados no Centro de Biofotônica da Universidade Federal da Bahia. Foi utilizado um espectrômetro Raman dispersivo (model Cora 5700, Anton Paar GmbH, Graz, Austria) com excitação com um diodo de laser no comprimento de onda de 1064 nm, e espectrográfo (espectrógrafo f/2 com uma grade de fase de volume altamente eficiente e uma câmera ultra-sensível de detector de matriz InGaAs de 256 pixels). A resolução dos espectros obtidos com as leituras variou de 12 a 17 cm<sup>-1</sup> na região de 400 a 2000 cm<sup>-1</sup> e potência ajustável de até 450 mW do laser de saída.

A média dos valores dos espectros de cada amostra de goma xantana produzida em frascos agitados foi utilizada para comparação entre esses grupos e por método estatístico. A análise por componente principal (PCA – *Principal Component Analysis*) foi utilizada para identificar e quantificar diferenças nas características espectrais relacionadas a cada produção de goma xantana através da avaliação dos vetores de carregamento do componente principal

(*loadings* – características espectrais) e as pontuações (*scores* – valor atribuído a cada *loading*), como descrito na literatura (SAMPAIO et al., 2020; SILVEIRA et al., 2002). Os constituintes analisados foram os da cadeia principal da molécula de goma xantana (glicose, manose, ácido glicurônico) e os resíduos de acetato e piruvato.

O esquema geral dos testes conduzidos nesse trabalho encontra-se na figura abaixo (Figura 3).

**Figura 3** - Esquema dos testes conduzidos nesse trabalho.



Fonte: Autoria própria (2021).

## 5.9 PRODUÇÃO EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE ALCALINO E ADIÇÃO DE SURFACTANTE

Os experimentos de produção em condições de estresse alcalino e o uso do surfactante Triton X-100 foram conduzidos em frascos agitados, com o mesmo meio MSM e condições de incubação descritas anteriormente. O estresse alcalino foi aplicado após 96 h do início das produções com *X. campestris*, por meio da alcalinização até pH 9,5 com NaOH 5M estéril em capela de fluxo laminar. Foi utilizado um pHmetro (430 pH meter, Corning, New York, USA),

desinfeccionado com hipoclorito de sódio 2,0 % e posteriormente com álcool 70 %. Após o processo de alcalinização, os erlenmeyers foram devolvidos ao agitador horizontal para completar os períodos de produção. Preliminarmente foi verificado o efeito desse tratamento sobre a concentração microbiana das culturas em meio MSM preparado com AD antes da aplicação do estresse alcalino, 1 h após a aplicação e ao final do processo produtivo. Posteriormente foi testado o efeito do estresse alcalino sobre a produção de goma xantana em meios preparados com AD, AP e APD (SAMPAIO et al., 2021).

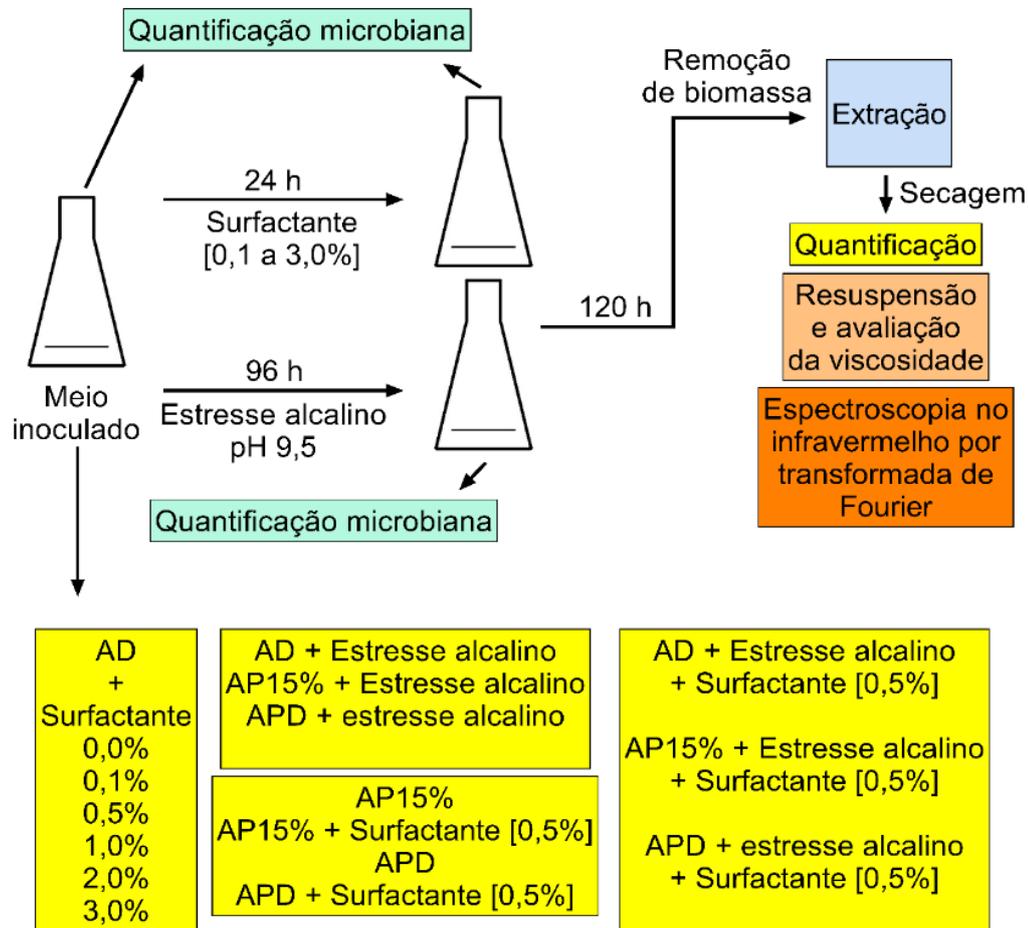
Para quantificação microbiana foi utilizada a técnica NMP como descrito anteriormente. Para testar o efeito do surfactante, inicialmente foi feita uma triagem para verificar a concentração máxima de Triton X-100 tolerável pela cepa de *X. campestris*. A avaliação foi realizada em meio MSM modificado preparado com AD e com as concentrações finais de Triton X-100 de 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0%. O surfactante foi aplicado 24 h após o início das produções com *X. campestris*. Após determinar a melhor concentração, pelos parâmetros produção e viscosidade, passou-se aos testes com AP e APD e também a associação simultânea ao estresse alcalino.

### **5.9.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier**

Foi utilizado um espectrômetro no infravermelho por transformada de Fourier modelo VERTEX 70v (Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts) para se obter a caracterização da goma xantana produzida em condições de estresse alcalino e adição de surfactante (FREITAS et al., 2011; NEJADMANSOURI et al., 2020). As amostras secas foram dispostas no diamante de ATR (modelo A225/Q Platinum ATR unit, Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts) e os espectros obtidos em uma faixa espectral de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  com aquisição de espectros por meio de 32 escaneamentos com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , em temperatura de  $22 \pm 2$  °C e umidade controlada.

A figura a seguir (Figura 4) descreve o processo e os grupos testados nas produções com estresse alcalino e adição de surfactante.

**Figura 4** - Experimento de estímulo microbiano por estresse alcalino e aplicação de surfactante.



Fonte: Adaptado de SAMPAIO et. al. (2021).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA PRODUZIDA

As propriedades físicas e químicas da AP são afetadas pelos aspectos geológicos e geoquímicos da formação contendo os hidrocarbonetos, a composição química do óleo e fase gasosa no reservatório e compostos químicos adicionados à produção e extração. A AP contém compostos tais como sais inorgânicos, metais, radioisótopos e uma ampla variedade de substâncias orgânicas, primariamente hidrocarbonetos (NEFF; SAUER; MACIOLEK, 1992), sendo bem conhecida a profusão de íons e sais de Na, Cl<sup>-</sup>, Ca, Mg, K, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Br<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e I na AP (PILLARD; TIETGE; EVANS, 1996). Foi encontrada uma salinidade de 129 g/L (Tabela 1), característica possivelmente deletéria à *Xanthomonas campestris* (não halófilo).

Tabela 1 - Características físico-químicas e determinações metálicas da AP.

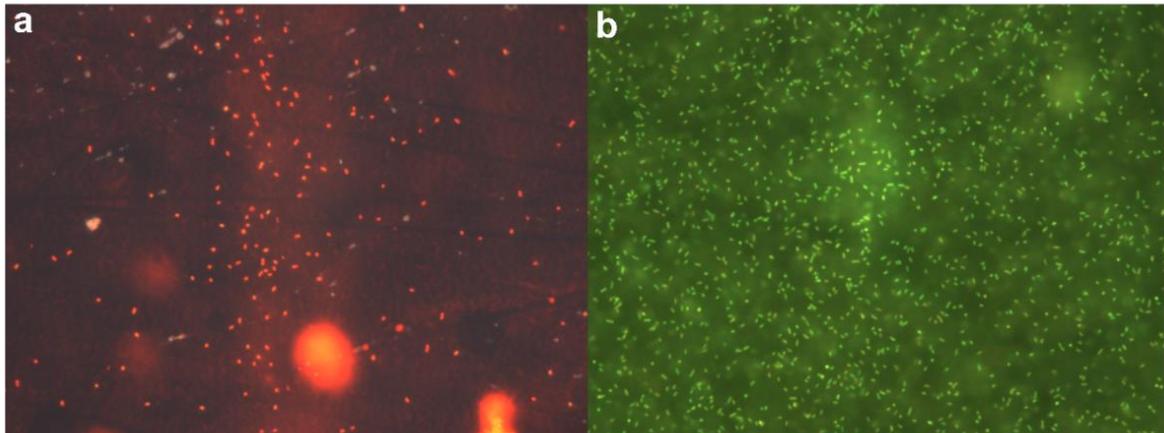
Característica	Resultados
pH a 25°C	6,50
Potencial de oxidação/redução – ORP Eh (mV)	189
Cloreto (g/L)	71,4
Sódio (g/L)	13,9
Cálcio (g/L)	1,64
Magnésio (g/L)	0,95
Salinidade (g/L)	129
Total de óleo e graxas (mg/L)	7,80
Hidrocarbonetos totais de petróleo – TPH (mg/L)	3,72
Mistura complexa não resolvida – UCM (mg/L)	0,97
Pristano (mg/L)	0,11
Fitano (mg/L)	138
Bário (mg/L)	0,95
Manganês (mg/L)	0,43

Fonte: Autoria própria (2021).

A cultura dessa cepa, quando crescida em meio YM produzido com AP não apresentou turvação em nenhuma diluição, já o controle resultou em uma concentração de cerca de 10 Log<sub>10</sub> NMP. A avaliação microscópica por laranja de acridina mostrou células coradas de vermelho, imóveis e em menor concentração no meio contendo AP (Figura 5), ao passo que o controle com AD (Figura 5b) apresentou células móveis em coloração vermelha ou verde (Figura 5a).

O método de coloração com laranja de acridina não permite informar se um MO imóvel está viável ou não, porém, a observação de que as bactérias inoculadas no meio YM feito com AP não apresentavam movimento, levou a inferir que a coloração vermelha não seria devido ao fluóroforo intercalar em altas concentrações de RNA e sim em ssDNA (CRUGEIRA et al., 2019). Comparando com as bactérias do controle em meio YM preparado com AD, que apresentavam alta concentração e movimento, sugere-se que a cepa de *Xanthomonas campestris* não cresceu no meio YM feito com AP. Um trabalho de caracterização de uma cepa de *Xanthomonas* mostrou crescimento apenas em meios com até 3,0% de salinidade (SARKER; SULTANA; AMINUZZAMAN, 2017), o que sugere que a alta salinidade da AP possa interferir no metabolismo desse organismo.

**Figura 5** - Coloração com laranja de acridina de *Xanthomonas campestris*.



Culturas preparadas com AP (a) e AD (b). Fonte: Autoria própria (2021).

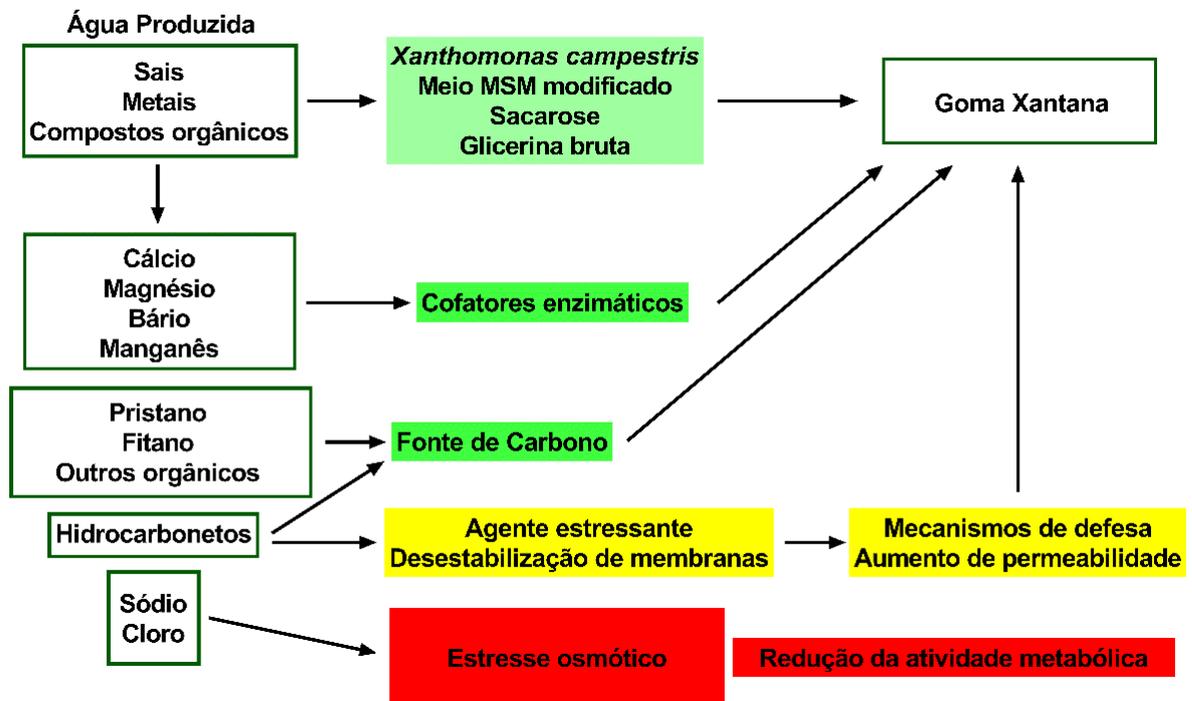
Outros elementos químicos presentes na AP, tais como cálcio e magnésio, são importantes cofatores enzimáticos (eg. 8,0 e 129 mg/L, respectivamente) e atuam positivamente no crescimento de *Xanthomonas* spp. e produção de goma xantana (ALMARZA; ROMERO, 2013; ASHOUR, 2000; GARCÍA-OCHOA; SANTOS; FRITSCH, 1992; UMASHANKAR et al., 1996). A caracterização da AP (Tabela 1) mostrou a presença de quantidades significativas de cálcio e magnésio (1,64 e 0,95 mg/L, respectivamente). Ademais, é relatado que concentrações de manganês de até 55 mg/L desempenham um papel protetivo contra o estresse oxidativo (LI et al., 2011; PAPP-WALLACE; MAGUIRE, 2006). A Tabela 1 mostra a presença de manganês em concentrações de 0,43 mg/L. Esse resultado sugere uma condição positiva para proteção ao estresse oxidativo eventualmente provocado por compostos orgânicos tóxicos presentes na AP. Já o bário pode afetar a absorção microbiana de cálcio e potássio (BALDI et al., 1996), sendo deletério quando em concentrações acima de 15,68 g/L (TAKAHASHI; DOKE, 1983), o que não é o caso da concentração de 0,95 mg/L detectada na AP (Tabela 1).

Os compostos orgânicos, representados por óleos e graxas totais, hidrocarbonetos totais de petróleo, mistura complexa não resolvida, pristano e fitano correspondem a 150 mg/L de potencial fonte de C para *Xanthomonas campestris*. Publicações relataram a degradação de hidrocarbonetos de petróleo por microrganismos (DAS; CHANDRAN, 2011; LARIK et al., 2016; VARJANI, 2017) e identificaram cepas do gênero *Xanthomonas* em ambientes contaminados por petróleo (GOMES et al., 2010; HERNANDEZ-RAQUET et al., 2006; URURAHY et al., 1998) e também como capazes de realizar esse processo de biodegradação (GREER; WHYTE; NIEDERBERGER, 2010; LI et al., 2000; SZULC et al., 2014; VIÑAS et al., 2005; XU et al., 2014). O pristano e o fitano são isoprenóides comumente encontrados em óleo bruto (BROOKS; GOULD; SMITH, 1969) e embora mais recalcitrantes que outros

alcanos (LEMKAU et al., 2010; PETERS; WALTERS; MOLDOWAN, 2004), podem também servir como fonte de carbono e energia para microrganismos (FAYAD et al., 1992; GUTIERREZ, 2017; SALAM et al., 2017).

Por outra perspectiva, alguns autores relataram que hidrocarbonetos e outros compostos lipofílicos, e.g. tetralina e tolueno, podem interagir com membranas celulares, provocando um distúrbio ou mesmo aumentando sua permeabilidade (DE SMET; KINGMA; WITHOLT, 1978; SIKKEMA et al., 1992; SIKKEMA; JAN; POOLMAN, 1995), podendo ser hipotetizado que esse efeito aumente a transferência de massa e/ou excreção de goma xantana por *Xanthomonas campestris*. Com base no que foi explanado, a figura abaixo (Figura 6) resume hipóteses da ação da AP sob o gênero da cepa em estudo.

**Figura 6** - Possíveis efeitos da AP sob *Xanthomonas campestris*.



Fonte: Autoria própria (2021).

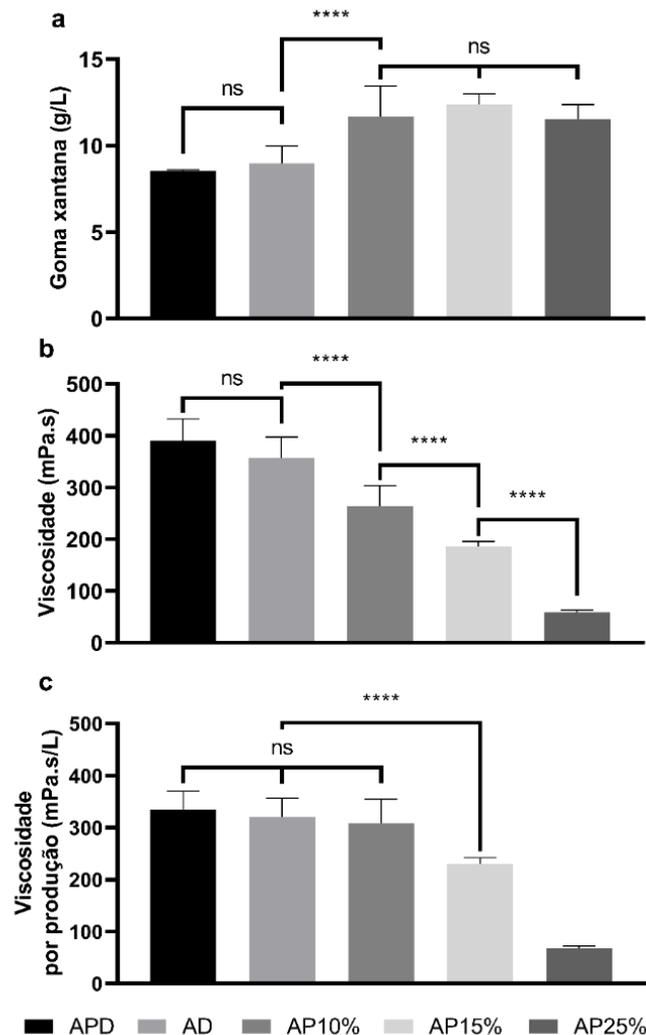
## 6.2 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

### 6.2.1 Experimentos em frascos agitados

Gravimetricamente, os rendimentos de goma xantana (Figura 7a) utilizando 10, 15 e 25% de AP não foram estatisticamente diferentes (11,7, 12,4, e 11,5 g/L, respectivamente).

Contudo, a viscosidade das soluções de goma xantana (1,0%) foram afetadas pelas altas concentrações de sais da AP.

**Figura 7** - Produção de goma xantana em distintas concentrações de AP.



Resultados da gravimetria (a), viscosidade (b) e viscosidade total por produção (c) das amostras produzidas em frascos agitados. Fonte: Autoria própria (2021).

A estrutura conformacional da molécula de goma xantana é dependente de suas forças eletrostáticas de repulsão/atração que podem ser alteradas na presença de sais (CARRINGTON et al., 1996; KRSTONOŠIĆ; MILANOVIĆ; DOKIĆ, 2019; LUTFI et al., 2019). Assim, os grupos de produção de goma xantana que utilizaram 10, 15 e 25% de AP resultaram em goma xantana com distintas viscosidades (263,8, 186,3 e 58,74 mPa.s), respectivamente. Por outro lado, apesar do menor rendimento de goma xantana quando utilizada APD (8,55 g/L), a viscosidade resultante foi de 390,9 mPa.s (Figura 7b); a qual foi estatisticamente igual ao valor do controle produzido com AD (357,1 mPa.s). A goma xantana

é um importante agente espessante devido a suas propriedades reológicas a diferentes concentrações salinas e temperatura.

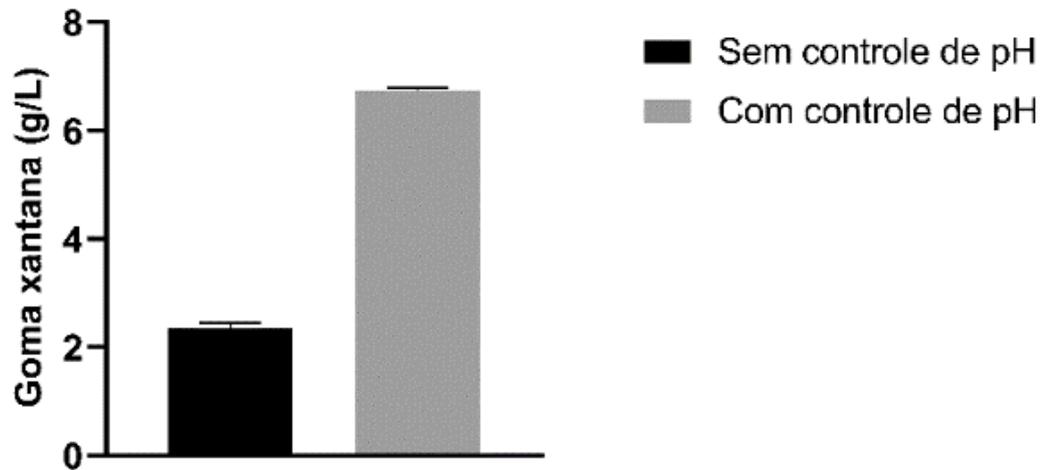
O comportamento pseudoplástico da goma xantana é um produto da sua alta viscosidade a baixas concentrações e inversamente dependente da tensão de cisalhamento (HABIBI; KHOSRAVI-DARANI, 2017; HSU; LO, 2003). É destacado que não somente o rendimento de goma xantana é importante para comparação dos grupos de produção, mas também a viscosidade final das soluções obtidas com esse produto. Por isso, foi proposto um índice de viscosidade para melhor comparar os grupos de produção. A viscosidade por produção para os produtos obtidos com AD, APD e AP10% foi 320, 334 e 307 mPa.s/L, respectivamente (Figura 7c) e não diferiram estatisticamente entre si. Portanto, a goma xantana produzida com AD, APD e AP10% resultou produções com a mesma viscosidade total por L de produção. Por outro lado, as produções com AP15% e AP25% resultaram em 230 e 67 mPa.s/L de viscosidade por batelada, indicando menor qualidade do produto final.

Existem vários trabalhos que associam mudanças significativas na viscosidade de soluções de goma xantana com distintos meios de produção, variando as composições de fontes de carbono (BRANDÃO et al., 2013; SILVA et al., 2009), volume de inóculo e agitação do meio de produção durante as culturas (GHASHGHAEI; SOUDI; HOSEINKHANI, 2016). Foi demonstrada uma quantidade significativa de goma xantana sendo produzida em meio contendo AP em um período de 120 h. Trindade et al. (2018) relatou rendimentos de goma xantana de 4,98, 4,55 e 4,07 g/L quando do uso de GB (5,0%) como fonte de carbono, sacarose (5,0%) ou ambos (2,5% cada). Isso foi semelhante aos resultados obtidos em outra publicação (BRANDÃO et al., 2013). Maiores produções de goma xantana estão associadas com alta suplementação de fontes de carbono, tais como 10 g/L de goma xantana obtidos com o uso de melão de cana de açúcar (MURUGESAN et al., 2012). Alternativamente, utilizando efluentes, altos rendimentos de xantana foram obtidos quando do uso de proteína de soro do leite (8%) (SILVA et al., 2009) ou 17,5% de melão de beterraba (KALOGIANNIS et al., 2003).

### **6.2.2 Experimentos em biorreator**

O experimento piloto de biorreator com e sem correção de pH, mostrou diferença significativa dessa variável, havendo um aumento cerca de 3 vezes na produção de goma xantana quando do emprego da correção de pH com NaOH (Figura 8), indicando que esse é um processo essencial para a maior produção de goma xantana pela cepa em estudo.

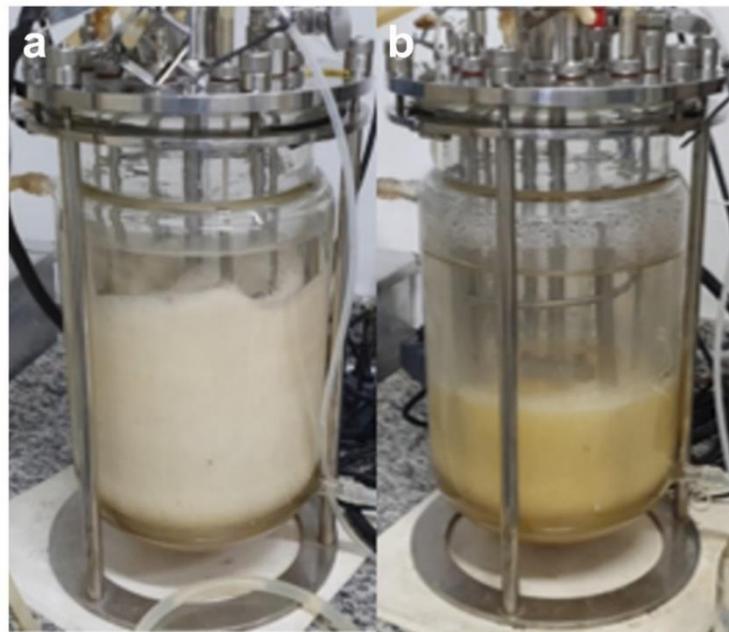
**Figura 8** - Teste de produção em biorreator, com e sem correção de pH em batelada de 24 h.



Fonte: Autoria própria (2021).

As produções posteriores utilizaram a correção de pH e sempre resultaram em produções de aspecto viscoso e denso, havendo além do aumento da turbidez, a aquisição de cor levemente amarela no caldo de produção (Figura 9).

**Figura 9** - Aspecto do caldo de produção.



Início do processo produtivo (a) e ao final do experimento (b). Fonte: Autoria própria (2021).

Essa coloração pode ser devido à formação de Xanthomonadina, pigmento produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas*, expresso normalmente em culturas produtoras de

xantana e possivelmente superexpresso em condições de estresse ótico (POPLAWSKY; URBAN; CHUN, 2000).

Não foram observadas mudanças significativas nas densidades microbianas (NMP) durante as primeiras 24h de incubação quando utilizado o meio feito à base de AD (Figura 10). O inóculo foi preparado e utilizado ao fim do crescimento exponencial, conferindo alta carga microbiana inicial. Esse procedimento objetivou reduzir o período de crescimento microbiano, focando na produção de goma xantana em vez do aumento da população. A alta concentração de inóculo, associada com a baixa concentração de fonte de nitrogênio presente no meio de cultura (0,212 g/L) e a alta disponibilidade de fonte de C (45 g/L na forma de sacarose, GB e também hidrocarbonetos de petróleo) resultou na produção prematura de goma xantana no biorreator. Adicionalmente ao menor período de incubação, o uso de maior carga microbiana também contribuiu para menor formação de espuma dentro do biorreator sob alta agitação. Outros trabalhos relataram a necessidade do uso adicional de substâncias anti-espumantes durante as produções (DE JESUS ASSIS et al., 2014; FUNAHASHI et al., 1987; YANG; LO; MIN, 1996), mostrando uma vantagem do método produtivo utilizado nessa pesquisa.

A produção de goma xantana é limitada pela concentração de nitrogênio e fornecimento de oxigênio ao meio de produção (AMANULLAH et al., 1998; AMANULLAH; TUTTIETT; NIENOW, 1998; ASHRAF et al., 1996; VUYST; LOO; VANDAMME, 1987). A concentração de nitrogênio utilizada nessa pesquisa é similar ao reportado na literatura (CASAS; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000; GARCÍA-OCHOA; SANTOS; ALCÓN, 1995; PETERS et al., 1989; WANG et al., 2016) e foi verificada manutenção dos níveis de saturação de oxigênio durante o processo produtivo. É sugerido que o baixo crescimento e uma fase Log bem caracterizada sejam devidos à alta carga de células utilizada no inóculo, possibilitando que o metabolismo microbiano estivesse direcionado à produção de goma xantana.

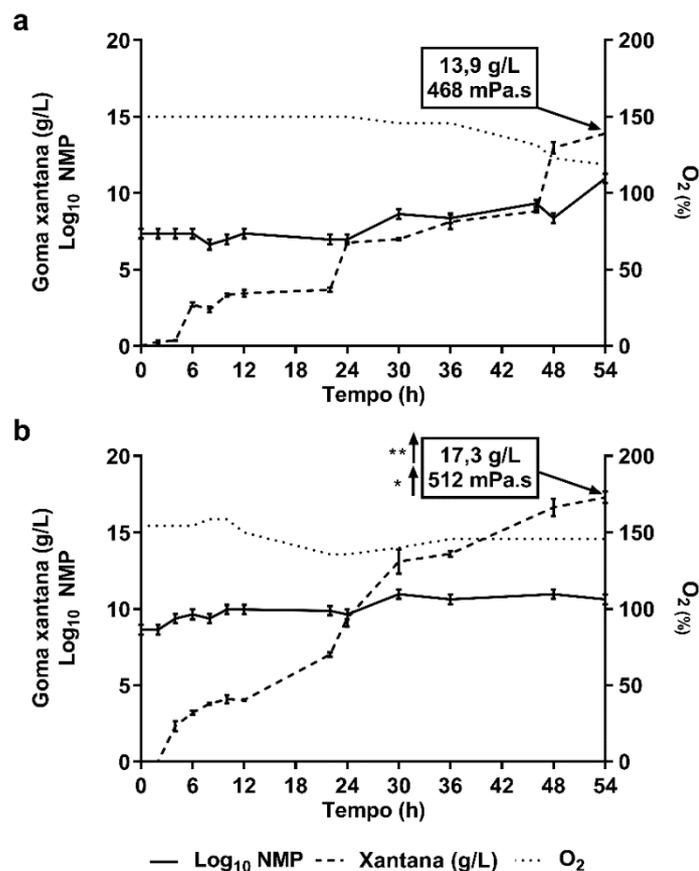
As taxas de produção de goma xantana (expressas em gramas de goma xantana produzida por litro de produção e a cada hora) foram de 0,23 e 0,34 g/L/h para os meios preparados com AD e APD após 54h. Em meio de produção com substratos mais ricos que os utilizados nessa pesquisa (alta concentração de glicose em batelada alimentada), observou-se taxas de produção entre 0,36 e 0,75 g/L/h (AMANULLAH; SATTI; NIENOW, 1998; PINCHES; PALLENT, 1986; ROSEIRO et al., 1993). As produções de 54h em biorreator (Figura 10) resultaram em 13,9 e 17,3 g/L de goma xantana para os meios feitos com AD e APD, respectivamente. A goma xantana recuperada com APD resultou em cerca de 25% mais

xantana que o controle com AD ( $p < 0.01$ ), revelando-se em considerável melhoria para a indústria de produção de goma xantana para aplicação em processos extrativos de óleo e gás.

Sabe-se que a alta viscosidade do meio, devido ao acúmulo de goma xantana, pode levar a limitação no fornecimento de oxigênio e é um dos principais fatores limitantes (GARCÍA-OCHOA; SANTOS; ALCÓN, 1995; PETERS et al., 1989; PINCHES; PALLENT, 1986; SUH; SCHUMPE; DECKWER, 1992). Nessa pesquisa, os níveis de oxigênio mantiveram-se acima dos níveis de saturação, dada a alta agitação e injeção de ar utilizados no processo. As viscosidades das produções AD e APD em biorreator (Figura 10) foram de 468 e 512 mPa.s ( $p < 0,05$ ).

Portanto, o meio de produção feito com APD mostrou três vantagens em relação ao controle: (I) o aumento de 47,8% da taxa de produção de goma xantana, (II) aumento de cerca de 9,4% da viscosidade (III) a reciclagem dos resíduos AP e GB para produção de goma xantana.

**Figura 10** - Produção de goma xantana em biorreator.



Bateladas em meio contendo AD (a) e APD (b). Fonte: Autoria própria (2021).

Comparando as respectivas produções obtidas em frascos agitados, observa-se que as bateladas em biorreator resultaram em maior quantidade de goma xantana ( $p < 0,0001$ ), correspondendo a aumentos de cerca de 63 e 93% para AD e APD. Esse aumento pode ter sido devido a alta concentração de oxigênio dissolvido e maior transferência de massa dada a alta agitação do biorreator (PETERS et al., 1989).

A alta concentração de glicose pode levar a redução na produção dos intermediários de goma xantana (LESSIE; PHIBBS, 1984; PINCHES; PALLENT, 1986). Por esse motivo, frequentemente estratégias de alimentação são utilizadas na produção de goma xantana (AMANULLAH; SATTI; NIENOW, 1998; ROSEIRO et al., 1993). Utilizando 5,5% de glicose, Peters et al. (1989) relatou produção de 18,9 g/L. Resultados similares foram observados com o uso de 4,0% de sacarose (CASAS; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000). Utilizando 4,5% desse substrato e uma cepa geneticamente modificada, foi relatada a produção de até 25g/L em bateladas de 50h (LETISSE et al., 2001). Não obstante, alguns trabalhos relataram a produção de goma xantana com 2,0% de GB como fonte de carbono, resultando em rendimentos de 5,59 g/L em 120h de batelada (DE JESUS ASSIS et al., 2014). Maiores rendimentos de produção foram observados apenas quando do uso de substratos mais ricos, tais como 3% de hidrolisados de ossos (120 h) e alimentação contínua em biorreator contendo meio a 5,0% de glicose (YANG; LO; MIN, 1996). Como nessa pesquisa foram utilizados resíduos industriais (AP e GB), o processo produtivo é economicamente vantajoso em relação aos descritos na literatura.

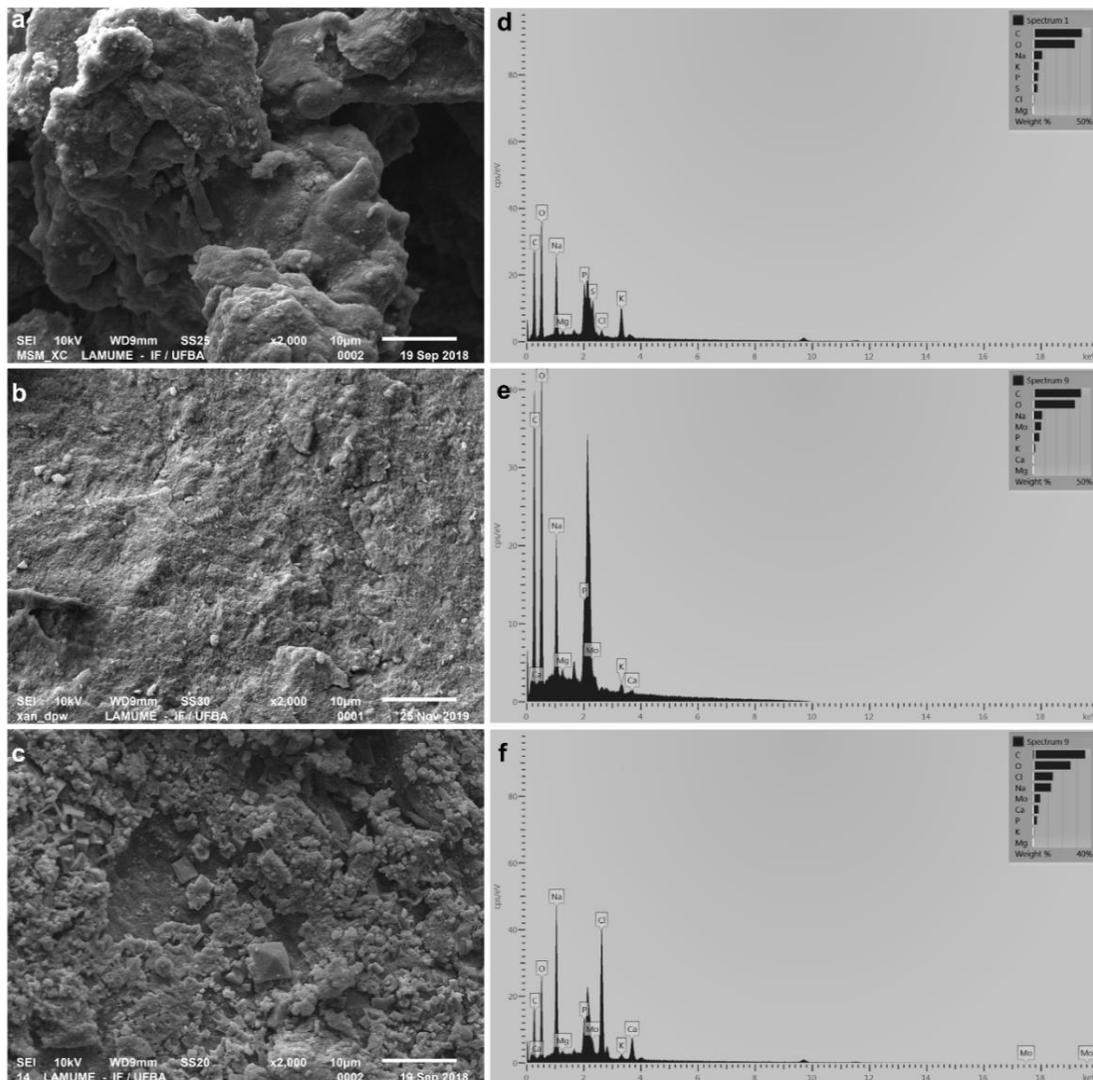
### 6.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA E ESPECTROSCOPIAS DE DISPERSÃO DE RAIOS X

A viscosidade da goma xantana está diretamente associada à sua estrutura e características químicas e sabe-se que ela sofre uma mudança na sua conformação na presença de sais. A molécula passa de um formato de espiral aleatório para uma conformação helicoidal, sendo uma transformação tão relevante que altera o comportamento reológico dos seus hidrocolóides (BEMILLER, 2019; CARRINGTON et al., 1996; LUTFI et al., 2019; ROCHEFORT; MIDDLEMAN, 1987; SATO; NORISUYE; FUJITA, 1984). Ademais, Cho et al. (2015) reportou uma redução significativa nos parâmetros reológicos quando as concentrações de NaCl foram maiores que 0,3%, uma vez que os sais protegem os grupos iônicos nas cadeias laterais da goma xantana levando a uma redução no volume molecular individual (SERENO; HILL; MITCHELL, 2007). Wyatt e Liberatore (2010) definiram o

fenômeno como uma redução do tamanho hidrodinâmico e Meyer et al. (1993) como auto agregação das moléculas de xantana, reduzindo a viscosidade das soluções. Portanto, isso pode explicar os diferentes resultados na viscosidade obtida com o aumento da concentração de AP utilizada nesta pesquisa. Além disso, como a diálise remove sais da AP, esse pré-tratamento resulta em uma maior qualidade das soluções de goma xantana quanto ao aspecto de viscosidade.

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou uma superfície irregular na goma xantana produzida com AD e APD (Figura 11a, b), inferindo a similaridade dimensional das moléculas do polímero produzidas nessas duas condições.

**Figura 11** - Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios X por dispersão em energia.



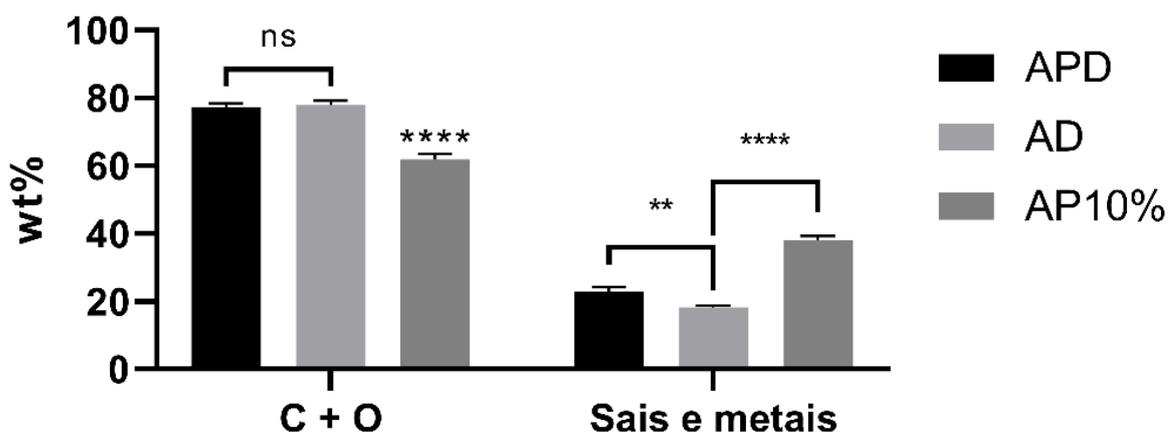
Amostras produzidas com AD (a, d), APD (b, e) e AP10% (c, f). Fonte: Autoria própria (2021).

Quando a goma xantana foi obtida com AP à concentração de 10% (Figura 11c), essa se encontrava preenchida com estruturas cristalinas e nas regiões livres de cristais, a superfície aparentava ser mais plana e homogênea. Essa organização é um indicativo de maior proximidade e interação das moléculas de goma xantana. Nesse caso, infere-se que as moléculas estejam compactadas, o que justificaria a menor viscosidade da Xantana nessa concentração de AP do que em comparação com AD.

A fração de massa de goma xantana (wt%) determinada por EDS mostrou uma menor porcentagem de C e O e um aumento em Na, particularmente como um resultado do tratamento AP10 %. As produções APD e AD mostraram desprezíveis wt% para Ca e Cl (Figura 11d, e), com um aumento nesses elementos quando utilizado AP10 % (Figura 11f).

Também foi verificada a presença do metal Mo apenas nas produções que utilizaram AP. A substância molibdato de sódio é comumente utilizada como inibidor de corrosão pela indústria de petróleo (KOLMAN; TAYLOR, 1993; SHAMS EL DIN; WANG, 1996; VENNILA et al., 2019). A presença desse elemento na goma xantana levanta a hipótese que as ligações laterais do heteropolímero tenham capturado o molibdato da AP. Assim, é possível que *Xanthomonas campestris* tenha transformado o molibdato presente na AP em outra forma passível de detecção. Embora os conteúdos de C e O tenham sido similares na xantana produzida por AD e APD, seus valores reduziram em 16% nas amostras de xantana obtidas nos experimentos com AP 10% (Figura 12). Sais e metais também variaram nas três produções avaliadas, mostrando valores 4,6 a 10% maiores para APD e AP que o controle AD, respectivamente.

**Figura 12** - Teor total de Carbono e Oxigênio e sais e metais determinado por Espectroscopia de raios X em dispersão de energia.

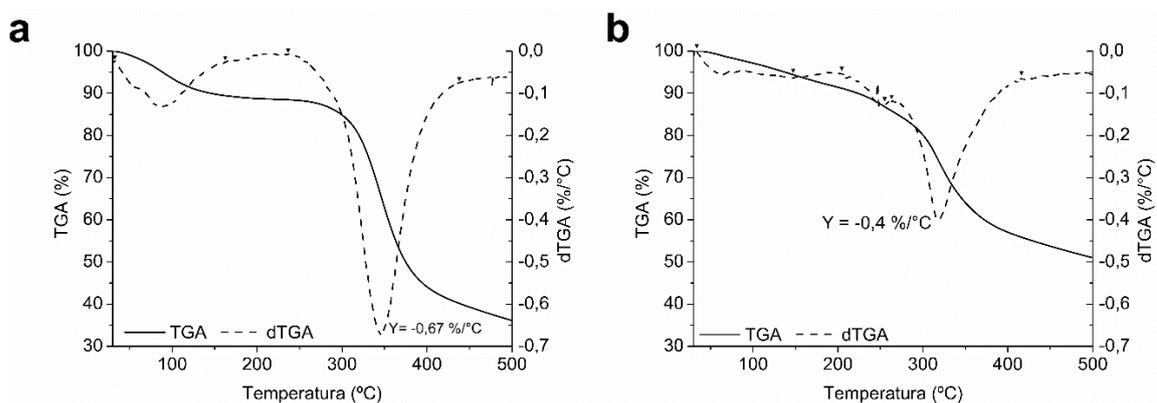


## 6.4 TERMOGRAVIMETRIA

O mecanismo de decomposição térmica da goma xantana produzida com APD pôde ser observado nas curvas de TGA/dTGA (Figura 13). A análise das curvas indica que essa goma xantana apresentou dois eventos térmicos, comportando-se de forma similar à goma xantana comercial. A primeira perda de massa ocorreu entre 33,9 e 147,2 °C e correspondeu a 5,6% de goma xantana e velocidade máxima de redução a 63,3 °C.

Esse evento, representado por um pico endotérmico, está relacionado à desidratação da goma xantana e a presença de água nas amostras pode ser atribuída à rápida aquisição de água devido à alta higroscopicidade das amostras secas. A amostra controle apresentou redução de massa de 10,5 % na primeira perda (entre 32,5 e 162,6 °C), com pico em 88,3 °C. De acordo com de Jesus Assis (2014) e Faria (2011), a goma xantana absorve água devido a presença de grupamentos polares em sua estrutura, especialmente os grupos –OH. Esse resultado mostrou que a xantana produzida com APD apresentou menor higroscopicidade em relação à xantana comercial, o que pode ser explicado pelo fato da xantana produzida nesse trabalho não ter sido purificada, possuindo um teor de sais e metais de cerca de 20% como verificado no EDS (Figura 13), reduzindo assim a quantidade de grupamentos –OH disponíveis para hidratação.

**Figura 13** - Termogravimetria (TGA) e suas derivadas (dTGA).



(a) goma xantana comercial e (b) goma xantana produzida com APD. Fonte: Autoria própria (2021).

Ademais, a goma xantana produzida com APD apresentou perdas de massa entre 204,6 –255,1 °C (4,4 %), seguida por uma reação exotérmica entre 263,2 – 416 °C (30 %) com máxima em 318 °C, na qual a dTGA indicou redução de -0,4 %/°C. Ao final desse evento, houve redução de 44,1 % da massa inicial de goma xantana e em 500 °C, 48,9 % de redução da massa inicial. O padrão comercial apresentou segunda perda de massa a 236,5 –438 °C (48,3

%) com máxima em 346,3 °C e o valor de dTGA indicando redução de 0,67%/°C nesse ponto. Ao final desse segundo evento térmico, houve redução de massa de 59,8 % e em 500 °C, redução de 64 % do valor inicial. As reações exotérmicas adicionais presentes na xantana produzida com APD foram devido a presença de impurezas na mesma, indicando a presença de sais e outras moléculas menores que o macropolímero goma xantana.

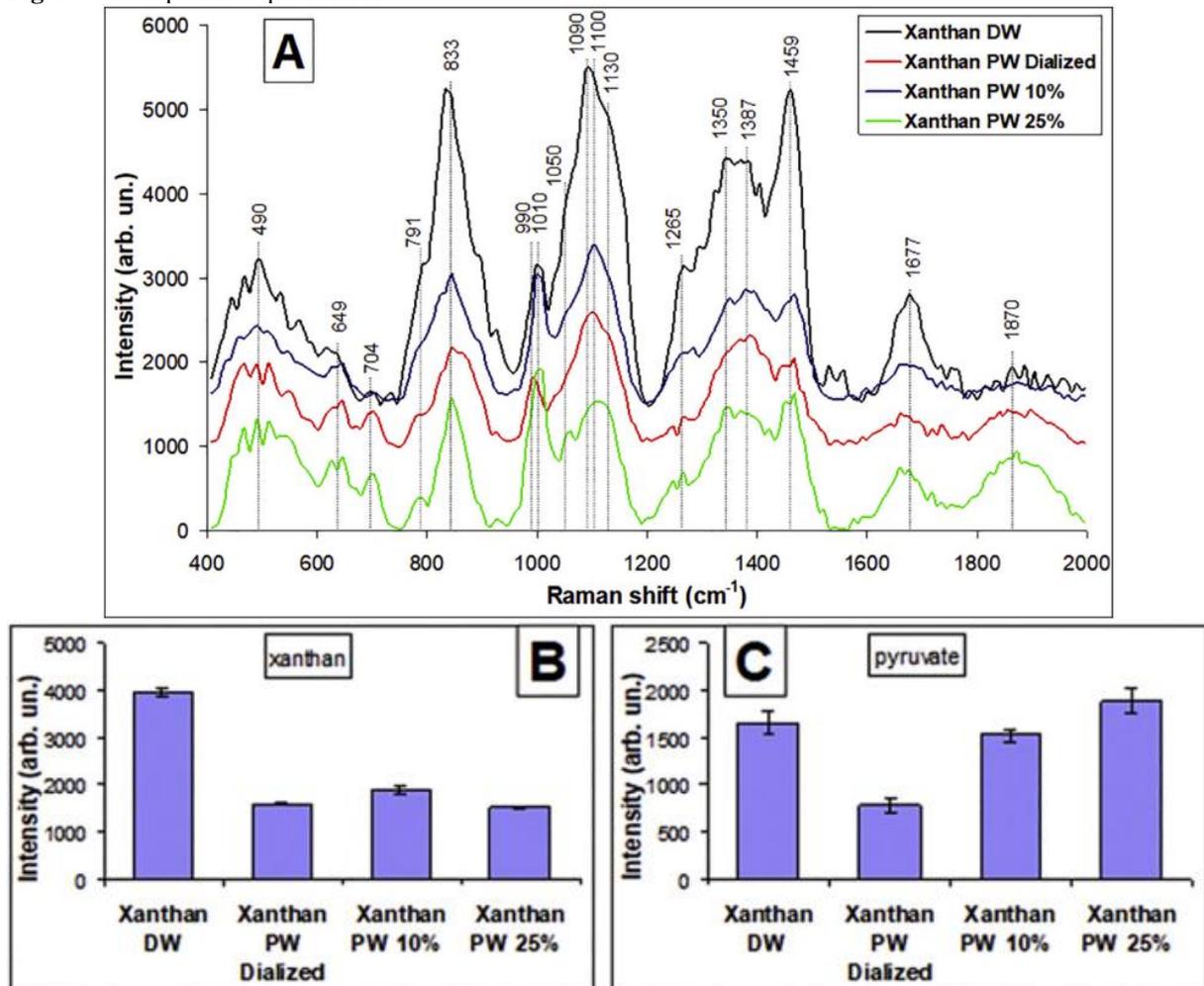
Apesar da goma xantana produzida com APD ter apresentado temperatura de redução de massa menor que o controle comercial (204,6 e 236,5 °C), a afirmação de que isso corresponda a uma menor termoestabilidade deve ser feita com cautela, dada a presença de impurezas na xantana produzida e a redução de massa que se seguiu a 263,2 °C, contra os 236,5 °C do controle comercial. Pode-se afirmar que a xantana produzida em APD apresentou termoestabilidade maior que o controle comercial, apresentando menor redução da massa total ao final da análise, o que corrobora com os dados de EDS (Figura 13) que indicam maior teor de sais e metais, indicando que apesar de menor teor de xantana, essa composição adicional é benéfica à estabilidade da molécula.

## 6.5 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Os espectros da espectroscopia Raman da goma xantana produzida por *X. campestris* (SAMPAIO et al., 2020), cultivadas em meios contendo diferentes concentrações de AP (Figura 14a), apresentaram picos característicos dos açúcares da cadeia principal desse polissacarídeo: glicose, manose, ácido glicurônico (1090 cm<sup>-1</sup>) (DORN et al., 1974; OUTUKI et al., 2016; UNIVERSITY OF COPENHAGEN, 2020; YUEN et al., 2009); e também outros picos relacionados a constituintes como o acetato (1459 cm<sup>-1</sup>) e o piruvato (1387 cm<sup>-1</sup>) (ADEBAJO et al., 2006; DE GELDER et al., 2007; KATON; COVINGTON, 1979; SAMPAIO et al., 2020; ZHAO et al., 2004).

As intensidades dos picos das amostras obtidas com diferentes concentrações de AP são um indicativo de que a produção de xantana foi influenciada por essa variável (SAMPAIO et al., 2020). Diferenças nas intensidades dos picos em ~1010 cm<sup>-1</sup> (Figura 14b) e ~1090 cm<sup>-1</sup> (Figura 14c), componentes da cadeia principal e piruvato, respectivamente, mostraram que as produções que utilizaram AP apresentaram cerca de metade da quantidade de goma xantana em relação ao controle produzido com AD (SAMPAIO et al., 2020).

Figura 14 - Espectroscopia Raman.



a) Média dos espectros por espectroscopia Raman das amostras de goma xantana produzidas em meio de cultura com AD (Xanthan DW), APD (Xanthan PW dialized), AP10% (Xanthan PW 10%) e AP25% (Xanthan PW 25%); b) Intensidade dos picos característicos para os constituintes da cadeia principal de goma xantana; c) Intensidade do pico para piruvato. Fonte: Adaptado de SAMPAIO et al. (2020).

No entanto, a quantidade de piruvato de sódio foi proporcionalmente maior nas produções com 10% e 25% de AP, mas inferior com APD. Isso indica que o uso de AP influencia tanto a quantidade de xantana quanto a de piruvato–manose (SAMPAIO et al., 2020), uma vez que cerca de metade das moléculas de manose terminal da goma xantana contém piruvato (URLACHER; NOBLE, 1997).

Esses dados, analisados em conjunto com os ensaios de NMP e microscopia com laranja de acridina, comprovam que a cepa de *Xanthomonas campestris*, de fato, apresenta sensibilidade à AP bruta (sem diluição); apresentando menor teor de matéria orgânica na goma xantana extraída e captando grande quantidade de sais e metais (até 40%) em sua composição, como verificado na amostra AP10% nos experimentos de SEM e EDS (Figuras 11 e 12). Contudo, mesmo com menor teor de goma xantana, o produto total extraído, contendo sais e

metais, apresentou viscosidade total compatível com o controle (AD) e também com a produção APD, indicando o êxito de produção de goma xantana com o reuso de AP de alta salinidade.

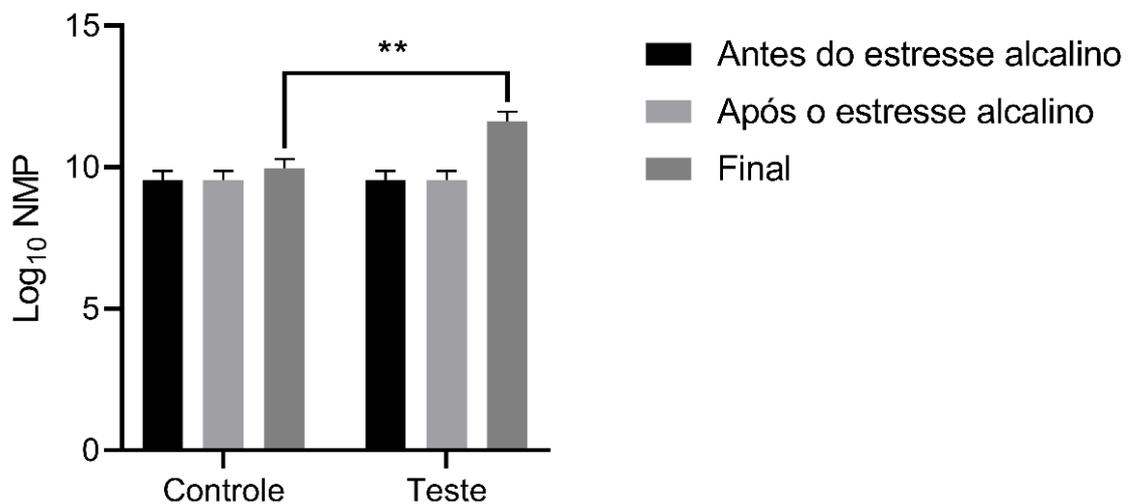
## 6.6 ESTRATÉGIAS PARA ESTÍMULO MICROBIANO E PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

### 6.6.1 Estresse alcalino

Bactérias podem produzir EPS sob várias condições, contudo, a quantidade, a estrutura e os arranjos formados são dependentes e influenciadas pelas condições nutricionais e de produção (XU et al., 2010). As condições de estresse fisiológico podem atuar de duas formas diferentes na comunidade microbiana: (I) o estresse imposto pode provocar alteração da concentração bacteriana e consequente produção de EPS, a qual se ajusta ao novo ambiente ou (II) a comunidade existente pode regular as vias metabólicas como resposta ou como reação às mudanças de condição ambiental (LIU et al., 2004). O estudo apresentado nessa sessão tem como base o segundo princípio supracitado, almejando mimetizar as ferramentas de adaptação bacteriológica à produção industrial (SAMPAIO et al., 2021).

A quantificação de *Xanthomonas campestris* sob condição de estresse alcalino (Figura 15) demonstrou que após a alcalinização (pH 9,5) não houve redução da população microbiana. A população de células viáveis permaneceu a mesma após 1 h do estresse alcalino e apresentou-se 16,7 % superior ( $p < 0,01$ ) no final da produção.

**Figura 15** - Quantificação microbiana antes, após e ao final de um cultivo em condição de estresse alcalino.



Fonte: Adaptado de SAMPAIO et al. (2021). \*\* $p < 0,01$

O aumento da concentração microbiana de uma população que já se encontrava em fase estacionária (controle), possibilita inferir que o aumento do pH mudou o perfil fisiológico da cultura, fazendo com que as bactérias voltassem a crescer (velocidade de divisão superior à de morte celular). Como estratégia de resistência à alcalinização e manutenção do pH citoplasmático em valores ótimos, bactérias podem aumentar a produção de ácidos graxos (GIOTIS et al., 2007) através da deaminação de aminoácidos e fermentação de açúcares; aumentar a atividade de ATP sintase, a qual acopla a entrada de  $H^+$  à geração de ATP; podem alterar as propriedades de superfície e aumentar a expressão e atividade de cátions monovalentes/antiportes de  $H^+$  (PADAN et al., 2005). Esses processos resultam na redução do pH citoplasmático, externo ou de ambos. Outrossim, a superexpressão de antiportes de  $Na^+$  e  $H^+$  possibilita uma série de papéis fisiológicos, incluindo a exportação de concentrações não desejáveis de  $Na^+$ , homeostase do pH, osmoregulação e sinalização (KRULWICH, 1995).

Acredita-se que chaperonas moleculares expressas entre 15 e 30 min após a exposição a álcalis, interajam com outras proteínas como forma de proteção à desnaturação e para manter o alto nível de organização intracelular, bem como chaperonas essenciais a processos de redobragem de proteínas danificadas (FOLIO et al., 2004; LIU et al., 2002), proteínas envolvidas no metabolismo e reparo de DNA, catabolismo de parede celular, biossíntese de peptidoglicano e ácido lipoteicóico e proteínas de membrana, genes de estresse e genes envolvidos em detoxificação e adaptação (GIOTIS et al., 2010).

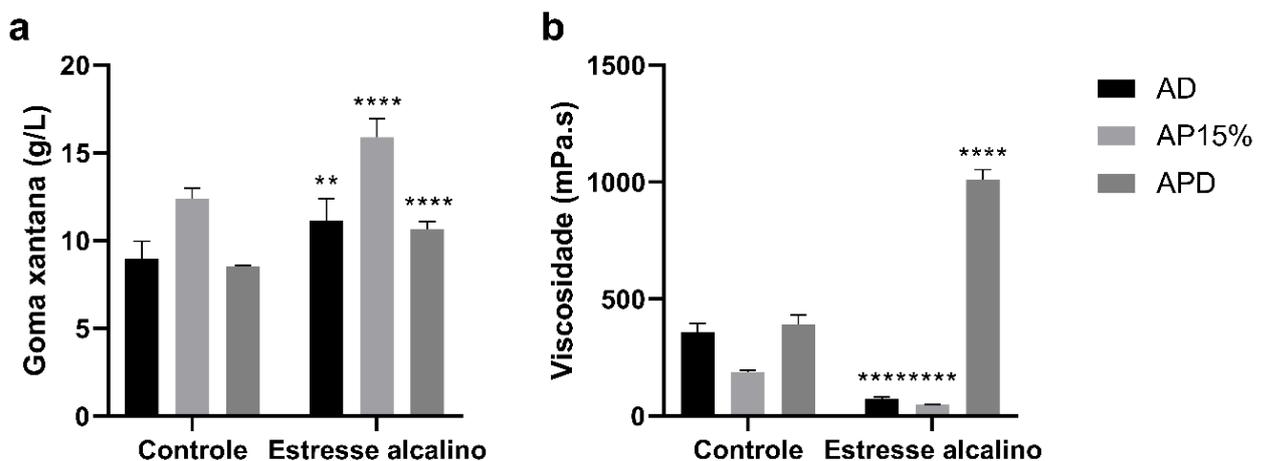
Publicações relatam diferentes perfis genéticos analisados por microarranjos de DNA de acordo com diferentes períodos de estresse alcalino, sugerindo a existência de regulação e cascatas de respostas a alcalinização em bactérias (GIOTIS et al., 2008, 2010). Uma pesquisa relatou que o número máximo de genes alterados em uma cepa de *Listeria monocytogenes* ocorreu nos 15 primeiros minutos, indicando que a reorganização dos padrões de expressão gênica ocorre rapidamente após a aplicação das condições de estresse (GIOTIS et al., 2008). O mesmo trabalho relatou que após 30–60 minutos as células começam a se recuperar do estresse inicial, mudando da resposta de emergência para um padrão de longo prazo mais sustentável para lidar com o desafio imposto pelo álcali. Não está claro como ocorre a adaptação ao estresse alcalino (pH 9,0) podendo estar relacionada à depleção de nutrientes, acidificação ou mudança para um mecanismo fermentativo mais simples (GIOTIS et al., 2008).

A mudança mais drástica durante o estresse alcalino se dá na regulação de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos. Em curto prazo (15–30 minutos) o favorecimento de vias metabólicas que levem à rápida produção de ácidos como mecanismo compensatório

ao efeito do alto pH (GIOTIS et al., 2008, 2010), codificando enzimas como piruvato desidrogenase, succinato semialdeído desidrogenase, fosfoglicerato mutase e o sistema de fosfotransferase de açúcares, incluindo os associados a antiportes de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , transportadores de solutos ligados a ATP, motilidade e virulência, bem como a rede de resistência ao estresse  $\zeta\text{B}$  e sua equivalente em bactérias gram negativas. Ainda, a indução de genes tais como transportadores de maltodextrina sugere que a captação e processamento inicial de certos açúcares é favorecida sob estresse alcalino, por serem de fácil e rápida fermentação a fim de originarem produtos ácidos (MAURER et al., 2005). Muitas enzimas induzidas pelo estresse alcalino são associadas com o metabolismo do piruvato, alanina desidrogenase, lactato desidrogenase e piruvato formato liase, enzimas relacionadas à biossíntese e a degradação de valina, leucina e isoleucina, metabolismo de glicerolípídeos, bem como do ciclo do ácido cítrico, proteínas de transporte e ligação, incluindo antiportes  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e transportadores do tipo cassete de ligação a ATP (GIOTIS et al., 2008).

Já na fase de adaptação, a maioria dos genes relacionados ao metabolismo de carboidratos estão em níveis normais de expressão (GIOTIS et al., 2010), mas verifica-se aumento da expressão (até 30 vezes) de fosfotransferases dependentes de fosfoenolpiruvato, as quais atuam na captação de açúcares; bem como uma alta regulação de transportadores que importam  $\text{H}^+$  durante a respiração oxidativa quando em estresse alcalino (GIOTIS et al., 2008). Essas mudanças de expressão podem explicar a maior produção de goma xantana (Figura 16).

**Figura 16** - Produção de goma xantana sob condição de estresse alcalino.



a) Goma xantana; b) Viscosidade. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Fonte: Adaptado de SAMPAIO et al. (2021).

Observou-se que em meio preparado com AD, houve maior recuperação de goma xantana por *X. campestris* (aumento de 8,97 para 11,15 g/L) representando um aumento de

24,4%. Quando analisada a viscosidade (Figura 16b) das produções em estresse alcalino, verificou-se redução, exceto nos testes que utilizaram APD, no qual houve aumento da viscosidade de 390,9 mPa.s para 1030,7 mPa.s quando submetida ao estresse alcalino, representando um aumento de 163%.

Alguns trabalhos relataram produção de goma xantana sob condições alcalinas, sendo verificadas alterações na quantidade e qualidade da mesma (ESGALHADO; ROSEIRO; COLLAÇO, 1995; LEE et al., 2011; MELLO et al., 2015; NICHOLS; GUEZENNEC; BOWMAN, 2005; RYE et al., 1988; TRINDADE; MUNHOZ; BURKERT, 2018). Utilizando 5 % de sacarose como fonte de C, foi relatado produção de 16,5 g/L, representando aumento de 74,8 % de goma xantana após 24 h em biorreator e com alcalinização até o pH 12,0 (MELLO et al., 2015), já outro trabalho que utilizou 2,5% de sacarose e 2,5% de GB como fonte de C e alcalinização de pH 11,0, resultou em produção de 10,78 g/L em frascos agitados, representando aumento de 164,86 % (TRINDADE; MUNHOZ; BURKERT, 2018).

Apesar da xantana produzida nesses trabalhos continuar exibindo pseudoplasticidade, a viscosidade foi reduzida em comparação ao controle. A baixa viscosidade pode ter sido devido ao baixo peso molecular de xantana produzida em elevados pH (BORGES et al., 2009), à compactação da estrutura do polímero, devido a repulsão eletrostática causada pelos íons carregados positivamente (CARRINGTON et al., 1996; MELLO et al., 2015) ou à hidrólise do polímero. Trabalho publicado por Mello et al. (2015) sugeriu que o estresse alcalino pode induzir as células a produzirem grande quantidade de goma xantana como mecanismo protetor à condição adversa, sendo reportada morte microbiana quando utilizado estresse alcalino elevado (pH 12), sendo observada a presença de citoplasma vacuolado e descontinuidade de membranas. Os resultados do estresse alcalino empregado no presente trabalho diferiram dos relatados na literatura: foram obtidas soluções de goma xantana com viscosidade superior ao controle, quando utilizada APD e estresse alcalino (pH 9,5) no qual não foi observada redução da população microbiana.

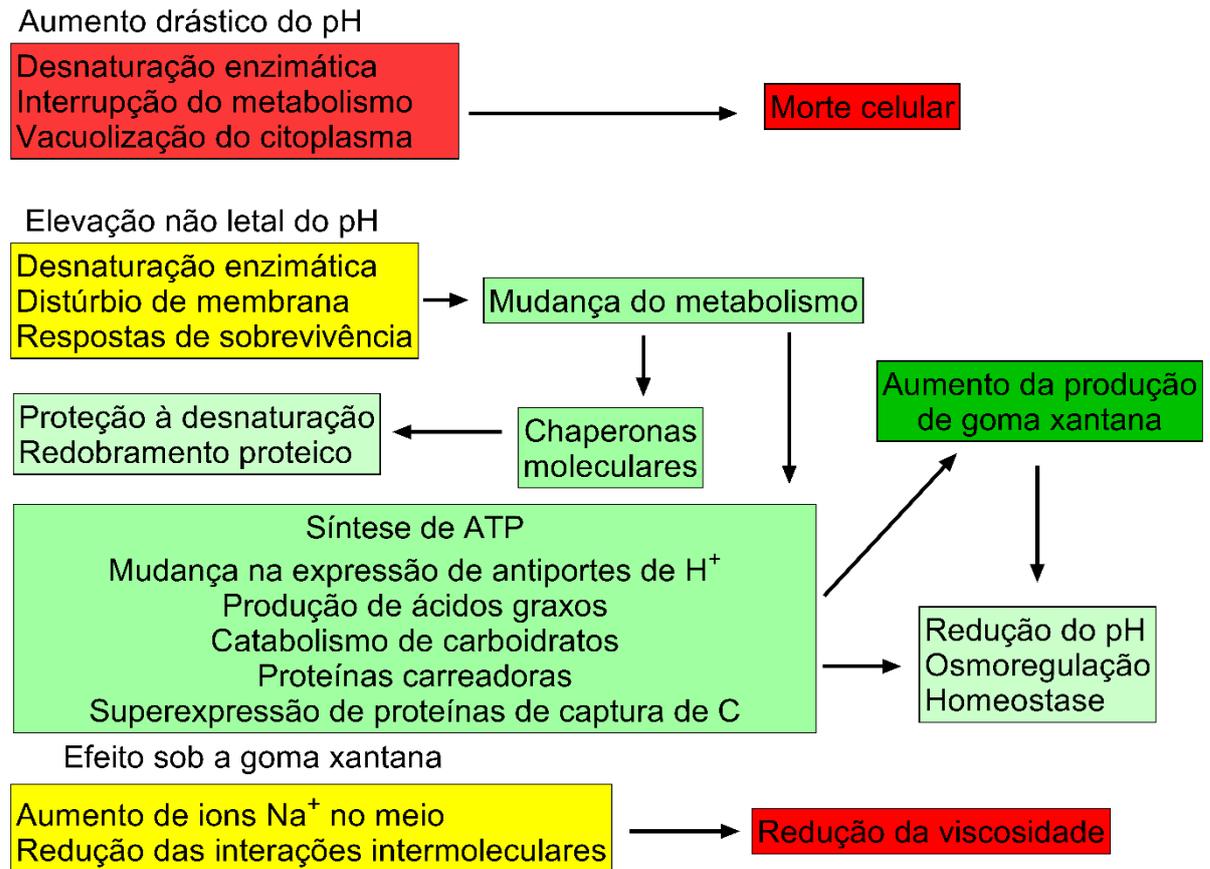
Acredita-se que o aumento da viscosidade com o aumento do pH (LIU et al., 2011) seja devido ao alto nível de ionização dos grupamentos carboxílicos da goma xantana, o que explicaria o resultado de maior viscosidade observado com a APD. Por outro lado, a redução da viscosidade possivelmente está relacionada à acumulação do álcali no polissacarídeo negativamente carregado, o que explicaria o resultado obtido com AP e AP15%. Um aspecto interessante é que, soluções de EPS que exibem maior viscosidade, apresentam considerável

tolerância a altas temperaturas, ao aumento do pH, e a uma ampla variação de salinidade (PATEL et al., 2013).

A caracterização de uma comunidade microbiana baseada em flóculos presente em um ambiente hiperalcalino (CHARLES et al., 2017), mostrou que sua composição tem como base EPS contendo distintos tipos de carboidratos (sendo representados principalmente por manose), sais, lipídeos, proteínas e eDNA (DNA ambiental) criam um microambiente (pH 10,4) com química distinta do ambiente externo (pH 11,0), determinando o sucesso dessa comunidade nesse ambiente (CHARLES et al., 2017; DANG; LOVELL, 2016; KATHARIOS-LANWERMEYER et al., 2014). Estudos sugerem que biopolímeros ricos em manose (PERRY IV et al., 2005), como os produzidos por *Xanthomonas* sp., estão diretamente envolvidos no sequestro de espécies de cálcio. Além disso, o eDNA presente em alguns EPS, embora de natureza ácida como resultado da ligação de nucleotídeos à posição 3' para 5' de ligações fosfodiéster, tem papel no sequestro de cálcio devido a sua interação termodinamicamente favorável com íons cálcio (CHARLES et al., 2017; DAS et al., 2014).

Acredita-se que o cálcio seja um agente provocador de biofloculação, formando flóculos de até 240 µm de tamanho e seu sequestro por EPS tem como função suporte estrutural ao flóculo e como tamponante do pH (CHARLES et al., 2017). Fosfolipídeos ácidos também estão associados com membranas bacterianas alcalifílicas e podem atuar como tamponante ao pH externo (ENOMOTO; KOYAMA, 1999). Proteínas podem cobrir as frações de carboidratos de EPS e a produção de proteínas extracelulares está relacionada a floculação (HIGGINS; NOVAK, 1997) e ação tamponante devido a sua natureza ácida (TSUJII, 2002). Um esquema resumido do que foi abordado e direcionado à produção de goma xantana encontra-se na imagem a seguir (Figura 17):

**Figura 17** - Mecanismos de estresse alcalino e seus efeitos sob a produção de goma xantana.



Fonte: Adaptado de SAMPAIO et al. (2021).

### 6.6.2 Adição de surfactante

Acredita-se que os surfactantes possam ajudar no aumento da produção de goma xantana (GALINDO; SALCEDO, 1996; GHASHGHAEI; SOUDI; HOSEINKHANI, 2016; JOHNSTON et al., 2003). Algumas propriedades dos surfactantes podem explicar esse aumento, dentre elas: o aumento da transferência de oxigênio e, portanto, a melhora da produção de goma xantana e suas características reológicas, tais como viscosidade (GALINDO; SALCEDO, 1996; JANAS et al., 2003) e a maior produção de enzimas hidrolisantes (ASTHER et al., 1987; FISCHER; KLEBER, 1987). Por conseguinte, é relatado que o aumento da permeabilidade de membrana, a modificação do metabolismo de lipídeos e a elevação da produção enzimática são alguns dos fatores que contribuem para maior secreção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* (ASTHER et al., 1987; FISCHER; KLEBER, 1987).

Os surfactantes afetam as membranas bacterianas e, mais especificamente, perturbam a membrana externa menos seletiva das mesmas (ALAKOMI et al., 2000; GHASHGHAEI;

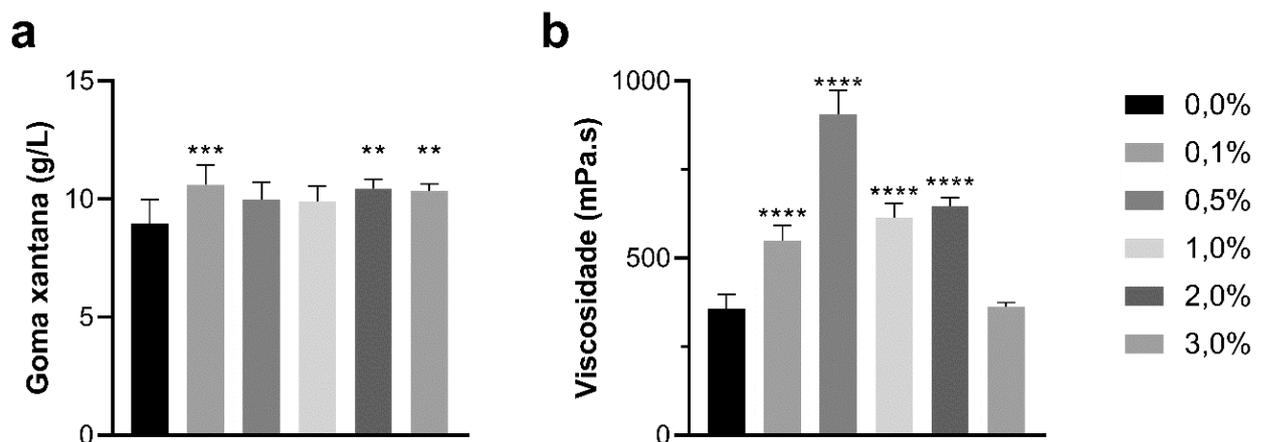
SOUDI; HOSEINKHANI, 2016; JANAS et al., 2003) através da qual podem provocar melhor liberação da goma xantana, além de poderem interagir com fosfolipídeos, provocando a expansão de poros da membrana (GHASHGHAEI et al., 2018), bem como umectar o envelope celular e assim melhorar a absorção de nutrientes (DESAI; PATEL; DESAI, 1986; MIZRAHI; MILLER, 1969). Ghashghaei et al. (2018) relatou que esse mecanismo pode ser melhor aplicável a fungos e outros organismos que possuam membranas celulares espessas e condensadas. Segundo esse autor, em bactérias Gram negativas, como *Xanthomonas campestris*, a interação de surfactantes em suas barreiras celulares (membranas interna e externa) normalmente resulta em dano e aumento do nível de extravasamento de ATP e açúcares reduzidos para o meio de cultura.

Especula-se que após haver o dano de membrana e extravasamento de compostos de baixo peso molecular (purinas, pirimidinas, pentoses e fosfatos inorgânicos) são seguidos pelo extravasamento de moléculas maiores, como o ATP (JOHNSTON et al., 2003). Também foi relatada alteração da morfologia de bacilo para cocobacilo (GALINDO; SALCEDO, 1996) e redução de tamanho (GALINDO; SALCEDO, 1996; GHASHGHAEI et al., 2018), bem como expansão dos poros de membrana e formação de micelas (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; JOHNSTON et al., 2003), evidenciando extravasamento celular. Acredita-se que essa redução de tamanho e mudança de morfologia possam resultar em maior taxa absorção de oxigênio, dada maior área superficial das células (GALINDO; SALCEDO, 1996). Além disso, hipotetiza-se que os detergentes possam interagir com a membrana celular e interferir no processo de polimerização ou excreção da molécula de xantana (IELPI; COUSO; DANKERT, 1993).

Alguns trabalhos relatam que surfactantes do tipo Triton são tóxicos ao crescimento bacteriano (GHASHGHAEI et al., 2018; JOHNSTON et al., 2003; MAKHDOUMI-KAKHKI, 2006), apesar de aumentarem a permeabilidade de membrana (ALAKOMI et al., 2000), já outros trabalhos mostram que esse tipo de surfactante é benéfico à produção de metabólitos (GALINDO; SALCEDO, 1996; JANAS et al., 2003). Foi mostrado que a aplicação de surfactantes na idiofase resultou em efeito positivo, tanto na concentração – com aumentos de cerca de, 10% (GHASHGHAEI et al., 2018), 36% (JANAS et al., 2003) 50% (GALINDO; SALCEDO, 1996), quanto na viscosidade – 10% (GHASHGHAEI et al., 2018), 200% (GALINDO; SALCEDO, 1996) e redução da biomassa microbiana – 20% (GHASHGHAEI et al., 2018), 45% (GALINDO; SALCEDO, 1996; JANAS et al., 2003). Também foi constatado que a adição desses compostos na trofofase, prejudica o crescimento microbiano e a produção de goma xantana, mesmo em baixas concentrações (GHASHGHAEI et al., 2018).

A triagem da concentração do surfactante Triton X-100 (Figura 18a) mostrou tolerabilidade da cepa de *Xanthomonas campestris* às 5 concentrações testadas, havendo aumento da produção de goma xantana em relação ao controle, não havendo diferença estatística entre elas. A viscosidade da produção com 0,5% de Triton X-100 (Figura 18b) foi maior que a dos demais valores, aumentando de 357,1 para 906 mPa.s, indicando benefício do uso desse composto, para melhoria das propriedades da goma xantana ou suas soluções (SAMPAIO et al., 2021). Esse resultado difere dos achados de Ghashghaei et al. (2018), evidenciando que a tolerabilidade e benefício advindos dessas substâncias variam de acordo com o tipo de surfactante e cepa empregada, haja vista que o surfactante Triton X-100 também foi testado em outro organismo Gram negativo (*Enterobacter* sp.), nas mesmas condições e meio de cultura, resultando em um efeito tóxico a essa última cepa, mesmo quando aplicado a concentração mínima de 0,1% (SAMPAIO et al., 2021).

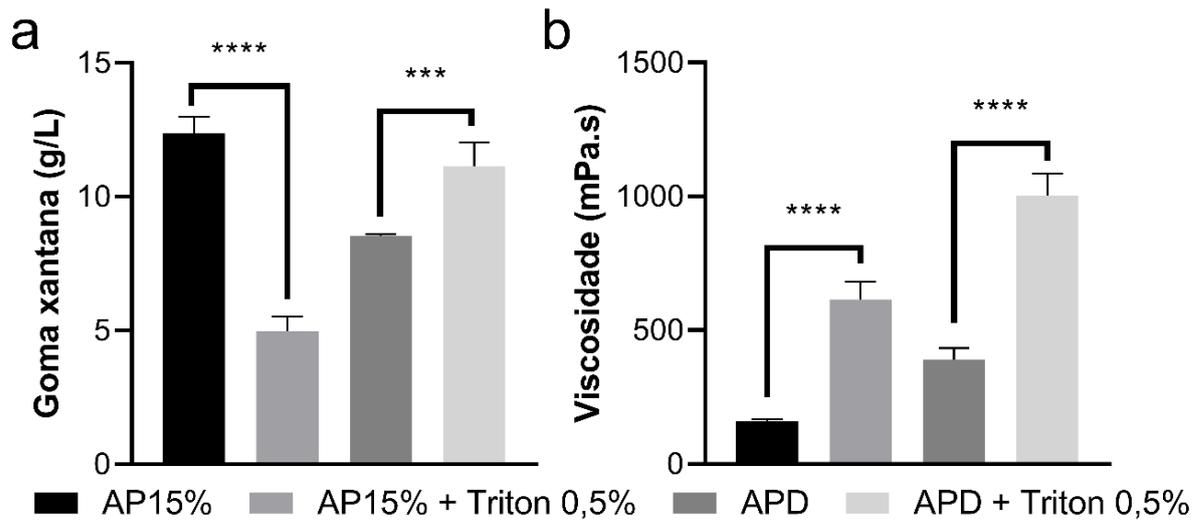
**Figura 18** - Triagem das concentrações de Triton X-100 sob *Xanthomonas campestris*.



Meio preparado com AD. a) produção de goma xantana e b) viscosidade das soluções. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Fonte: Adaptado de SAMPAIO et al. (2021).

Quando testadas produções de goma xantana com a concentração de 0,5% de Triton X-100 em AP (Figura 19), verificou-se redução de produção com AP 15% e aumento com APD. Em ambos os casos o produto gerado possuiu maior viscosidade. Hipotetiza-se que, na presença dos sais da AP15%, o distúrbio provocado pelo Triton X-100 na membrana de *Xanthomonas* tenha agravado a perda de homeostase, reduzindo assim seus processos de aquisição de energia e produção de goma xantana, já que muitas das enzimas responsáveis pela polimerização estão localizadas na membrana celular.

**Figura 19** - Efeito do surfactante Triton X-100 sob *Xanthomonas campestris*.



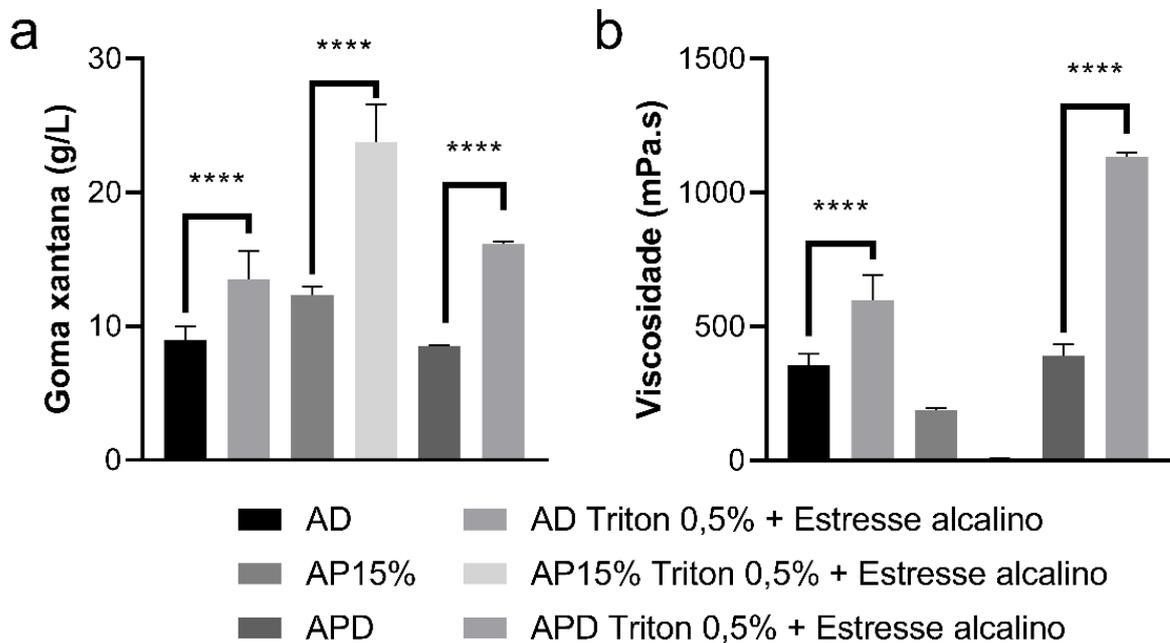
Meio preparado com AP e APD. a) produção de goma xantana e b) viscosidade das soluções. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Fonte: Adaptado de SAMPAIO et al. (2021).

### 6.6.3 Estresse alcalino e adição de surfactante simultaneamente

A partir desses dados, prosseguiu-se à combinação do estresse alcalino ao surfactante Triton X-100. A combinação do estresse alcalino com o uso do surfactante Triton X-100 mostrou aumento de produção de goma xantana em meios utilizando AD, AP15% e APD. Porém, apenas foi verificado aumento de viscosidade nas produções com AD e APD (SAMPAIO et al., 2021).

A produção com a aplicação simultânea do Surfactante Triton X-100 e da alcalinização com NaOH 5M (Figura 20a) em AD aumentou a produção de goma xantana de 8,97 para 13,53 g/L e a viscosidade de 357,1 para 597,6 mPa.s (aumento de 51 e 67,3%, respectivamente), com ambos os parâmetros apresentando significância de  $p < 0,001$ .

**Figura 20** - Efeito simultâneo do estresse alcalino e surfactante sob a produção de goma xantana.



a) Goma xantana; b) Viscosidade. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Fonte: Adaptado de SAMPAIO et al. (2021).

A produção com AP15% aumentou de 12,37 para 23,75 g/L (aumento de 92%) e uma significância de  $p < 0,0001$ , porém reduzindo a viscosidade do produto final. A produção com APD aumentou de 8,55 para 16,13 g/L e a viscosidade (Figura 21b) de 390,9 para 1135 mPa (aumento de 88,7 e 190,4 %) com significância de ambos de  $p < 0,0001$  (SAMPAIO et al., 2021). Esses resultados mostram que a associação do estresse alcalino e o Triton X-100 resultou no desenvolvimento de uma tecnologia para aumento de produção e viscosidade de goma xantana, associando o gerenciamento sustentável dos resíduos AP e GB e possibilitando a competitividade do mercado nacional de produção de goma xantana (SOUZA et al., 2020).

Além do efeito do surfactante sobre o microrganismo e sua produção, verificou-se presença de pequena quantidade de espuma durante o preparo de soluções para análise da viscosidade da goma xantana, mas não no grupo controle que não possuía o Triton X-100, tornando-se necessário discutir os possíveis efeitos desse detergente sobre as interações na molécula de xantana.

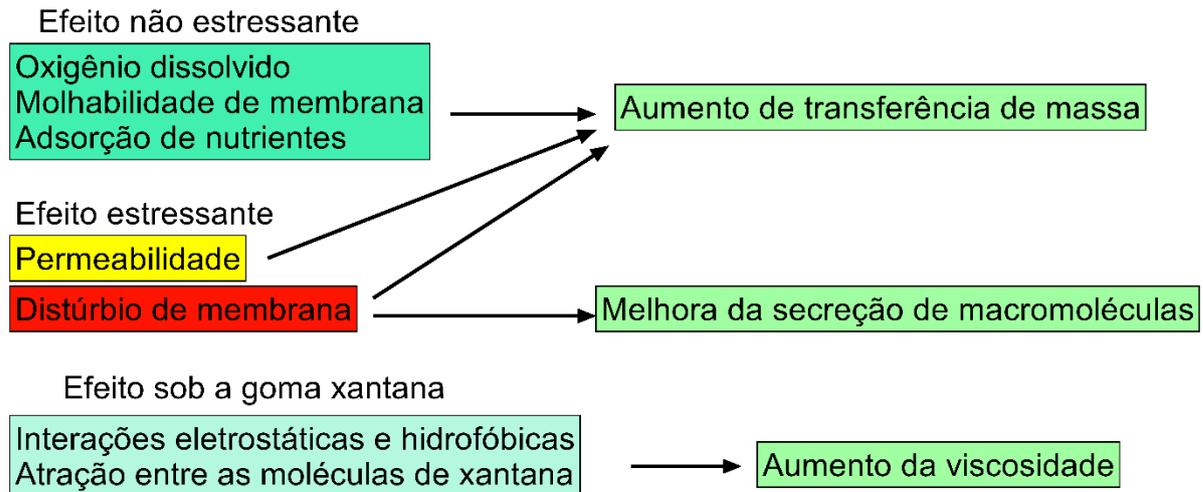
Sabe-se que as interações entre polímeros e surfactantes são principalmente eletrostáticas e hidrofóbicas (TAJOURI; EL AFERNI; GUETTARI, 2016) e que a interação entre um polieletrólito e um surfactante de mesma carga pode ocorrer se o polieletrólito contém grupamentos hidrofóbicos e as forças atrativas entre eles supera sua repulsão mútua (ANTHONY; ZANA, 1996; MIYAZAWA; WINNIK, 2003; WINNIK; REGISMOND;

GODDARD, 1997). A goma xantana atua como um eletrólito e sua viscosidade é altamente dependente das forças eletrostáticas atrativas/repulsivas (KRSTONOŠIĆ; MILANOVIĆ; DOKIĆ, 2019).

Com a adição do surfactante Triton X-100, a força iônica das soluções de xantana pode ser alterada, neste estudo, é proposta a existência de possíveis interações: (I) a região apolar do surfactante interage com a região apolar da goma xantana, havendo o seguimento hidrofílico do surfactante livre para captar íons  $\text{Na}^+$  e dessa forma reduzir a ação dos mesmos sobre os grupamentos  $\text{OH}^-$  da xantana, preservando a atração entre as moléculas do polímero; (II) a interação do seguimento apolar do Triton X-100 com a região apolar de uma molécula de xantana, e o grupamento hidrofílico interagindo com radicais  $\text{OH}^-$  de outra molécula de xantana, atuando como uma “cola” eletrostática e assim aumentando as interações entre as moléculas de xantana (SAMPAIO et al., 2021).

Um estudo da interação de surfactantes, como SDS e Tween 80, com soluções de polissacarídeos e o efeito dessa interação sobre as características dessas soluções, relatou mudança nas interações intermoleculares e também na viscosidade, podendo haver aumento de viscosidade quando melhorada a atração entre as moléculas do polissacarídeo (KRSTONOŠIĆ; MILANOVIĆ; DOKIĆ, 2019; ZHANG et al., 2015). A baixa viscosidade da goma xantana produzida apenas com o uso do estresse alcalino levanta a hipótese que o Triton X-100, além de atuar diretamente sobre a melhora da produção, também possua o efeito de restabelecer as forças eletrostáticas atrativas normalmente presentes em soluções de goma xantana, mas reduzidas quando do uso da alcalinização (SAMPAIO et al., 2021). Um esquema resumido do efeito de surfactantes sobre *Xanthomonas campestris* e suas implicações na produção de goma xantana encontra-se na imagem a seguir (Figura 21).

**Figura 21** - Efeito de surfactante em *Xanthomonas campestris*.



Fonte: Adaptado de SAMPAIO et al. (2021).

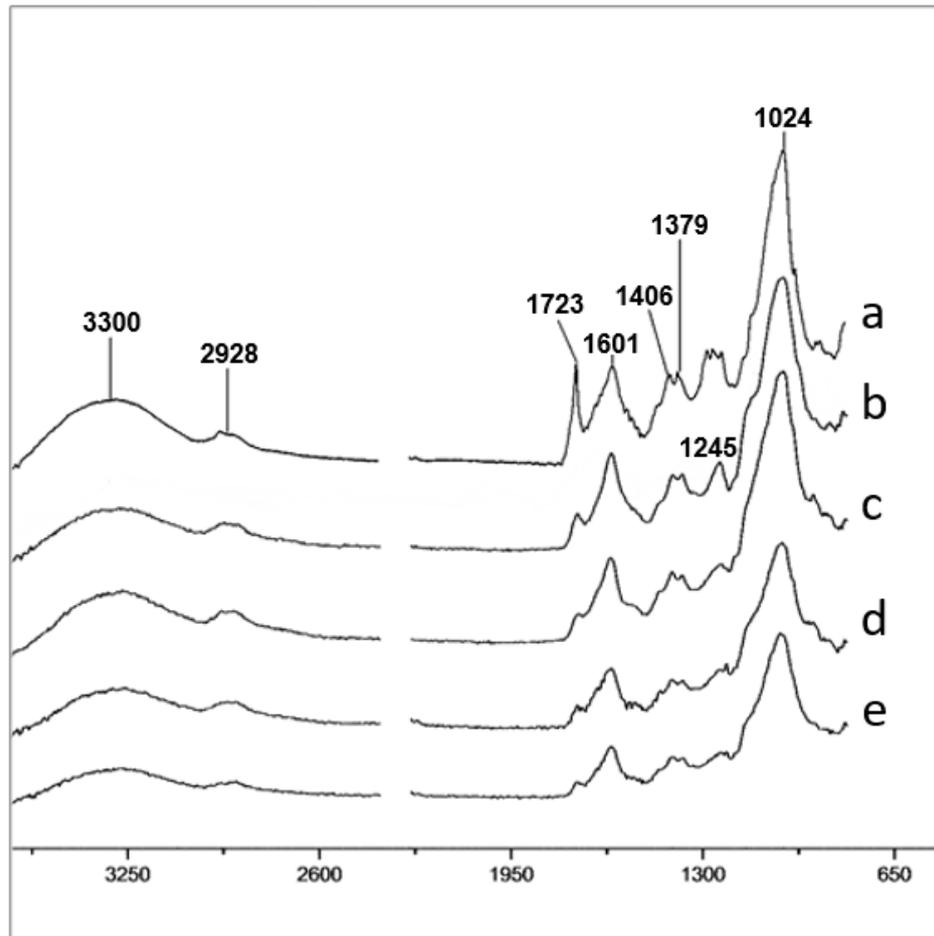
#### 6.6.4 Análise dos produtos por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

Espectros de FT-IR (Figura 22) das amostras de goma xantana produzida com APD e com uso de Triton X-100 e estresse alcalino (Figura 22b) mostram bandas que são referências do teor de açúcar presentes nas cinco amostras, como a região de  $3300\text{ cm}^{-1}$  correspondente a grupamentos  $\text{OH}^-$  do Triton X-100 e do anel de carboidratos, presentes na maioria dos polissacarídeos e responsável por conferir solubilidade aos mesmos (KARBOWIAK et al., 2011).

A região de  $2928\text{ cm}^{-1}$  é um indicativo de CH de grupamentos metila presentes em hexoses como glicose e manose (CASTELLANE et al., 2017) e a região de  $1723\text{ cm}^{-1}$  corresponde a carboxila ou ao alongamento de  $\text{C}=\text{O}$  de grupamentos acetato da goma xantana (FARIA et al., 2011). A região de  $1601\text{ cm}^{-1}$  pode estar relacionada a presença do grupo funcional  $\text{COO}^-$  (ANJUM et al., 2015; FARIA et al., 2011) ou ao alongamento de  $\text{C}=\text{O}$  do Triton X-100 e no grupamento piruvato de goma xantana (KANG et al., 2019; WANG et al., 2017, 2018). Já as regiões  $1406$  e  $1379\text{ cm}^{-1}$  indicam alongamento assimétrico de carboximetilatos da xantana (OSIRO; FRANCO; COLNAGO, 2011). As produções de goma xantana oriundas de APD e APD submetida ao estresse alcalino e surfactante, apresentaram um pico bem definido na região de  $1245\text{ cm}^{-1}$ , sendo um indicativo da deformação do acetato (OSIRO; FRANCO; COLNAGO, 2011). Todas produções apresentaram o pico característico de xantana ou *fingerprint* localizado próximo a região de  $1024\text{ cm}^{-1}$  e correspondente ao alongamento de C-O (FARIA et al., 2011; OSIRO; FRANCO; COLNAGO, 2011). De acordo

com dados de literatura (BANU; BABU; RAJENDRAN, 2018) e correlação com as amostras tratadas com Triton X-100 e estresse alcalino (Figura 22b) e apenas com Triton X-100 (Figura 22d), não foram observados indícios de que a modificação e definição das bandas sejam devidas a interferência espectral do surfactante.

**Figura 22** - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.



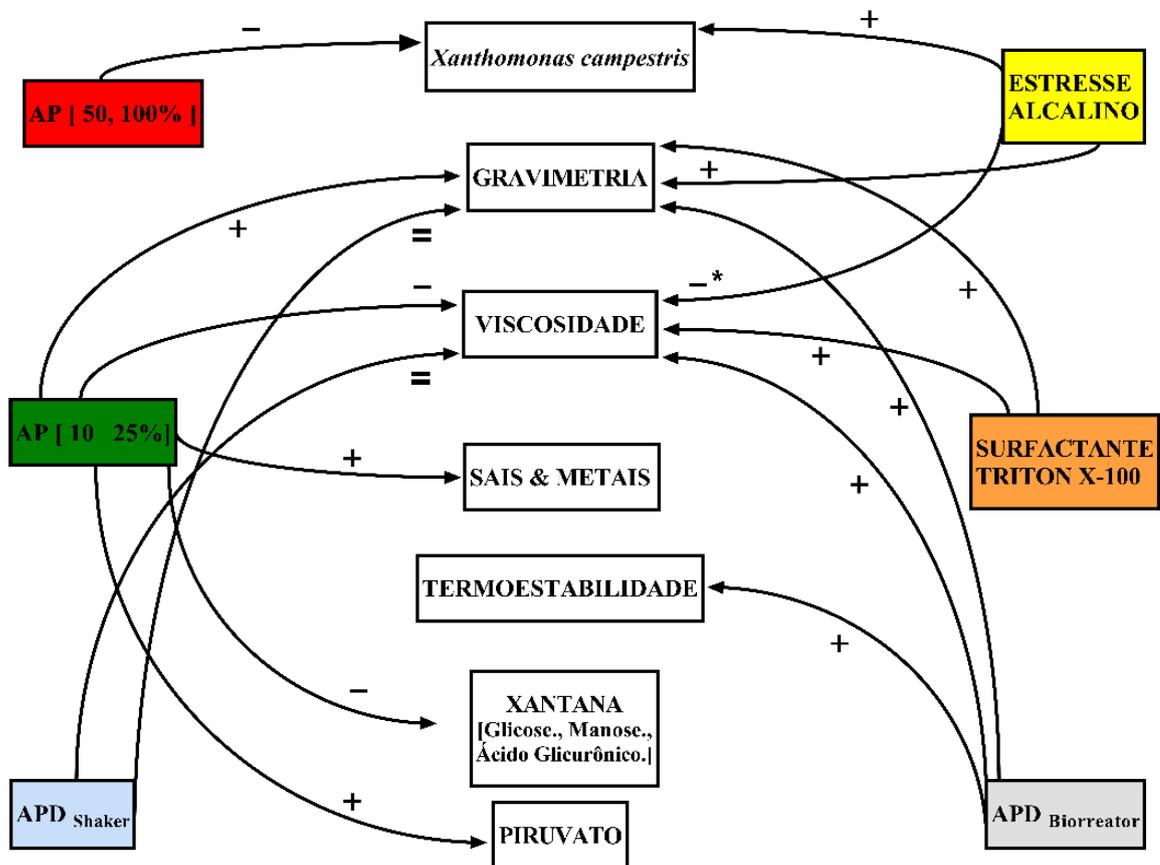
a) Padrão comercial; b) APD + estresse alcalino + Triton X-100; c) APD, d) APD + Triton X-100; e) APD + estresse alcalino. Fonte: Adaptado de SAMPAIO et al. (2021).

Foi possível observar grande similaridade nas bandas exibidas pelo controle comercial (Figura 22a) e as bandas das produções com estresse alcalino e surfactante (Figura 22b) e apenas com APD (Figura 22c). As mesmas bandas podem ser visualizadas nas amostras apenas com estresse alcalino e apenas com Triton X-100. Pode-se inferir a partir dos dados de FT-IR que, o estresse alcalino associado ao Triton X-100 é benéfico e origina um extraído com composição espectral melhor definida que os demais testes (SAMPAIO et al., 2021).

A fim de determinar se a interação do surfactante e a goma xantana por si só aumentariam a viscosidade, foram realizados testes do surfactante misturado à goma xantana, constatando-se não haver interferência do mesmo, resultado também descrito na literatura

(GALINDO; SALCEDO, 1996). Por isso, nós propomos que o início da interação da goma xantana se dê ainda na etapa de polimerização e seja reduzida após o polímero já estar montado (SAMPAIO et al., 2021). A associação do estresse alcalino e o Triton X-100 resultou no desenvolvimento de uma tecnologia para aumento de produção e viscosidade de goma xantana quando do uso de meio de cultura preparado com APD ou AD (SOUZA et al., 2020). Um resumo gráfico dos efeitos positivos ou negativos das variáveis AP, APD (produções em shaker e biorreator), Estresse alcalino e Surfactante Triton X-100 pode ser observado na figura a seguir (Figura 23).

**Figura 23** - Efeitos positivos ou negativos das variáveis sob os parâmetros avaliados no projeto de doutorado.



\* Exceto APD (+).

Efeito positivo (+), efeito negativo (-) e sem interferência (=). Fonte: Autoria própria (2021).

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo desenvolveu um método biológico para o reaproveitamento da água produzida e glicerina bruta produzidas pela indústria de energia visando a produção de goma

xantana. Produções de xantana foram obtidas usando concentrações de até 25% de água produzida e água produzida dialisada. Bateladas de 54 h em biorreator resultaram na produção de 17,3 g/L de xantana com o uso de água produzida dialisada. Análises por espectroscopia de raios X por dispersão em energia e microscopia eletrônica de varredura mostraram incorporação de constituintes salinos e minerais na composição da xantana, os quais alteraram a reologia e termoestabilidade da molécula. Apesar da espectroscopia Raman ter mostrado que a xantana produzida ser espectroscopicamente similar à xantana comercial (Sigma), a intensidade do pico de  $\sim 1090\text{ cm}^{-1}$  indicou que a xantana produzida com água destilada (padrão) apresentou um maior teor dos constituintes de xantana (comercial) e, quando a água produzida dialisada foi utilizada, a xantana produzida mostrou maior teor de piruvato, sugerindo influência do tipo de água usado na composição da xantana. A avaliação reológica demonstrou que as produções com maiores viscosidades foram aquelas obtidas com água destilada e água produzida dialisada. Contudo, a viscosidade total por L de produção foi semelhante ao controle com o uso de água produzida diluída a 10%, o que sugere o uso dessa concentração para maximizar o reaproveitamento desse resíduo. O uso de estresse alcalino promoveu o aumento da produção de xantana e o uso de 0,5% do surfactante Triton X-100 aumentou a viscosidade das soluções de xantana. A associação do estresse alcalino com o surfactante Triton X-100 aumentou significativamente a produção (88,7%) e a viscosidade (190,4%) da xantana produzida por *X. campestris* em meio preparado com água produzida dialisada, produto esse possuindo todas características espectrais da goma xantana. Conclui-se que o método desenvolvido “surfactant/alkali-stress” é inovador, considerando-se o aumento de produção da Xantana e melhora da viscosidade de suas soluções.

## 8. REFERÊNCIAS

360IRESEARCH. **Produced Water Treatment Market Research Report by Type (Offshore and Onshore), by Application (Primary Separation, Secondary Separation, and Tertiary Separation), by Region (Americas, Asia-Pacific, and Europe, Middle East & Africa) - Global Forecast to 2026**. Maharashtra, India: [s.n.]. Disponível em:

<[https://www.reportlinker.com/p06087203/Produced-Water-Treatment-Market-Research-Report-by-Type-by-Application-by-Region-Global-Forecast-to-Cumulative-Impact-of-COVID-19.html?utm\\_source=GNW](https://www.reportlinker.com/p06087203/Produced-Water-Treatment-Market-Research-Report-by-Type-by-Application-by-Region-Global-Forecast-to-Cumulative-Impact-of-COVID-19.html?utm_source=GNW)>.

360IRESEARCH. **Xanthan Gum Market Research Report by Application, by Region - Global Forecast to 2026 - Cumulative Impact of COVID-19**. Maharashtra, India: [s.n.].

Disponível em: <[https://www.reportlinker.com/p06089107/Xanthan-Gum-Market-Research-Report-by-Application-by-Region-Global-Forecast-to-Cumulative-Impact-of-COVID-19.html?utm\\_source=GNW](https://www.reportlinker.com/p06089107/Xanthan-Gum-Market-Research-Report-by-Application-by-Region-Global-Forecast-to-Cumulative-Impact-of-COVID-19.html?utm_source=GNW)>.

ABU ELELLA, M. H. et al. **Xanthan gum-derived materials for applications in environment and eco-friendly materials: A review**. [s.l.] Elsevier B.V., 2020.

ABU ELELLA, M. H. et al. Innovative bactericidal adsorbents containing modified xanthan gum/montmorillonite nanocomposites for wastewater treatment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 1113–1125, jan. 2021.

ADEBAJO, M. O. et al. Raman spectroscopic investigation of acetylation of raw cotton. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 64, n. 2, p. 448–453, maio 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. N. E B. **Boletim da Produção de Petróleo e Gás Natural: Nº125**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins-anp/bmp/2021/2021-01-boletim.pdf>>.

AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE.

**Allene Jeanes.** Disponível em: <<https://www.ars.usda.gov/news-events/news/research-news/2017/national-inventors-hall-of-fame-honors-ars-scientist/>>. Acesso em: 23 ago. 2020.

AL-GHOUTI, M. A. et al. Produced water characteristics, treatment and reuse: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 28, p. 222–239, abr. 2019.

ALAKOMI, H.-L. et al. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2001–2005, 1 maio 2000.

ALMANSOORY, A. F.; AL-BALDAWI, I. A.; HAZAIMEH, M. Optimization of the EPS production of a bacterial floc consortium using different parameters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, n. September 2019, p. 101466, 2020.

ALMARZA, C. A.; ROMERO, F. Production and characterization of xanthan gum by different strains of *Xanthomonas campestris* isolated from various natural sources in submerged culture. **Revista Ingeniería UC**, v. 20, n. April 2013, p. 34–41, 2013.

AMANULLAH, A. et al. The influence of impeller type in pilot scale Xanthan fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 1, p. 95–108, 5 jan. 1998.

AMANULLAH, A.; SATTI, S.; NIENOW, A. W. Enhancing Xanthan Fermentations by Different Modes of Glucose Feeding. **Biotechnology Progress**, v. 14, n. 2, p. 265–269, 3 abr. 1998.

AMANULLAH, A.; TUTTIETT, B.; NIENOW, A. W. Agitator speed and dissolved oxygen effects in Xanthan fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 2, p. 198–210, 20 jan. 1998.

ANJUM, F. et al. Microwave Irradiated Copolymerization of Xanthan Gum with Acrylamide for Colonic Drug Delivery. **BioResources**, v. 10, n. 1, p. 1434–1451, 15 jan. 2015.

ANTHONY, O.; ZANA, R. Interactions between Water-Soluble Polymers and Surfactants:

- Effect of the Polymer Hydrophobicity. 1. Hydrophilic Polyelectrolytes. **Langmuir**, v. 12, n. 8, p. 1967–1975, jan. 1996.
- ASHOUR, E. Optimization of Fermentation Conditions for Xanthan Production by *Xanthomonas Campestris* NRRL B-1459. **Journal of Union of Arab Biologists**, **9B**, **Microbiology and Virus**, p. 211–228, 2000.
- ASHRAF, A. et al. Reproducibility of Pilot Scale Xanthan Fermentations. **Biotechnology Progress**, v. 12, n. 4, p. 466–473, 5 ago. 1996.
- ASTHER, M. et al. Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, n. 4, p. 245–249, abr. 1987.
- BALDI, F. et al. Dissolution of barium from barite in sewage sludges and cultures of *Desulfobibrio desulfuricans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2398–2404, 1996.
- BANU, V. R. N.; BABU, V. R.; RAJENDRAN, S. Investigating the corrosion inhibition efficiency of surgical carbon steel instruments used in medical field. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 8, n. 12, p. 79–90, 22 jan. 2018.
- BEMILLER, J. N. Xanthan. In: BEMILLER, J. (Ed.). . **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**. 3. ed. St. Paul, MN, USA: Elsevier, 2019. p. 261–269.
- BIANCO, I. et al. Xanthan Pyruvilation Is Essential for the Virulence of *Xanthomonas campestris* pv . *campestris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 29, n. 9, p. 688–699, 2016.
- BORETTI, A.; ROSA, L. Reassessing the projections of the World Water Development Report. **npj Clean Water**, v. 2, n. 1, p. 15, 31 dez. 2019.
- BORGES, C. D. et al. The influence of thermal treatment and operational conditions on xanthan produced by *X. arboricola* pv *pruni* strain 106. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2,

p. 262–268, 2009.

BRANDÃO, L. V. et al. Bioconversion from crude glycerin by *Xanthomonas campestris* 2103: xanthan production and characterization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 4, p. 737–746, dez. 2013.

BROOKS, J. D.; GOULD, K.; SMITH, J. W. Isoprenoid Hydrocarbons in Coal and Petroleum. **Nature**, v. 222, n. 5190, p. 257–259, abr. 1969.

CAMPISANO, R. et al. **Selected Analytical Methods for Environmental Remediation and Recovery (SAM) 2017**. Washington, DC: [s.n.].

CARRINGTON, S. et al. Polyelectrolyte behaviour of dilute xanthan solutions: Salt effects on extensional rheology. **Polymer**, v. 37, n. 13, p. 2871–2875, jun. 1996.

CASAS, J. . A.; SANTOS, V. . E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: Molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 2–4, p. 282–291, fev. 2000.

CASTELLANE, T. C. L. et al. Characterization of new exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 361–369, mar. 2017.

CHARLES, C. J. et al. Flocculation Reduces the pH Stress Experienced by Microorganisms Living in Alkaline Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 6, p. 1–12, 15 mar. 2017.

CHINALIA, F.; PATON, G.; KILLHAM, K. Physiological and toxicological characterization of an engineered whole-cell biosensor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 4, p. 714–721, mar. 2008.

CHO, H. M.; YOO, W.; YOO, B. Effect of NaCl addition on rheological behaviors of commercial gum-based food thickener used for dysphagia diets. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 20, n. 2, p. 137–142, 2015.

- CRUGEIRA, P. J. L. et al. Effects of photostimulation on the catabolic process of xenobiotics. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 191, n. November 2018, p. 38–43, 2019.
- DANG, H.; LOVELL, C. R. Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 91–138, 23 mar. 2016.
- DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1–13, 2011.
- DAS, T. et al. Influence of calcium in extracellular DNA mediated bacterial aggregation and biofilm formation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–11, 2014.
- DE GELDER, J. et al. Reference database of Raman spectra of biological molecules. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 38, n. 9, p. 1133–1147, set. 2007.
- DE JESUS ASSIS, D. et al. A study of the effects of aeration and agitation on the properties and production of xanthan gum from crude glycerin derived from biodiesel using the response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2769–2785, 2014.
- DE SMET, M. J.; KINGMA, J.; WITHOLT, B. The effect of toluene on the structure and permeability of the outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 506, n. 1, p. 64–80, 4 jan. 1978.
- DEMIRCI, A. S. et al. Xanthan gum biosynthesis using *Xanthomonas* isolates from waste bread: Process optimization and fermentation kinetics. **LWT**, v. 101, p. 40–47, mar. 2019.
- DESAI, J. D.; PATEL, H. C.; DESAI, A. J. Effect of tween series surfactants on alkaloid production by submerged cultures of *Claviceps* species. **Journal of Fermentation Technology**, v. 64, n. 6, p. 499–501, jan. 1986.
- DORN, E. et al. Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad.

**Archives of Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 61–70, 1974.

ENOMOTO, K.; KOYAMA, N. Effect of growth pH on the phospholipid contents of the membranes from alkaliphilic bacteria. **Current Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 270–273, 1999.

ESGALHADO, M. E.; ROSEIRO, J. C.; COLLAÇO, M. T. A. Interactive Effects of pH and Temperature on Cell Growth and Polymer Production by *Xanthomonas campestris*. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 7, p. 667–671, 1995.

FARIA, S. et al. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth.

**Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 469–476, ago. 2011.

FAYAD, N. M. et al. Effectiveness of a bioremediation product in degrading the oil spilled in the 1991 Arabian Gulf War. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 787–796, dez. 1992.

FISCHER, B. E.; KLEBER, H.-P. Isolation and characterization of the extracellular lipase of *Acinetobacter calcoaceticus* 69 V. **Journal of Basic Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 427–432, 1987.

FOLIO, P. et al. Two-dimensional electrophoresis database of *Listeria monocytogenes* EGDe proteome and proteomic analysis of mid-log and stationary growth phase cells.

**PROTEOMICS**, v. 4, n. 10, p. 3187–3201, out. 2004.

FREITAS, F. et al. Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolated *Enterobacter* strain A47 DSM 23139. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 159–165, 2011.

FULAZZAKY, M.; SETIADI, T.; FULAZZAKY, M. A. An evaluation of the oilfield-produced water treatment by the membrane bioreactor. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 5, p. 104417, out. 2020.

FUNAHASHI, H. et al. Effects of agitation by flat-bladed turbine impeller on microbial production of xanthan gum. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 20, n. 1, p. 16–22, 1987.

GALINDO, E.; SALCEDO, G. Detergents improve xanthan yield and polymer quality in cultures of *Xanthomonas campestris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 145–149, 1996.

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

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCÓN, A. Xanthan gum production: An unstructured kinetic model. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 3, p. 206–217, 1995.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; FRITSCH, A. P. Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 12, p. 991–996, 1992.

GHASHGHAEI, T. et al. Effects of Nonionic Surfactants on Xanthan Gum Production: a Survey on Cellular Interactions. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 60–66, 1 fev. 2018.

GHASHGHAEI, T.; SOUDI, M. R.; HOSEINKHANI, S. Optimization of xanthan gum production from grape juice concentrate using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology. **Applied Food Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15–23, 2016.

GIOTIS, E. S. et al. Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 997–1001, 2007.

GIOTIS, E. S. et al. Genomic and proteomic analysis of the Alkali-Tolerance Response (AITR) in *Listeria monocytogenes* 10403S. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 1–11, 2008.

GIOTIS, E. S. et al. Transcriptome analysis of alkali shock and alkali adaptation in *Listeria monocytogenes* 10403S. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 10, p. 1147–1157, 2010.

GOMES, N. C. M. et al. Mangrove microniches determine the structural and functional

diversity of enriched petroleum hydrocarbon-degrading consortia. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 74, n. 2, p. 276–290, 2010.

GREER, C. W.; WHYTE, L. G.; NIEDERBERGER, T. D. Microbial Communities in Hydrocarbon- Contaminated Temperate, Tropical, Alpine, and Polar Soils. In: TIMMIS, K. N. (Ed.). . **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. [s.l.] Springer, 2010.

GUTIERREZ, T. Aerobic Hydrocarbon-Degrading Gammaproteobacteria: Xanthomonadales. In: MCGENITY, T. J. (Ed.). . **Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 1–15.

HABIBI, H.; KHOSRAVI-DARANI, K. Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, n. April 2017, p. 130–140, abr. 2017.

HAUSINGER, R. P. New metal cofactors and recent metallocofactor insights. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 59, p. 1–8, dez. 2019.

HERNANDEZ-RAQUET, G. et al. Molecular diversity studies of bacterial communities of oil polluted microbial mats from the Etang de Berre (France). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 58, n. 3, p. 550–562, 2006.

HIGGINS, M. J.; NOVAK, J. T. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. **Journal of Environmental Engineering**, v. 123, n. 5, p. 479–485, 1997.

HSU, C. H.; LO, Y. M. Characterization of xanthan gum biosynthesis in a centrifugal, packed-bed reactor using metabolic flux analysis. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1617–1625, 2003.

IELPI, L.; COUSO, R. O.; DANKERT, M. A. Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 9, p. 2490–500, maio 1993.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Oil: Analysis and forecast to 2026**. [s.l.: s.n.].

JANAS, P. et al. Effect of detergents on xanthan production during batch and continuous cultivation of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. **Acta Scientiarum Polonorum.**

**Technologia Alimentaria**, v. 02, n. 1, p. 125–133, 2003.

JARVIS, B.; WILRICH, C.; WILRICH, P. T. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 5, p. 1660–1667, 2010.

JEANES, A. et al. **Polysaccharide (Xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: Procedures for Culture Maintenance and Polysaccharide Production, Purification, and Analysis.** Washigton, DC: U.S. Department of Agriculture, 1976.

JOHNSEN, A. R. Introduction to Microplate MPN-Enumeration of Hydrocarbon Degraders. In: TIMMIS, K. N. (Ed.). . **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.** Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 4159–4172.

JOHNSTON, M. D. et al. Membrane damage to bacteria caused by single and combined biocides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 6, p. 1015–1023, 13 maio 2003.

KALOGIANNIS, S. et al. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 249–256, 2003.

KANG, Y. et al. Biosynthesis, structure and antioxidant activities of xanthan gum from *Xanthomonas campestris* with additional furfural. **Carbohydrate Polymers**, v. 216, p. 369–375, jul. 2019.

KARBOWIAK, T. et al. Investigation of water transfer across thin layer biopolymer films by infrared spectroscopy. **Journal of Membrane Science**, 2011.

KATHARIOS-LANWERMEYER, S. et al. Mini-review: Microbial coaggregation: ubiquity and implications for biofilm development. **Biofouling**, v. 30, n. 10, p. 1235–1251, 2014.

KATON, J. E.; COVINGTON, D. T. The Vibrational Spectra of Crystalline Sodium Pyruvate. **Spectroscopy Letters**, v. 12, n. 10, p. 761–766, 6 jan. 1979.

KOLMAN, D. G.; TAYLOR, S. R. Sodium molybdate as a corrosion inhibitor of mild steel in natural waters part 2: molybdate concentration effects. **Corrosion**, v. 49, n. 8, p. 635–643, 1993.

KORCZ, E.; VARGA, L. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 375–384, abr. 2021.

KRSTONOŠIĆ, V.; MILANOVIĆ, M.; DOKIĆ, L. Application of different techniques in the determination of xanthan gum-SDS and xanthan gum-Tween 80 interaction. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 108–118, 2019.

KRULWICH, T. A. Alkaliphiles: 'basic' molecular problems of pH tolerance and bioenergetics. **Molecular Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 403–410, fev. 1995.

KUMAR, A.; SINGH, K.; AHUJA, M. Xanthan-g-poly(acrylamide): Microwave-assisted synthesis, characterization and in vitro release behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 261–267, 2009.

KUPPUSWAMI, G. M. **Fermentation (Industrial): Production of Xanthan Gum**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 2

LAL, S. et al. Biosurfactant and exopolysaccharide-assisted rhizobacterial technique for the remediation of heavy metal contaminated soil: An advancement in metal phytoremediation technology. **Environmental Technology & Innovation**, v. 10, p. 243–263, maio 2018.

LARIK, I. A. et al. Biodegradation of Petrochemical Hydrocarbons Using an Efficient Bacterial Consortium: A2457. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 41, n. 6, p. 2077–2086, 5 jun. 2016.

LEE, Y. et al. Molecular characterization of the extracellular matrix in a *Pseudomonas putida* dsbA mutant: Implications for acidic stress defense and plant growth promotion. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 3, p. 302–310, 2011.

- LEMKAU, K. L. et al. The M/V Cosco Busan spill: Source identification and short-term fate. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 11, p. 2123–2129, nov. 2010.
- LESSIE, T. G.; PHIBBS, P. V. Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. **Annual review of microbiology**, v. 38, p. 359–88, 1984.
- LETISSE, F. et al. Kinetic analysis of growth and xanthan gum production with *Xanthomonas campestris* on sucrose, using sequentially consumed nitrogen sources. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 4, p. 417–422, 2001.
- LI, C. et al. A Novel Manganese Efflux System , *YebN* , Is Required for Virulence by *Xanthomonas oryzae* pv . *oryzae*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. 1–11, 2011.
- LI, G. et al. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. **Water Research**, v. 34, n. 15, p. 3845–3853, 2000.
- LI, M. et al. An cost-effective production of bacterial exopolysaccharide emulsifier for oil pollution bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 159, p. 105202, abr. 2021.
- LIU, D. et al. Exploiting nonionic surfactants to enhance fatty alcohol production in *Rhodospiridium toruloides*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 117, n. 5, p. 1418–1425, 11 maio 2020.
- LIU, S.-B. et al. Optimization of Fermentation Conditions and Rheological Properties of Exopolysaccharide Produced by Deep-Sea Bacterium *Zunongwangia profunda* SM-A87. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e26825, 11 nov. 2011.
- LIU, S. et al. Identification of *Listeria monocytogenes* Genes Expressed in Response to Growth at Low Temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1697–1705, abr. 2002.
- LIU, Y. et al. Six-helix bundle assembly and analysis of the central core of mumps virus fusion protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 421, n. 1, p. 143–148, 2004.

- LUTFI, Z. et al. Effect of NaCl on physicochemical properties of xanthan gum – Water chestnut starch complexes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 557–563, 2019.
- MAKHDOUMI-KAKHKI, A. Suitable Nonionic Surfactants for the Erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea*. **Journal of Science (University of Tehran)**, v. 32, n. 1, p. 41–46, 2006.
- MATHIVANAN, K. et al. Production and functionality of exopolysaccharides in bacteria exposed to a toxic metal environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, n. October 2020, p. 111567, jan. 2021.
- MAURER, L. M. et al. pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 1, p. 304–319, 2005.
- MELLO, M. DE et al. Structure of xanthan gum and cell ultrastructure at different times of alkali stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 102–109, 2015.
- MEYER, E. L. et al. Investigation of xanthan gum solution behavior under shear flow using rheoptical techniques. **Macromolecules**, v. 26, n. 3, p. 504–511, maio 1993.
- MILADINOV, V. D.; HANNA, M. A. Apparent viscosity of co-extruded starch and xanthan gum. **Industrial Crops and Products**, v. 5, n. 3, p. 183–188, 1996.
- MIYAZAWA, K.; WINNIK, F. M. Isothermal titration calorimetry and fluorescence spectroscopy studies of the interactions between surfactants and a phosphorylcholine-based polybetaine. In: **Aqueous Polymer — Cosolute Systems**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003. p. 149–156.
- MIZRAHI, A.; MILLER, G. Role of glycols and tweens in the production of ergot alkaloids by *Claviceps paspali*. **Journal of bacteriology**, v. 97, n. 3, p. 1155–9, mar. 1969.
- MURUGESAN, A. . et al. Production of Xanthan employing *Xanthomonas campestris* using Sugarcane Molasses. **American Journal of Environmental Engineering**, v. 2, n. 2, p. 31–

34, 9 abr. 2012.

NEFF, J.; LEE, K.; DEBLOIS, E. M. Produced Water: Overview of Composition, Fates, and Effects. In: LEE, K.; NEFF, J. (Eds.). . **Produced Water**. New York, NY: Springer New York, 2011. p. 3–54.

NEFF, J. M.; SAUER, T. C.; MACIOLEK, N. Composition, Fate and Effects of Produced Water Discharges to Nearshore Marine Waters. In: **Produced Water**. Boston, MA: Springer US, 1992. p. 371–385.

NEJADMANSOURI, M. et al. Production of xanthan gum using immobilized *Xanthomonas campestris* cells: Effects of support type. **Biochemical Engineering Journal**, v. 157, p. 107554, abr. 2020.

NICHOLS, C. A. M.; GUEZENNEC, J.; BOWMAN, J. P. Bacterial Exopolysaccharides from Extreme Marine Environments with Special Consideration of the Southern Ocean, Sea Ice, and Deep-Sea Hydrothermal Vents: A Review. **Marine Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 253–271, 21 ago. 2005.

NIU, J. et al. Review on microbial enhanced oil recovery: Mechanisms, modeling and field trials. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 192, n. April, p. 107350, set. 2020.

OJAGH, S. M. A.; FALLAH, N.; NASERNEJAD, B. Biological treatment of organic compounds in produced water with use of halotolerant bacteria. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 6, p. 104412, dez. 2020.

OSIRO, D.; FRANCO, R. W. A.; COLNAGO, L. A. Spectroscopic characterization of the exopolysaccharide of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Cu<sup>2+</sup> resistance mechanism. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 7, p. 1339–1345, jul. 2011.

OUTUKI, P. M. et al. Development of arabic and xanthan gum microparticles loaded with an extract of *Eschweilera nana* Miers leaves with antioxidant capacity. **Colloids and Surfaces**

**A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2016.

OZDAL, M.; BAŞARAN KURBANOĞLU, E. Use of Chicken Feather Peptone and Sugar Beet Molasses as Low Cost Substrates for Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* MO-03. **Fermentation**, v. 5, n. 1, p. 9, 14 jan. 2019.

PADAN, E. et al. Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1717, n. 2, p. 67–88, 2005.

PAPP-WALLACE, K. M.; MAGUIRE, M. E. Manganese Transport and the Role of Manganese in Virulence. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 187–209, 2006.

PATEL, A. et al. **Lubricants and Drag Reducers for Oilfield Applications - Chemistry, Performance, and Environmental Impact**. All Days. Anais...The Woodlands, Texas, USA: SPE, 8 abr. 2013Disponível em: <<http://www.onepetro.org/doi/10.2118/164049-MS>>

PERRY IV, T. D. et al. Binding of harvested bacterial exopolymers to the surface of calcite. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 22, p. 8770–8775, 2005.

PETERS, H. et al. The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, n. 11, p. 1393–1397, 20 dez. 1989.

PETERS, K. E.; WALTERS, C. C.; MOLDOWAN, J. M. Biodegradation parameters. In: PETERS, K. E.; WALTERS, C. C.; MOLDOWAN, J. M. (Eds.). . **The Biomarker Guide**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. p. 645–708.

PILLARD, D. A.; TIETGE, J. E.; EVANS, J. M. Estimating the Acute Toxicity of Produced Waters to Marine Organisms Using Predictive Toxicity Models. In: **Produced Water 2**. Boston, MA: Springer, 1996. p. 49–59.

PINCHES, A.; PALLENT, L. J. Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 10, p. 1484–1496, 1986.

PINHEIRO, A. L. B. et al. Effects of photo-stimulation with laser or LED on the composition

of Xanthan gum produced in media containing distilled water or dialyzed or not produced water by means of Raman spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 213, n. July, 2020.

POLARIS MARKET RESEARCH. **Crude Glycerine Market Share, Size, Trends, Industry Analysis Report, By Glycerol Content (Less than 80%, 80% - 90%, More than 90%); By Application (Animal Feed, Wastewater Treatment, Biogas, Oleochemistry, Others); By Regions; Segment Forecast, 2021 - 20**. [s.l: s.n.]. Disponível em:

<<https://www.polarismarketresearch.com/industry-analysis/crude-glycerine-market>>.

POPLAWSKY, A. R.; URBAN, S. C.; CHUN, W. Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5123–5127, 2000.

RANA, S.; UPADHYAY, L. S. B. Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 157, p. 577–583, ago. 2020.

RICE, E. W.; BAIRD, R. B.; EATON, A. D. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 23rd. ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association, 2017.

ROCHEFORT, W. E.; MIDDLEMAN, S. Rheology of Xanthan Gum: Salt, Temperature, and Strain Effects in Oscillatory and Steady Shear Experiments. **Journal of Rheology**, v. 31, n. 4, p. 337–369, maio 1987.

ROMERO-ZERÓN, L.; ESPINOSA, C. Advantageous supramolecular system through self-association of xanthan gum/cationic surfactant via  $\beta$ -cyclodextrin host-guest complexations for Enhanced Oil Recovery Applications. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 185, n. xxxx, p. 106644, 2020.

ROSEIRO, J. C. et al. Production of xanthan by in-flow cultures of *Xanthomonas campestris*.

**Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 709–713, mar. 1993.

RYE, A. J. et al. Growth Efficiency of *Xanthomonas campestris* in Continuous Culture.

**Microbiology**, v. 134, n. 4, p. 1055–1061, 1 abr. 1988.

SALAM, L. B. et al. Metagenomic insights into effects of spent engine oil perturbation on the microbial community composition and function in a tropical agricultural soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 8, p. 7139–7159, 16 mar. 2017.

SAMPAIO, I. C. F. et al. Composition of Xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* using produced water from a carbonated oil field through Raman spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 213, n. August, p. 112052, 2020.

SAMPAIO, I. C. F. et al. Surfactant/Alkali Stress Effect in Exopolysaccharide Production by *Xanthomonas* and *Enterobacter* Strains. In: [s.l: s.n.]. p. 695–717.

SARKAR, P. et al. Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation.

**Bioresource Technology**, v. 242, p. 15–27, 2017.

SARKER, S.; SULTANA, N.; AMINUZZAMAN, F. Biochemical Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* Isolated from Infected Cotton Plant and It's in vitro Sensitivity against Some Selected Chemicals. **Advances in Research**, v. 11, n. 4, p. 1–10, 2017.

SATO, T.; NORISUYE, T.; FUJITA, H. Double-Stranded Helix of Xanthan in Dilute Solution: Evidence from Light Scattering. **Polymer Journal**, v. 16, n. 4, p. 341–350, abr. 1984.

SERENO, N. M.; HILL, S. E.; MITCHELL, J. R. Impact of the extrusion process on xanthan gum behaviour. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 10, p. 1333–1342, jul. 2007.

SHAMS EL DIN, A. M.; WANG, L. Mechanism of corrosion inhibition by sodium molybdate. **Desalination**, v. 107, n. 1, p. 29–43, 1996.

SIKKEMA, J. et al. Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 9, p. 2986–92, maio 1992.

SIKKEMA, J. A. N.; JAN, A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **MICROBIOLOGICAL REVIEWS**, v. 59, n. 2, p. 201–222, 1995.

SILVA, M. F. et al. Production and characterization of xantham gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 1, p. 119–123, jan. 2009.

SILVEIRA, L. et al. Correlation between near-infrared Raman spectroscopy and the histopathological analysis of atherosclerosis in human coronary arteries. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 30, n. 4, p. 290–297, abr. 2002.

SOSA-FERNANDEZ, P. A. A. et al. Electrodialysis-based desalination and reuse of sea and brackish polymer-flooding produced water. **Desalination**, v. 447, p. 120–132, dez. 2018.

SOUZA, E. R. et al. **PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS ATRAVÉS DE ALCALINIZAÇÃO E ADIÇÃO DE SURFACTANTE COM REUTILIZAÇÃO DA ÁGUA PRODUZIDA E GLICERINA BRUTA** Brazil, 2020.

SUH, I. S.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W. D. Xanthan production in bubble column and air-lift reactors. **Biotechnology and bioengineering**, v. 39, n. 1, p. 85–94, 5 jan. 1992.

SZULC, A. et al. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. **Journal of Environmental Management**, v. 132, p. 121–128, 2014.

TAJOURI, T.; EL AFERNI, A.; GUETTARI, M. Effect of polymer conformation on polymer-surfactant interaction in salt-free water. **Colloid and Polymer Science**, v. 294, n. 7, p. 1097–1106, 12 jul. 2016.

- TAKAHASHI, T.; DOKE, N. Agglutination of *Xanthomonas campestris citri*, a Causal Pathogen of Citrus Canker, by Proteinaceous Components from Citrus Leaves. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 49, p. 600–609, 1983.
- TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; BURKERT, C. A. V. Impact of a carbon source and stress conditions on some properties of xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 167–172, jul. 2018.
- TSUJII, K. Donnan equilibria in microbial cell walls: A pH-homeostatic mechanism in alkaliphiles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 24, n. 3–4, p. 247–251, 2002.
- UMASHANKAR, H. et al. Influence of nutrients on cell growth and xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 6, p. 307–309, maio 1996.
- UNIVERSITY OF COPENHAGEN. **Xanthan**. Disponível em: <<http://www.models.life.ku.dk/~specarb/xanthan.html>>. Acesso em: 26 abr. 2020.
- URLACHER, B.; NOBLE, O. Xanthan gum. In: **Thickening and Gelling Agents for Food**. Boston, MA: Springer US, 1997. p. 284–311.
- URURAHY, A. F. P. et al. Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n. 4, p. 254–258, out. 1998.
- VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277–286, jan. 2017.
- VENNILA, T. et al. Synergism between sodium molybdate and binary inhibitor (BHI + Zn<sup>2+</sup>) on corrosion inhibition of mild steel in aqueous medium containing 60 ppm Cl<sup>-</sup> ion. **Materials Research Express**, v. 6, n. 11, p. 1165g6, 6 nov. 2019.
- VIÑAS, M. et al. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7008–7018, 2005.

VUYST, L. DE; LOO, J. VAN; VANDAMME, E. J. Two-step fermentation process for improved xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 263–273, 1987.

WANG, Z. et al. Activation of glycerol metabolism in *Xanthomonas campestris* by adaptive evolution to produce a high-transparency and low-viscosity xanthan gum from glycerol. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 390–397, 2016.

WANG, Z. et al. Characterization of xanthan gum produced from glycerol by a mutant strain *Xanthomonas campestris* CCTCC M2015714. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 521–526, fev. 2017.

WANG, Z. et al. Anticancer Activity of Polysaccharides Produced from Glycerol and Crude Glycerol by an Endophytic Fungus *Chaetomium globosum* CGMCC 6882 on Human Lung Cancer A549 Cells. **Biomolecules**, v. 8, n. 4, p. 171, 11 dez. 2018.

WINNIK, F. M.; REGISMOND, S. T. A.; GODDARD, E. D. Interactions of an Anionic Surfactant with a Fluorescent-Dye-Labeled Hydrophobically-Modified Cationic Cellulose Ether. **Langmuir**, v. 13, n. 1, p. 111–114, jan. 1997.

WYATT, N. B.; LIBERATORE, M. W. The effect of counterion size and valency on the increase in viscosity in polyelectrolyte solutions. **Soft Matter**, v. 6, n. 14, p. 3346–3352, 2010.

XU, J. et al. Enhanced biodegradation of crude oil in contaminated soil by inoculation of hydrocarbon-degraders. **Desalination and Water Treatment**, v. 52, n. 25–27, p. 5126–5135, 2014.

XU, R. et al. Screening, identification and statistic optimization of a novel exopolysaccharide producing *Lactobacillus paracasei* HCT. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 9, p. 783–795, 2010.

YANG, S. T.; LO, Y. M.; MIN, D. B. Xanthan gum fermentation by *Xanthomonas campestris*

immobilized in a novel centrifugal fibrous-bed bioreactor. **Biotechnology Progress**, v. 12, n. 5, p. 630–637, 1996.

YIN, Y. et al. Effects of rhamnolipid and Tween-80 on cellulase activities and metabolic functions of the bacterial community during chicken manure composting. **Bioresource Technology**, v. 288, p. 121507, set. 2019.

YUEN, S. N. et al. Raman and FTIR spectroscopic study of carboxymethylated non-starch polysaccharides. **Food Chemistry**, 2009.

ZHANG, R. et al. Influence of emulsifier type on gastrointestinal fate of oil-in-water emulsions containing anionic dietary fiber (pectin). **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 175–185, mar. 2015.

ZHAO, Y. et al. Study of Succinylated Food Proteins by Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 1815–1823, abr. 2004.

## 9. APÊNDICES

### 9.1 APÊNDICE I: COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DE MANUSCRITO

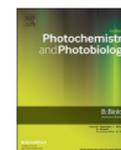
Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 213 (2020) 112052



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jphotobiol](http://www.elsevier.com/locate/jphotobiol)



#### Composition of Xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* using produced water from a carbonated oil field through Raman spectroscopy



Igor C.F. Sampaio<sup>a</sup>, Pedro J.L. Crueira<sup>a,b</sup>, Luiz G.P. Soares<sup>b,c</sup>, Jacson N. dos Santos<sup>a</sup>, Paulo F. de Almeida<sup>a,c</sup>, Antonio L.B. Pinheiro<sup>b,d,\*</sup>, Landulfo Silveira Jr<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Biotechnology and Ecology of Microorganisms, Institute of Health Science, Federal University of Bahia – UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon, S/N, Salvador, BA, CEP: 40110-100, Brazil

<sup>b</sup> Center of Biophotonics, School of Dentistry, Federal University of Bahia – UFBA, Av. Araújo Pinho, 62, Canela, Salvador, BA CEP: 40110-150, Brazil

<sup>c</sup> Department of Biointeraction, Institute of Health Science, Federal University of Bahia – UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon, S/N, Salvador, BA, CEP: 40110-100, Brazil

<sup>d</sup> National Institute of Basic Optics and Applied to Life Sciences, Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo – USP, Av. Trabalhador São-Carlense, 400, Parque Arnold Schmidt, São Carlos, SP, CEP: 13566-590, Brazil

<sup>e</sup> Center for Innovation, Technology and Education – CITE, Universidade Anhembi Morumbi – UAM, Estr. Dr. Altino Bondensan, 500, São José dos Campos, SP CEP: 12247-016, Brazil

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
EOR  
Produced water  
Oil, acetyl  
Sodium pyruvate  
Xanthan gum  
Raman spectroscopy

#### ABSTRACT

Produced water (PW) is a by-product generated throughout oil exploration. Geological formation and geographical location of the reservoir influence its physical, chemical and biological characteristics. Xanthan gum (XG), an exopolysaccharide (EPS) produced by *Xanthomonas campestris*, has been widely used in enhanced oil recovery (EOR) technology because of its high viscosity, pseudoplastic behavior, stability in function of salinity, temperature and alkaline conditions. The production of XG may be affected by the composition of the PW, where the acetyl and pyruvyl radicals may be present in the mannoses. The aim of this study was to evaluate the composition of XG produced by *X. campestris*, particularly the amount of Xanthan, acetyl and pyruvyl groups, in culture mediums containing distilled (DW) or produced (PW) water in different concentrations, by means of dispersive Raman spectroscopy (1064 nm). The spectra of XG showed peaks referred to the main constituents of the Xanthan (glucose, mannose and glucuronic acid). Spectral features assigned to pyruvyl were seen in all samples mainly at  $-1010\text{ cm}^{-1}$ , with higher intensity when using DW and 25% PW. PCA loadings showed that the peaks assigned to pyruvyl are consistent to presence of sodium pyruvate ( $-1040/-1050$  and  $-1432\text{ cm}^{-1}$ ) and were higher in the samples obtained in 25% PW. ANOVA GLM applied to Raman peaks of interest ( $-1010$  and  $-1090\text{ cm}^{-1}$ ) and to PCA scores (Score 1 to Score 3) showed that both were influenced by the type of water used in the culture medium, where the XG were strongly reduced in the groups PW compared to DW while the pyruvyl content increased proportionally with the concentration of PW. The results suggest that the composition of the water used in the bacteria's culture medium influenced the composition of XG, including the amount of Xanthan and particularly the pyruvyl content, and therefore needs to be considered when using this approach of injecting XG in oil fields as pyruvyl content affects viscosity.

#### 1. Introduction

There are several techniques to increase the recovery factor of mature oil fields. The most common strategy is water injection as part of a process known as secondary oil recovery and as well as in the enhanced oil recovery (EOR) [1,2]. Although this practice is widely disseminated, physical and chemical factors that characterize the reservoir (viscosity, adsorption, and preferential channels) interfere in the

recovery process [1,2]. A large increase in water production from oil extraction processes is observed as the reservoirs reach maturity [1,2].

Produced water (PW) is an undesirable by-product (wastewater) generated by oil exploration and production activities during primary and mainly after secondary processing, which is always present in oil extractions [3]. It is generated when large amounts of water contained in underground rocks are produced along with oil. It represents the largest volume of liquid effluent in oil activities [4]. When treating the

\* Corresponding author at: Center of Biophotonics, School of Dentistry, Federal University of Bahia – UFBA, Av. Araújo Pinho, 62, Canela, Salvador, BA CEP: 40110-150, Brazil.

E-mail address: [albp@ufba.br](mailto:albp@ufba.br) (A.L.B. Pinheiro).

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112052>

Received 22 June 2020; Received in revised form 16 August 2020; Accepted 5 October 2020

Available online 09 October 2020

1011-1344/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 9.2 APÊNDICE II: COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DE CAPÍTULO



[Functional Properties of Advanced Engineering Materials and Biomolecules](#) pp 695-717 | [Cite as](#)

## Surfactant/Alkali Stress Effect in Exopolysaccharide Production by *Xanthomonas* and *Enterobacter* Strains

Authors [Authors and affiliations](#)

Igor Carvalho Fontes Sampaio, Pedro Jorge Louro Crugeira, Joalene de Azevedo Santos Ferreira, Jamile de Almeida Santos, Jacson Nunes dos Santos, Elías Ramos-de-Souza, Antônio Luiz Barbosa Pinheiro, Josilene Borges Torres Lima Matos, Fabio Alexandre Chinalia, Paulo Fernando de Almeida

Chapter  
First Online: 18 May 2021

1  
Downloads

Part of the [Engineering Materials](#) book series (ENG.MAT.)

### Abstract

New innovative technologies are required today for lowering the production costs of highly demanded microbial exopolysaccharides (EPS). The physiological “stress” caused by the presence of alkaline and non-cationic surfactants (Triton X-100) in the media (alone or in combination) may significantly increase *Xanthomonas campestris* and *Enterobacter* sp. Production of EPS. A mineral media (MSM) was supplemented with sucrose and crude glycerin (GB) and prepared with produced water either diluted (PW) or dialyzed (DPW) for removing mineral salts. Under conditions of alkaline stress (pH 9.5), the microbial population of *X. campestris* showed an increase in EPS production of 16.7% ( $p < 0.01$ ). The addition of Triton X-100, however, increased the production and also the viscosity of the *X. campestris* EPS. On the other hand, this former substance was toxic to *Enterobacter* sp. in the lowest concentration tested (0.1%). The association of alkaline stress with Triton X-100 increased the production and quality of the EPS produced by *X. campestris*, with maximum values of 88.72% of production and 190.35% of viscosity in the medium prepared with DPW ( $P < 0.0001$ ). The technology developed “surfactant/alkali stress” is an innovative way of reducing production costs and increasing the quality of EPS xanthan gum.

### Keywords

Alkalinization Detergent Biopolymer By-products Recycling

## 9.3 APÊNDICE III: COMPROVANTE DE DEPÓSITO DE PATENTE I



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

**Número do Processo:** BR 10 2020 020572 2

SOUZA, E. R. ; CARVALHO, E. B. ; RODRIGUES, P. D. ; VASCONCELOS, A. C. ; QUINTELLA, C. M. A. L. T. M. H. ; CRUGEIRA, P. J. L. ; **SAMPAIO, I. C. F.** ; ALMEIDA, P. F. ; SANTOS, J. A. ; FERREIRA, J. A. S. ; SANTOS, J. N. ; MATOS, J. B. T. L. ; PINHEIRO, A. L. B. . MÉTODO DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA TERMOVISCOSIFICANTE COM REUTILIZAÇÃO DA ÁGUA PRODUZIDA E GLICERINA BRUTA, GOMA XANTANA TERMO-VISCOSIFICANTE, FORMULAÇÃO E PROCESSO DE RECUPERAÇÃO AVANÇADA DE PETRÓLEO. 2020, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10202002549, título: “MÉTODO DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA TERMOVISCOSIFICANTE COM REUTILIZAÇÃO DA ÁGUA PRODUZIDA E GLICERINA BRUTA, GOMA XANTANA TERMO-VISCOSIFICANTE, FORMULAÇÃO E PROCESSO DE RECUPERAÇÃO AVANÇADA DE PETRÓLEO”. Depósito: 14/12/2020. Instituição financiadora: Petrogal Brasil S/A.

**Resumo:** A presente invenção trata de um método de produção de goma xantana termoviscosificante com reutilização da água produzida e glicerina bruta, da goma xantana termo-viscosificante produzida, de formulação contendo a goma xantana e seu uso em processo de recuperação avançada de petróleo. Mais particularmente, refere o método de produção da goma xantana termo-viscosificante produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris* em meio

de cultura com a utilização de água produzida de campos de petróleo e glicerina bruta (GB), coproduto do biodiesel como fluido EOR. Refere ainda o processo para melhorar a recuperação de petróleo residual em reservatórios, com aplicação na área de recuperação avançada de petróleo (EOR), através da utilização de uma formulação polimérica composta por goma xantanatermo-viscosificante produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris* em meio de cultura com a utilização de água produzida de campos de petróleo e glicerina bruta (GB), coproduto do biodiesel como fluido EOR. A formulação polimérica reivindicada apresenta comportamento pseudoplástico de afinamento por cisalhamento e capacidade de aumentar a viscosidade em relação ao comportamento linear esperado na faixa de temperatura referida (comportamento termoviscosificante). Além disso apresenta a capacidade de manter a viscosidade constante em salinidade alta. A aplicação do processo proposto compete com o processo de injeção de polímeros comerciais comumente utilizados, tendo como principal vantagem ser um método de custo muito inferior e ambientalmente amigável, além de agregar valor a um coproduto da produção de biodiesel (GB) produzido em grandes volumes pelas indústrias deste ramo e dar novo uso a água de produção de campos de reservatório.

## 9.4 APÊNDICE IV: COMPROVANTE DE DEPÓSITO DE PATENTE II



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

**Número do Processo:** BR 10 2020 020572 2

SOUZA, E. R. ; CARVALHO, E. B. ; ALMEIDA, PAULO F. ; QUINTELLA, C. M. A. L. T. M. H. ; PINHEIRO, A. L. B. ; MATOS, J. B. T. L. ; SANTOS, J. N. ; SANTOS, J. A. ; SAMPAIO, I. C. F. ; RODRIGUES, P. D. ; CRUGEIRA, P. J. L. ; FERREIRA, J. A. S. .  
 PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS ATRAVÉS DE ALCALINIZAÇÃO E ADIÇÃO DE SURFACTANTE COM REUTILIZAÇÃO DA ÁGUA PRODUZIDA E GLICERINA BRUTA. 2020, Brasil.

"PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS ATRAVÉS DE ALCALINIZAÇÃO E ADIÇÃO DE SURFACTANTE COM REUTILIZAÇÃO DA ÁGUA PRODUZIDA E GLICERINA BRUTA“. Depósito: 07/10/2020. Instituição financiadora: Petrogal Brasil S/A.

**Resumo:** A presente invenção trata de um processo de produção de biopolímeros reutilizando resíduos industriais, através da utilização de uma solução alcalina e de um surfactante não catiônico. Mais particularmente a invenção refere-se ao processo de produção de polímeros de origem microbiana com adição de uma base, preferencialmente uma solução de NaOH, e com adição de um surfactante não catiônico como o Triton X-100, Tween 80 ou outros, ambos utilizados durante a produção do biopolímero em meio de cultura contendo água produzida e glicerina bruta. Mais especificamente a invenção trata de um processo produção de

biopolímeros onde ocorre estimulação microbiana através da adição de uma base e de um meio contendo o surfactante, água produzida da indústria de petróleo e glicerina bruta, em etapas específicas de forma a aumentar a produção da biomassa, aumentar a produção e a qualidade dos biopolímeros, além de fornecer opção de uso de forma sustentável de resíduos industriais e aumentar a viabilidade econômica do bioprocessamento de produção de biopolímeros.