



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS A PARTIR DE
GLICEROL RESIDUAL GERADO NA SÍNTESE DE BIODIESEL

RENATA AGUIRRE TRINDADE

PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT

Orientador

RIO GRANDE, RS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS A PARTIR DE
GLICEROL RESIDUAL GERADO NA SÍNTESE DE BIODIESEL

RENATA AGUIRRE TRINDADE

Dissertação apresentada
como parte dos requisitos
para obtenção do título de
Mestre em Engenharia e
Ciência de Alimentos

PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT

Orientador

RIO GRANDE, RS

2014

Dedico este trabalho à minha mãe...

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meu caminho;

A minha mãe, Ilza Trindade, obrigada por me ensinar qual caminho seguir, pelo apoio incondicional, pela confiança em mim depositada, por sempre se fazer presente mesmo distante;

Ao meu namorado, Marcelo Batista, obrigada por fazer parte da minha vida, por me incentivar e me apoiar, pelo amor, carinho e dedicação sempre, especialmente neste período;

Ao meu orientador, Carlos André, pela orientação e contribuição desde os meus primeiros passos na Universidade;

As professoras Fernanda Gautério, Susana Kalil e Janaína Burkert por aceitarem participar da defesa desta dissertação, enriquecendo este trabalho;

A Elisane, pela amizade e pela ajuda principalmente no início do trabalho, quando tudo é difícil, sempre com muita paciência e boa vontade;

Aos amigos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, pela ótima companhia e pelos momentos de descontração, em especial a Vanessa Ribeiro pelo auxílio ao longo do trabalho, a Daniela Nogueira por me ajudar sempre quando necessário;

As novas amigadas que fiz no mestrado e espero levar para vida toda, Nathalie Lopes, pelos bons momentos, e Franciela Spier, pela ótima companhia sempre, até mesmo nos fins de semana, por partilharem angustias, conquistas e descobertas;

Ao aluno de iniciação científica Adriel Munhoz, pela ajuda na parte experimental, pela dedicação e boa vontade;

Ao Laboratório de Controle Ambiental e ao Laboratório de Operações Unitárias, pelo auxílio nas análises reológicas e de DSC, em especial aos alunos Karolina Gibbon e Ricardo Scherer;

Ao CNPq, FAPERGS e CAPES, pelo apoio financeiro;

Enfim, a todos que de uma forma ou outra contribuíram para realização deste trabalho.

**óAinda que eu falasse a língua dos homens
E falasse a língua dos anjos
Sem amor eu nada seria...ô**

Luis de Camões

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

REVISAO DA LITERATURA

Tabela 1 - Propriedades e aplicações de alguns EPSs bacterianos.....	9
--	---

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

APROVEITAMENTO DO GLICEROL RESIDUAL NA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS

Tabela 1 - Composição dos meios de produção de EPSs.....	25
Tabela 2 - Contagem de células nos inóculos das diferentes bactérias.....	29
Tabela 3 - Biomassa máxima das bactérias <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> IBSBF 1230, <i>P. oleovorans</i> NRRL B-14683, <i>S. capsulata</i> NRRL B-4261 e <i>Z. mobilis</i> NRRL B-4286 para diferentes fontes de carbono*.....	31
Tabela 4 - Produtividade de EPSs para os diferentes micro-organismos cultivados nos meios contendo S, SGR e GR*.....	37

CAPÍTULO IV

CARACTERIZAÇÃO DA GOMA XANTANA PRODUZIDA POR *Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Tabela 1 - IE ₂₄ para goma xantana sintetizada com diferentes fontes de carbono e para goma arábica (comercial).....	50
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

REVISAO DA LITERATURA

Figura 1- Reação de transesterificação de triacilglicerol com álcool	6
Figura 2 - Estrutura química da xantana	11
Figura 3 - Estrutura química da levana	14

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

APROVEITAMENTO DO GLICEROL RESIDUAL NA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS

Figura 1 ã Ampola sendo rompida.....	22
Figura 2 - Preparo do inóculo	23
Figura 3 - Cultivo em frascos agitados	25
Figura 4 - Coloração de Gram das bactérias: (a) <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> IBSBF 1230, (b) <i>P. oleovorans</i> NRRL B-14683, (c) <i>S. capsulata</i> NRRL B-4261 e (d) <i>Z. mobilis</i> NRRL B-4286.....	27
Figura 5 - Crescimento celular das bactérias (χ) <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> IBSBF 1230, (Ω) <i>P. oleovorans</i> NRRL B-14683, (κ) <i>S. capsulata</i> NRRL B-4261 e ($\ddot{Y}$) <i>Z. mobilis</i> NRRL B-4286 em função do tempo.	29
Figura 6 ã Biomassa (linha contínua) e pH (linha tracejada) das bactérias <i>X. campestris</i> IBSBF 1230 (a), <i>P. oleovorans</i> NRRL B-14683 (b), <i>S. capsulata</i> NRRL B-4261 (c), <i>Z. mobilis</i> NRRL B-4286 (d) em meio contendo (χ) sacarose, (Ω) sacarose e glicerol residual (proporção de 1:1) e (κ) glicerol residual.....	30

CARÍTULO IV

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA GOMA XANTANA PRODUZIDA POR *Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Figura 1 - Viscosidade da xantana (solução aquosa 5% m/v) produzida por <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> IBSBF 1230. (χ) S, (Ω) SGR e (κ) GR.	49
Figura 2 ã Resultados DSC para xantanas produzidas utilizando (-) S, (-) SGR e (-) GR como fontes de carbono	51

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
CAPÍTULO I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 OBJETIVOS.....	4
1.1.1 Objetivo geral.....	4
1.1.2 Objetivos específicos	4
CAPÍTULO II:.....	5
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 Biodiesel.....	6
2.2 Glicerol.....	7
2.3 Exopolissacarídeos (EPSs).....	7
2.4 EPSs Produzidos por <i>Xanthomonas campestris</i>	10
2.5 EPSs Produzidos por <i>Sphingomonas capsulata</i>	12
2.6 EPSs Produzidos por <i>Pseudomonas oleovorans</i>	13
2.7 EPSs Produzidos por <i>Zymomonas mobilis</i>	13
2.8 Propriedades Reológicas dos EPSs Bacterianos.....	14
2.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	16
CAPÍTULO III:	17
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	17
Artigo I: APROVEITAMENTO DO GLICEROL RESIDUAL NA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS.....	18
RESUMO	19
1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1 Material	21
2.1.1 Micro-organismos.....	21
2.1.2 Glicerol Residual	21
2.2 Métodos.....	21

2.2.1	Re-hidratação das culturas liofilizadas	21
2.2.2	Manutenção das culturas microbianas	22
2.2.3	Coloração de Gram	23
2.2.4	Preparo do inóculo e contagem das células viáveis	23
2.2.5	Cultivos em frascos agitados	24
2.3	Métodos analíticos	26
2.3.1	Determinação do pH	26
2.3.2	Determinação da biomassa	26
2.3.3	Determinação da concentração de EPSs e produtividade	26
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1	Coloração de Gram	27
3.2	Avaliação dos inóculos	28
3.2.1	Curvas do crescimento celular	28
3.2.2	Contagem de células viáveis	29
3.2.3	Produção de biomassa utilizando diferentes fontes de carbono	30
3.3	Produção de EPSs utilizando diferentes fontes de carbono	33
4.	CONCLUSÕES	38
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
Artigo II: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA GOMA XANTANA PRODUZIDA POR <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>mangiferaeindicae</i> IBSBF 1230 UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO		42
RESUMO		43
1.	INTRODUÇÃO	44
2.	MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1	Material	45
2.1.1	Micro-organismo	45
2.1.2	Glicerol residual	45
2.2	Métodos	45
2.2.1	Re-hidratação da bactéria <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> IBSBF 1230	45
2.2.2	Manutenção da Cultura	46
2.2.3	Preparo do Inóculo	46
2.2.4	Cultivos em frascos agitados	46
2.2.5	Recuperação da xantana	47

2.2.6	Solubilização das amostras.....	47
2.2.7	Determinação da viscosidade	47
2.2.8	Índice de emulsificação.....	47
2.2.9	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	48
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1	Determinação da viscosidade	48
3.2	Índice de Emulsificação (IE ₂₄)	50
3.3	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	51
4.	CONCLUSÃO.....	52
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
	CAPÍTULO IV:	55
	CONCLUSÕES GERAIS	55
4.	CONCLUSÕES GERAIS	56
	CAPÍTULO V:	57
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	57
5	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	58
	CAPÍTULO VI:	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
	APÊNDICE	68

CAPÍTULO I
RESUMO GERAL
GENERAL ABSTRACT
INTRODUÇÃO GERAL

RESUMO

A busca por combustíveis alternativos, tais como os biocombustíveis, torna-se necessária devido à crescente demanda por combustíveis em todos os setores da atividade humana, sendo que quase toda energia consumida no mundo provém do petróleo, uma fonte limitada, que emite grande quantidade de gases poluentes. Devido à grande diversidade de culturas oleoginosas no país, o Brasil demonstra potencial para substituição do diesel pelo biodiesel. No processo de obtenção deste, o óleo vegetal sofre uma transesterificação, sob a ação de um catalisador básico e na presença de um álcool, formando três moléculas de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, que constituem o biodiesel em sua essência, liberando uma molécula de glicerol, que é o coproduto mais abundante desta reação. Sendo assim, a utilização do glicerol residual é uma ótima alternativa para agregar valor à cadeia produtiva do biodiesel, minimizar os danos de um possível descarte inadequado, além de diminuir os custos do processo. Com este intuito, este trabalho propõe o uso do glicerol residual como fonte de carbono para produção de exopolissacarídeos (EPSs). Para tal, foram utilizadas linhagens de bactérias mencionadas na literatura como produtoras de EPSs de importância comercial, sendo elas: *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14683, *Sphingomonas capsulata* NRRL B-4261 e *Zymomonas mobilis* NRRL B-4286. Os cultivos foram realizados em meio apropriado para cada micro-organismo, e como fontes de carbono foram testadas a sacarose, o glicerol residual e uma mistura de ambos na proporção de 1:1 m/m. Os meios foram inoculados com suspensão da bactéria em estudo, sendo avaliados parâmetros relativos ao crescimento celular e à produção de EPSs. Para *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, foram determinadas algumas propriedades reológicas e térmicas dos EPSs produzidos com as diferentes fontes de carbono, bem como o índice de emulsificação com diferentes óleos vegetais. *X. campestris* apresentou uma concentração de EPSs em torno de 4 g.L⁻¹ em todos os meios estudados, comportamento similar ao da bactéria *P. oleovorans*, diferindo apenas no meio contendo sacarose (0,8 g.L⁻¹). *S. capsulata* apresentou uma maior concentração de EPSs em meios contendo sacarose e a mistura de sacarose com glicerol residual, em torno de 3,4 g.L⁻¹, e em meio contendo glicerol residual este valor caiu para 1,7 g.L⁻¹. Já *Z. mobilis* apresentou um melhor resultado em meio contendo sacarose e glicerol residual, atingindo 1,3 g.L⁻¹, sendo que em meio contendo somente sacarose e glicerol residual estes valores foram inferiores alcançando 0,2 e 0,7 g.L⁻¹, respectivamente. Quase todas as bactérias atingiram a fase estacionária em 24 h de cultivo e o pH permaneceu praticamente constante, sendo verificada uma queda mais acentuada somente para *Z. mobilis*. O comportamento reológico foi similar para as xantanas produzidas nos diferentes meios, entretanto a viscosidade inicial foi maior com o meio a sacarose (637 cP), seguido da mistura de sacarose com glicerol residual (279 cP) e glicerol residual (60 cP). O IE₂₄ foi superior quando utilizado o óleo de milho, atingindo valores de 97, 72 e 64 % em sacarose, mistura de sacarose com glicerol e glicerol residual, respectivamente. Desta forma, pode-se afirmar que a mudança na fonte de carbono afeta estas propriedades.

Palavras-chaves: Glicerol, biopolímeros, EPSs microbianos, *Xanthomonas campestris*.

ABSTRACT

The search for alternative fuels, such as biofuels, becomes necessary due to increased demand for fuel in all sectors of human activity, and almost all energy consumed in the world comes from petroleum, a limited supply, which emit large quantities of greenhouse gases. Due to the great diversity of oilseeds crops, Brazil has demonstrated potential for substitution of diesel by biodiesel. The oil is submitted to a transesterification reaction with the action of an alkaline catalyst and in the presence of an alcohol, forming three molecules of methyl or ethyl esters of fatty acids, which constitute the biodiesel, generating a molecule of glycerol, which is the most abundant byproduct of this reaction. Thus, the use of raw glycerol is a great alternative to add value to the biodiesel production chain, minimizing the damage of a possible improper disposal, and reducing process costs. For this purpose, this work proposes the use of raw glycerol as a carbon source for the production of exopolysaccharides (EPSs). Bacterial strains used were mentioned in the literature as producers of EPSs with commercial importance: *Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14683, *Sphingomonas capsulata* NRRL B-4261 and *Zymomonas mobilis* NRRL B- 4286. The cultivation was carried out for each micro-organism using an appropriated medium and, as carbon sources, sucrose, raw glycerol and a mixture of sucrose with raw glycerol (1:1 w/w) were tested. Some parameters related to cellular growth and EPSs production were evaluated. For *X. campestris*, some thermal and rheological properties as well as the emulsification index, were determined. *X. campestris* showed a concentration of EPSs around 4 g.L⁻¹ in all studied media, similar to *P. oleovorans* behavior, differing only in medium composed of sucrose (0.8 g.L⁻¹). *S. capsulata* showed a higher concentration of EPSs in the media composed by sucrose only and a mixture of both components, reaching around 3.4 g.L⁻¹, and with raw glycerol this value changed to 1.7 g.L⁻¹. *Z. mobilis* showed better results with a mixture of sucrose with raw glycerol, reaching 1.3 g.L⁻¹, and with the use of raw glycerol and sucrose only, these values dropped to 0.2 and 0.7 g L⁻¹, respectively. Almost all bacteria reached the stationary phase at 24 h of cultivation and pH remained almost constant, being checked a sharper decline only *Z. mobilis*. The rheological behavior was similar to xanthan produced in different ways, however, the initial viscosity was higher with sucrose medium (637 cP), followed by a mixture of sucrose with raw glycerol (279 cP) and raw glycerol (60 cP). The IE₂₄ was superior when used corn oil, reaching values of 97, 72 and 64% in sucrose, a mixture of sucrose with raw glycerol and raw glycerol, respectively. Thus, it can be stated that the change in carbon source affects these properties.

Keywords: Glycerol, biopolymers, microbial gums, *Xanthomonas campestris*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A maior parte de toda energia consumida no mundo provém do petróleo, uma fonte não renovável, com previsão de esgotamento em um futuro próximo, sendo que a crescente demanda por combustíveis em todos os setores da vida humana, seja no transporte, na geração de energia, nos processos industriais ou no consumo residencial, vem aumentando as emissões de dióxido de carbono (CO₂), o que altera o clima global, sendo então necessária a busca por combustíveis alternativos, ambientalmente aceitáveis, tecnicamente viáveis, economicamente competitivos, e prontamente disponíveis (FERRARI, OLIVERIA; SCABIO, 2005; MOTA, SILVA; GONÇALVES, 2009; TALEBIAN-KIAKALAIEH, AMIN; MAZAHARI, 2013). Neste contexto, a utilização de biocombustíveis constitui uma alternativa para minimizar estes problemas, como por exemplo, a utilização do biodiesel (MOTA, SILVA; GONÇALVES, 2009).

O biodiesel é produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais (EBB, 2013). São ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos a partir da reação de transesterificação de triacilgliceróis, presentes nesses óleos ou gorduras, com álcool em presença de catalisador, gerando como coproduto o glicerol (SANTOS; PINTO, 2009; BOUÇAS, 2012). O glicerol residual resultante da síntese do biodiesel usualmente apresenta 55-90% de glicerol, sendo o restante constituído por impurezas tais como triacilgliceróis não convertidos, metanol ou etanol não convertido, biodiesel, sabões e outros (SILVA, MACK; CONTIERO, 2009; AMARAL et al., 2009).

O biodiesel tem demonstrado benefícios ambientais significativos, no que diz respeito à diminuição de impactos do aquecimento global, maior independência energética e também um impacto positivo na agricultura (EBB, 2013). Pois, devido à sua origem vegetal, contribui para o ciclo do carbono na atmosfera e por isto é considerado renovável, já que o CO₂ emitido durante a queima é reabsorvido pelas plantas que irão produzi-lo, diminuindo assim as emissões de CO₂ no balanço total, causando um impacto menor no aquecimento do planeta (MOTA, SILVA; GONÇALVES, 2009). De acordo com *European Biodiesel Board* (2013) para cada 1 Kg de biodiesel utilizado há redução de aproximadamente 3 Kg de CO₂ na atmosfera.

Em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória de 2% (v/v) de biodiesel ao diesel, em qualquer parte do território nacional, mas com o perceptível

crescimento do mercado brasileiro, em janeiro de 2010, esse percentual foi ampliado até atingir 5% (v/v), antecipando em três anos a meta estabelecida pela lei (PNPB, 2012).

Segundo o Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel (PNPB) (2012), a produção desse biocombustível foi de 69 milhões de litros em 2006 para 2,7 bilhões de litros em 2011. De acordo com o Boletim Mensal de Biodiesel da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), a produção de biodiesel das usinas brasileiras alcançou um recorde em outubro de 2013, credenciando o Brasil como um dos maiores mercados mundiais de biodiesel, juntamente com a Alemanha e os Estados Unidos, que produzem e utilizam este combustível renovável há muito mais tempo.

Estas ações colocaram o país na vanguarda do uso de combustíveis alternativos no planeta, e também reforça a necessidade de encontrar utilizações comerciais para os coprodutos da produção do biodiesel (MOTA, SILVA; GONÇALVES, 2009). Cerca de 10% da matéria prima é transformada em glicerol, sendo este o principal coproduto dessa reação (ABAD; TURON, 2012). Como o mercado não absorve o excedente do glicerol gerado na produção de biodiesel, e já que este não pode ser descartado no ambiente, o excesso pode vir a ser um problema ambiental (SILVEIRA, 2007).

Por outro lado, um alto potencial de aplicação nos mais diversos segmentos industriais tem surgido para exopolissacarídeos (EPSs). A produção desses, em condições controladas de cultivo, garante um material de qualidade e fornecimento constante não influenciado por variações climáticas. A esse grupo de polissacarídeos solúveis em água, de origem vegetal, animal ou microbiana, foi dada a designação de biopolímeros industriais. São amplamente utilizados nas indústrias de petróleo, mineração, têxtil, termoquímica, tintas, papel, cosméticos, alimentos, farmacêutica e de produtos agropecuários, como formadores de gel, espessantes e agentes de suspensão (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009; DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007).

Para produção desses EPSs são comumente utilizadas como fonte de carbono carboidratos como glicose e sacarose (BAJAJ et al., 2006; WEST; STROHFUS, 1998), mas em função do custo destes, é imprescindível o estudo de fontes alternativas. Neste contexto, torna-se importante investigar aspectos da produção de EPSs bacterianos em meios à base de glicerol residual, pois são encontrados na literatura poucos trabalhos que abordam o uso deste coproduto como fonte de carbono, aplicados apenas para alguns EPSs. Reis et al. (2010) estudaram a produção da goma xantana por duas cepas da bactéria *Xanthomonas sp.* (C1 e C9) utilizando a sacarose, o glicerol puro e uma mistura de ambos em uma proporção de 1:1, sendo os melhores resultados encontrados ao utilizar a mistura do glicerol puro e da sacarose

para ambas as cepas, não diferindo estatisticamente ($p>0,05$) de quando a sacarose foi a fonte de carbono utilizada. Freitas et al. (2010) compararam a produção de um EPS pela bactéria *P. oleovorans* NRRL B-14682 utilizando glicerol puro e glicerol residual como fonte de carbono, encontrando melhores resultados quando o glicerol residual foi a fonte de carbono utilizada.

Sendo assim, o uso do glicerol residual como fonte de carbono para produção de EPSs pode ser uma boa alternativa. Visa o aproveitamento do excedente de glicerol, um coproduto de baixo custo e grande disponibilidade, tornando o processo mais rentável, de forma a agregar valor a este coproduto, reduzir custos de produção, minimizar problemas ambientais e contribuir para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do biodiesel.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi utilizar o glicerol residual gerado no processo de produção de biodiesel para o cultivo de diferentes bactérias (*Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, *Pseudomonas oleovarans* NRRL B- 14683, *Sphingomonas capsulata* NRRL B-4261 e *Zymomonas mobilis* NRRL B- 4286), visando produzir EPSs.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento celular das diferentes bactérias utilizando como fonte de carbono a sacarose (S), o glicerol residual (GR) e uma mistura de ambos na proporção de 1/1 (m/m) (SGR);
- Comparar a produção de diferentes EPSs bacterianos utilizando como fonte de carbono S, GR e SGR, considerando a concentração dos EPSs e a produtividade;
- Caracterizar os EPSs produzidos pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 com as diferentes fontes de carbono, quanto à viscosidade, propriedade térmicas, bem como o índice de emulsificação na presença de diferentes óleos vegetais comerciais.

CAPÍTULO II:
REVISÃO DA LITERATURA

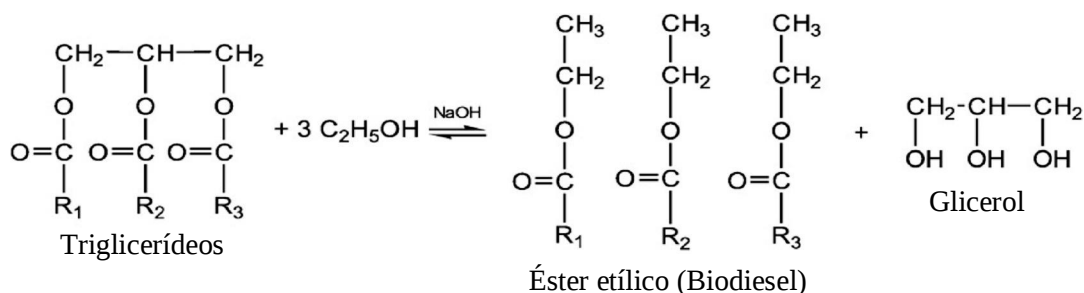
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biodiesel

A Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, define o biodiesel como um combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil (PNPB, 2012).

O biodiesel é produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais (EBB, 2013). São ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos a partir da reação de transesterificação de triacilgliceróis, presentes nesses óleos ou gorduras, com álcool em presença de catalisador, gerando como coproduto o glicerol (SANTOS; PINTO, 2009; BOUÇAS, 2012), conforme ilustrado na figura 1.

Figura 1- Reação de transesterificação de triacilglicerol com álcool



Fonte: SILVA, MACK; CONTIERO (2009), modificado.

Segundo o PNPB (2012), em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória de 2% (v/v) de biodiesel ao diesel, em qualquer parte do território nacional, sendo esse percentual ampliado para 5% (v/v) em janeiro de 2010, antecipando em três anos a meta estabelecida pela lei, devido ao rápido crescimento do mercado brasileiro.

O biodiesel pode ser utilizado puro ou misturado ao óleo diesel. Sendo assim, passou-se a adotar mundialmente uma nomenclatura apropriada para identificar a concentração do biodiesel na mistura. É o biodiesel BXX, onde XX é a percentagem em volume do biodiesel na mistura. Por exemplo, o B2, B5, B20 e B100 são combustíveis com uma concentração de 2%, 5%, 20% e 100% de biodiesel, respectivamente (RAMOS et al., 2000).

O Brasil demonstra grande potencial para utilização desta nova alternativa energética no que se refere à substituição do diesel a partir deste biocombustível, devido à grande diversidade e a alta produtividade das culturas oleaginosas no país. Existem dezenas de espécies vegetais que podem ser utilizadas para produção do biodiesel. Dentre elas, a soja, o dendê, a mamona, o coco e o girassol são as principais opções. No entanto, todos os óleos vegetais apresentam estruturas moleculares levemente diferentes entre si, o que confere características únicas quanto às suas propriedades físico-químicas. São estas propriedades que determinam o comportamento dos óleos quando se tenta queimá-los como diesel mineral (FERRÉS, 2010).

2.2 Glicerol

O glicerol puro é um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico (RAMOS, 2011), amplamente utilizado na indústria de cosméticos, alimentos, farmacêutica, têxtil, entre outras, também utilizado como matéria-prima para produção de produtos químicos (SILVA, MACK; CONTIERO, 2009).

O glicerol residual resultante da síntese do biodiesel usualmente apresenta 55-90% de glicerol (SILVA, MACK; CONTIERO, 2009). O rápido crescimento na produção do biodiesel e a obrigatoriedade de adição ao diesel já resultam na acumulação de grandes quantidades de glicerol residual (CHATZIFRAGKOU et al., 2011), que possui baixo valor agregado (RAMOS, 2011), pois contem impurezas tais como triacilgliceróis não convertidos, metanol ou etanol não convertido, biodiesel, sabões e outros (AMARAL et al., 2009). Em outras palavras, para ser usado em indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos, deve passar por um processo de purificação, o qual não é viável, pois é um processo caro. Sendo assim, a utilização deste, na forma residual, sem tratamentos, constitui uma ótima alternativa, pois irá agregar valor a este coproduto, além de diminuir os custos do processo, como no caso da utilização deste como fonte de carbono na produção de EPSs (FREITAS et al., 2010).

2.3 Exopolissacarídeos (EPSs)

Há na natureza plantas e micro-organismos que secretam polímeros, denominados exopolissacarídeos (EPSs), os quais podem ser classificados em homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos. Os homopolissacarídeos são, geralmente, glicanas neutras, e os

heteropolissacarídeos são, em sua grande maioria, polianiônicos, devido à presença de ácido urônico (SELVERIO; PENNA, 2010). Homopolissacarídeos são constituídos por um único tipo de monossacarídeo, como dextrana ou levana. Heteropolissacarídeos são constituídos por vários tipos de monossacarídeos, como xantana ou gelana, que compõem a maioria dos EPSs bacterianos (DONOT et al., 2012).

Os EPSs microbianos são uma classe de polímeros solúveis em água. Devido à grande diversidade de suas propriedades reológicas e estruturais, possuem diversas aplicações industriais, podendo ser usados como agentes espessantes, estabilizantes, emulsificantes, texturizantes e gelificantes (BAJAJ et al., 2006; CANUTO, 2006).

Podem ser produzidos pelo cultivo em meio líquido na presença de micro-organismos, contendo fonte de carbono e sais minerais, ou por via enzimática, com enzimas purificadas, na ausência de micro-organismos (MOREIRA et al., 2003).

A produção de polissacarídeos pode ser induzida, como parte de uma resposta ao estresse, ou resposta a pressões ambientais, incluindo temperatura, pressão e intensidade da luz, sendo sua produção geralmente favorecida por excesso da fonte de carbono, concomitante com limitação de outro nutriente (FREITAS et al., 2010; DONOT et al., 2012).

Produzir EPSs a partir de micro-organismos é vantajoso, pois os produzidos a partir de microalgas necessitam de energia solar e aqueles produzidos a partir de plantas levam de 3-6 meses, sendo que os produzidos a partir de micro-organismos necessitam de apenas alguns dias. Além disso, os EPSs produzidos por micro-organismos são naturalmente exudados no meio extracelular, o que facilita sua recuperação (FREITAS, ALVES; REIS, 2011).

Os principais fatores limitantes da produção de EPSs por micro-organismos estão ligados aos custos de produção, principalmente em relação ao custo do substrato e do processamento. Uma alternativa para a redução dos custos de produção pode ser o uso de substratos mais baratos, melhora do rendimento do produto por meio da otimização das condições de cultivo e otimização do processamento. No entanto, o maior potencial dos EPSs bacterianos está relacionado com suas propriedades físicas únicas, sendo utilizados em cosméticos, produtos farmacêuticos e também na biomedicina, em que os polímeros tradicionais não atendem o necessário grau de pureza ou alguma propriedade específica funcional (FREITAS, ALVES; REIS, 2011). Na tabela 2 encontram-se alguns EPSs bacterianos, bem como suas propriedades e aplicações.

Tabela 1 - Propriedades e aplicações de alguns EPSs bacterianos

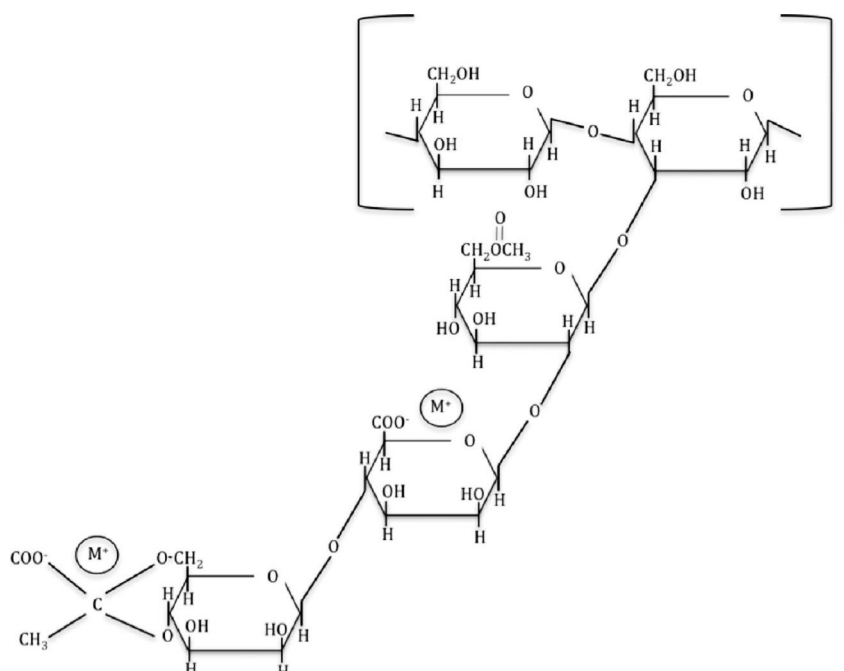
Micro-organismo	EPSs	Componentes	Fontes de carbono utilizadas	Massa molecular	Propriedades	Aplicação	Referências
<i>Xanthomonas campestris</i>	Xantana	- Glicose, manose e ácido glicurônico (2:2:1)	- sacarose - caldo de cana de açúcar - soro de queijo	$(2,0 - 5,0) \times 10^6$	- viscosidade elevada mesmo em baixas concentrações - estabilidade em ampla faixa de concentrações salinas (150 g/L de NaCl) - elevadas temperaturas (até 90° C) e diferentes níveis de pH (2-11)	- alimentos - indústria de petróleo - farmacêutica - cosméticos - agricultura	FARIA et al. (2011) FREITAS, ALVES; REIS (2011) MESOMO et al. (2009) SILVA et al. (2009) RAMOS (2011) ROTTAVA et al. (2009)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Gelana	- Ácido glicurônico, glicose e ramnose (1:3:1)	- glicose - melaço - galactose - frutose	$5,0 \times 10^5$	- capacidade de gelificação - boa estabilidade ao longo de um intervalo de pH de 2-10	- alimentos - alimentos para animais - farmacêutica - substituinte de ágar	BAJAJ et al. (2006) BANIK, SANTHIAGU; HUPADHYAY (2007) FREITAS, ALVES; REIS (2011) WEST; STROHFUS (1998)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Levana	- Frutose ligada na posição • (2,6) com ramificação • (2,1) a cada nove resíduos	- glicose e frutose - caldo de cana de açúcar - sacarose	$3,0 \times 10^6$	- baixa viscosidade - alta solubilidade em água - atividade anti tumoral e inflamatória - capacidade de formar filme	- alimentos (prebióticos) - medicina - cosméticos	ERNANDES; CRUZ (2011) FREITAS, ALVES; REIS (2011) LEE; HUANG (2000) MEIRELLES (2010) PADILHA (2003)

2.4 EPSs Produzidos por *Xanthomonas campestris*

A bactéria *Xanthomonas* foi isolada por Vers, em 1940 (MESOMO, 2007), pertence à família das *Pseudomonaceae*, é Gram-negativa, possuindo formato de bastonetes com $0,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$ de largura por $0,7 \pm 1,8 \mu\text{m}$ de comprimento, são móveis por flagelo único, com comprimento de 1,7-3 μm . Suas colônias são geralmente amarelas, lisas e viscosas. É catalase positiva e oxidase negativa, estritamente aeróbia e quimiorganotrófica, sendo capaz de utilizar como fonte de carbono uma variedade de carboidratos, sais e ácidos orgânicos (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

A goma xantana é produzida pela bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* quando infecta diversas espécies de crucíferas, causando a morte destas plantas (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009). Possui alta massa molecular, sendo normalmente composta de um heptassacarídeo constituído de glicose, manose e ácido glicurônico, na relação de 2:2:1 (representada na figura 2). *Xanthomonas campestris* é facilmente cultivada em laboratório, por ser aeróbica e microaerófila, com temperatura ótima de crescimento entre 25-30°C. Possui crescimento rápido, produzindo turbidez no meio com 2-3 dias de cultivo (DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007), e tem um pH ótimo entre 6,0 e 8,0 (DONOT et al., 2012). Muitas bactérias produtoras de EPSs também são capazes de acumular quantidades variáveis de produtos intracelulares (por exemplo, glicogênio ou polihidroxialcanoatos), reduzindo assim o potencial para a produção de EPSs. Porém, *Xanthomonas* sp. é excepcional na produção da xantana em quantidades significativas, não produzindo outros polímeros, assim pode-se alcançar conversões muito elevadas em EPSs (FREITAS, ALVES; REIS, 2011).

A goma xantana ocupa um lugar de destaque por suas propriedades reológicas diferentes das outras gomas microbianas, tais como um elevado comportamento pseudoplástico, viscosidade elevada mesmo em baixas concentrações, solubilidade e estabilidade em soluções ácidas e alcalinas, resistência à degradação em elevadas temperaturas e em diferentes níveis de pH (FARIA et al., 2011). Sendo assim, sua aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica e petroquímica é de extrema importância (MESOMO, 2007).

Figura 2 - Estrutura química da xantana

Fonte: DONOT et al. (2012)

Pan, Moreira; Vendruscolo (2000) utilizaram a bactéria *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 6 para avaliar o efeito da concentração inicial do inóculo sobre a produção e a qualidade do biopolímero, sendo que testaram concentrações de inóculo de $2,6 \cdot 10^8$ a $2,6 \cdot 10^{10}$ UFC.mL⁻¹. Verificaram que, ao utilizarem $2,6 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹, a concentração da goma foi de 3,4 g.L⁻¹, sendo que a partir de $2,6 \cdot 10^9$ UFC.mL⁻¹ a concentração da goma xantana alcançou 4,2 g.L⁻¹, apresentando também uma maior viscosidade, não diferindo significativamente de concentrações mais elevadas de inóculo.

Mesomo et al. (2009) utilizaram a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 para produção da goma xantana, em biorreator de 2,5 L, utilizando como fonte de carbono o soro de queijo. Foram estudadas as variáveis agitação (101 ã 693 rpm) e aeração (0 ã 2,9 vvm), sendo os ensaios realizados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 h. A maior produção da goma xantana foi de 35,3 g.L⁻¹, encontrada com agitação de 390 rpm e aeração 1,5 vvm. Estudaram também o efeito do cloreto de cálcio, cloreto de fósforo e cloreto de potássio na viscosidade, observando que na temperatura de 25°C , 1 g.L⁻¹ de cloreto de cálcio e uma concentração de 46,8 g.L⁻¹ da goma obtiveram uma maior viscosidade aparente, sendo esta de 1704,53 mPa.s.

Druzian; Pagliarini (2007) estudaram a produção da goma xantana pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv *maniothis*, utilizando sacarose como fonte de carbono padrão e, como fonte alternativa, o resíduo de maçã Fuji. O melhor resultado encontrado foi utilizando o resíduo de maçã, apresentando um rendimento de 45 g.L⁻¹ com 70% de resíduo, ou seja, quase 10 vezes maior do que os valores obtidos com 15% de sacarose (6 g.L⁻¹).

Reis et al. (2010) avaliaram a capacidade das bactérias *Xanthomonas* sp C1 e C9 produzirem um biopolímero em meio contendo sacarose, glicerol proveniente do biodiesel e uma mistura de ambos (proporção 1:1). Para ambas a maior concentração de goma foi encontrada nos meios contendo mistura da sacarose com o glicerol e somente sacarose, não diferindo significativamente entre si, sendo em torno de 0,30-0,36 g.L⁻¹. Já para o meio composto somente glicerol a concentração de goma foi de 0,157 e 0,186 g.L⁻¹ para C1 e C9, respectivamente.

2.5 EPSs Produzidos por *Sphingomonas capsulata*

O gênero *Sphingomonas* foi classificado em 1983 por Yabuuchi, sendo constituído por bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, não possuem flagelos, sendo que algumas espécies exibem mobilidade em meio semi-sólido. Possuem formato de bastonetes ou cocobacilos com diâmetro de 0,5 µm, podendo ser retos ou curvos. São catalase e oxidase positivas, sendo quimiorganotróficas, não necessitando de fatores especializados para seu crescimento. Produzem ácidos por oxidação de carboidratos, mas não por fermentação, e suas colônias quando expostas vários dias à temperatura ambiente possuem coloração amarela (BERWANGER, 2005).

Bactérias do gênero *Sphingomonas* produzem biopolímeros como gelana, welana, ramsana e diutana. Estes são gelificantes, possuem alta viscosidade e melhor estabilidade térmica do que outras gomas, despertando interesse das indústrias de alimentos, farmacêutica e petroquímica (BERWANGER et al., 2006)

Goma gelana é um polissacarídeo aniônico linear com elevada massa molecular, produzido pela bactéria *S. paucimobilis*, possui a estrutura de um tetrassacarídeo, composto por 60% de glicose, ligadas em 1,3 por resíduos do ácido glicurônico (20%) e em 1,4 por resíduos de ramnose (20%) (XIAO et al., 2011; WEST; STROHFUS, 1998), tendo uma vasta aplicação em alimentos, na indústria farmacêutica e outras, devido à sua alta viscosidade, como agente espessante, estabilizador, emulsionante, de suspensão e de gelificação, e também

como um substituto de ágar nos meios de cultura microbianos. Possui boa estabilidade ao longo de um intervalo de pH de 2 a 10 (BAJAJ et al., 2006).

Berwanger et al. (2006) avaliaram a produção de um biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666, utilizando como fonte de carbono o melaço bruto e pré tratado e resíduos de proteína texturizada de soja (PTS), testando diferentes concentrações (2,66; 4; 6 e 8%), e cujas condições de cultivo foram $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 208 rpm e 72 h. Obtiveram melhor produtividade quando usado o melaço pré-tratado 8% ($0,290 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), seguido do extrato aquoso de resíduo de PTS 6% ($0,240 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e melaço bruto 8% ($0,190 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

2.6 EPSs Produzidos por *Pseudomonas oleovorans*

O gênero *Pseudomonas* pertence à família *Pseudomonadaceae*. *Pseudomonas oleovorans* é uma bactéria Gram-negativa, possui formato de bastonetes isolados ou em cadeia curta, é móvel, possuindo um ou mais flagelos, sendo aeróbia facultativa, sendo que em alguns casos cresce anaerobicamente (LIMA et al., 2010).

Hiliou et al. (2009) avaliaram a produção de um novo exopolissacarídeo utilizando como fonte de carbono 25 g.L^{-1} de glicerol e como fonte de nitrogênio $3,3 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ em biorreator de 10 L, pH 6,75-6,85 e 0,125 vvm de aeração, sendo possível a obtenção de $13,3 \text{ g.L}^{-1}$ de EPS em 7 dias de cultivo, a partir da linhagem de *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682.

Freitas et al. (2010) estudaram a influência da temperatura e pH na produção de um exopolissacarídeo por *Pseudomonas oleovorans* NRRL B- 14682 em biorreator utilizando como fonte de carbono o glicerol puro e glicerol residual. Uma maior produção de EPSs foi obtida na temperatura de 30°C e pH de 6,8 em 72 h, quando utilizado glicerol residual como fonte de carbono ($12,18 \text{ g.L}^{-1}$), já quando utilizado o glicerol puro esta foi de $11,82 \text{ g.L}^{-1}$. O glicerol residual foi considerado a melhor fonte de carbono, apresentando concentração, produtividade e rendimento maiores do que quando utilizado glicerol puro como fonte de carbono.

2.7 EPSs Produzidos por *Zymomonas mobilis*

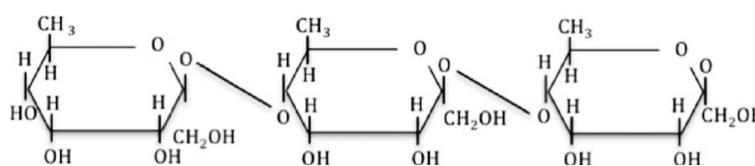
Zymomonas mobilis é uma bactéria Gram-negativa, apresenta morfologia de bastonete, na forma isolada, aos pares ou em cadeia, possuindo de 1 a $6 \mu\text{m}$ de comprimento e de 1 a $4 \mu\text{m}$ de diâmetro, não forma cápsulas e nem esporos, é anaeróbia facultativa e pode

crescer em baixos valores de pH e em temperaturas de 25 a 30°C (MALVESSI, 2008; WEBER, 2003), sendo indicada para produção de levana em larga escala (OLIVEIRA et al., 2007; HAYASHI, FURUTA; FURUKAWA, 2011).

Quando a glicose é utilizada como fonte de carbono o principal produto formado é o etanol, mas quando a sacarose juntamente com a glicose ou frutose são utilizadas ocorre a formação de coprodutos, como a levana e o sorbitol (WEBER, 2003).

A levana é um exopolissacarídeo constituído por unidades de frutose, unidas por ligações α -(2,6) (representada na figura 3), sendo sintetizada por vários micro-organismos durante o cultivo em meio à base de sacarose, extrato de levedura e sais minerais. Este exopolissacarídeo possui diversas aplicações tanto na área de alimentos (fixador de cores e sabores, espessante e estabilizante de vários alimentos) como também na área farmacêutica (substituto de plasma sanguíneo, imunomodulador, anticarcinogênico e hipocolesterolêmico) (ERNANDES; CRUZ, 2011).

Figura 3 - Estrutura química da levana



Fonte: DONOT et al. (2012)

Ernandes; Cruz (2011) realizaram um estudo comparativo da produção de levana a partir de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, utilizando meios de cultivo sintético e caldo de cana-de-açúcar. Os resultados obtidos indicaram que o caldo de cana-de-açúcar, utilizado como meio de cultura alternativo, foi uma matéria prima adequada para o cultivo de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, pois a sua composição possibilitou a obtenção de rendimentos de levana superiores ou semelhantes (43; 63,3 e 82,6 g.L⁻¹, utilizando 100, 150 e 200 g.L⁻¹ de sacarose, respectivamente) às concentrações do meio sintético (26,1; 42,4 e 85,4 g.L⁻¹, utilizando 100; 150 e 200 g.L⁻¹ de sacarose, respectivamente).

2.8 Propriedades Reológicas dos EPSs Bacterianos

A palavra reologia foi primeiramente utilizada por Eugene C. Bingham, em 1928, ao definir que estudo é a reologia (STEFFE, 1996). Em todos os testes reológicos, a operação

fundamental é a aplicação de uma força no material investigado e a medida da deformação ou, equivalentemente, é aplicada uma deformação e medida sua resistência (DIAZ, 2008).

Quando um sólido ideal é submetido a uma tensão, causando uma deformação temporária, sua forma é restaurada de maneira natural e a energia dissipada é recuperada independente do tempo. Já em um fluido perfeitamente viscoso, a energia não é reestabelecida, sendo dissipada conforme a deformação do material. Devido a estas propriedades, em um material viscoelástico, uma parcela de energia pode ser parcialmente recuperada, enquanto outra parte poderá ser dissipada (NAVARRO, 1997).

Para avaliar a qualidade dos biopolímeros, entre as análises reológicas, as mais utilizadas são as análises de viscosidade e viscoelasticidade (DIAZ, 2008). Soluções de biopolímeros bacterianos com características industriais mais relevantes geralmente apresentam propriedades pseudoplásticas, viscoelásticas e tensão residual elevada, podendo formar soluções viscosas e géis em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações, sendo a determinação da viscosidade aparente o critério mais usual para medir sua viabilidade e aplicação (DIAZ, 2002).

Se um polímero possui mesma composição química e massa molecular, a viscosidade do polímero ramificado é menor que a de um linear, pois as ramificações reduzem o grau de enrolamento da cadeia linear. A queda da viscosidade ocorre quando os ramos não ultrapassam um dado comprimento, o que está relacionado com a alteração no movimento cooperativo dos segmentos da cadeia. Se ocorrer que os ramos da cadeia sejam longos, com comprimento maior que o crítico da cadeia, ou quando a estrutura da cadeia possibilita que seus elementos se transformem em enrolamentos, a viscosidade irá aumentar (NAVARRO, 1997).

As propriedades reológicas dos biopolímeros são importantes quando são usadas nas formulações de alimentos, sendo que na maioria dos biopolímeros ocorre uma diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura, sendo a goma xantana uma exceção entre 0 e 100°C (MESOMO, 2007).

Mesomo et al. (2009) produziram goma xantana através da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, utilizando como fonte de carbono o soro de leite. Ao determinar a viscosidade deste biopolímero em uma concentração de 3% a 25°C de $4\pi 264 \text{ s}^{-1}$, obtiveram uma viscosidade de 1831,34 cP. Quando utilizaram 1 g.L^{-1} de CaCl_2 e $46,8 \text{ g.L}^{-1}$ da goma (25°C), encontraram uma viscosidade de 1704,53 cP.

Reis et al. (2010) compararam a viscosidade aparente de biopolímeros produzidos por *Xanthomonas* sp C1 e C9 em meios contendo sacarose, glicerol proveniente do biodiesel e

uma mistura de ambos (proporção 1:1) como fonte de carbono, utilizando soluções aquosas 3% a 25°C e 0,257 s⁻¹. Os valores de viscosidade aparente nos meios contendo sacarose, sacarose:glicerol (1:1) e glicerol foram de 941, 142 e 140 cP, respectivamente, quando utilizada *Xanthomonas* sp C1 para produção da goma. Quando utilizada *Xanthomonas* sp C9, um maior valor foi encontrado ao utilizar o meio composto pela mistura de sacarose com glicerol (aproximadamente 185 cP) do que em meio contendo sacarose (aproximadamente 40 g.L⁻¹) nas mesmas condições anteriores.

2.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Conforme Bernal et al. (2002), a análise térmica foi definida por Mackenzie como sendo um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida, enquanto a amostra é submetida a uma programação de temperatura. Dentre as técnicas termoanalíticas mais utilizadas encontram-se a Análise Térmica Diferencial (DTA - do inglês *Differential Thermal Analysis*), na qual se acompanha a variação de temperatura da amostra em relação a um material inerte de referência, e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC - do inglês *Differential Scanning Calorimetry*), na qual se acompanha a variação da energia entre a amostra e a referência.

Através do DSC é possível verificar as alterações físicas ou químicas da amostra associadas com o calor, tais como transições de fase (fusão, ebulição, sublimação, congelamento, inversões de estrutura cristalina) ou reações de desidratação, dissociação, decomposição, óxido-redução, entre outras, capazes de causar variações de calor. De modo geral, transições de fase, desidratações, reduções e reações de decomposição produzem efeitos endotérmicos. Já cristalizações, oxidações e algumas reações de decomposição produzem efeitos exotérmicos. Esta técnica ainda permite o estudo de transições que envolvem variações de entropia (transições de segunda ordem), onde as mais comuns são as transições vítreas que alguns polímeros podem sofrer (FARIA, 2009).

CAPÍTULO III:
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Artigo I:

**APROVEITAMENTO DO GLICEROL RESIDUAL NA PRODUÇÃO DE
EXOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS**

APROVEITAMENTO DO GLICEROL RESIDUAL NA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS

RESUMO

As crescentes emissões de dióxido de carbono vêm alterando o clima do planeta, o que tem atraído pesquisas por buscas de fontes alternativas, que venham a substituir os combustíveis fósseis. Neste contexto, os biocombustíveis, como por exemplo o biodiesel, constituem uma alternativa para minimizar este problema. Por ser de origem vegetal, contribui para o ciclo do carbono na atmosfera, sendo por isso considerado uma energia renovável. Após a conversão do biodiesel, cerca de 10% dessa matéria prima é transformada em glicerol, principal subproduto da reação. A fim de aproveitar este coproduto de baixo valor e grande disponibilidade, o objetivo do trabalho foi utilizar o glicerol residual (GR) gerado na produção do biodiesel como fonte de carbono para a produção de exopolissacarídeos bacterianos, comparando com a sacarose (S) e com uma mistura de ambos na proporção de 1:1 m/m (SGR). Foram utilizadas linhagens de bactérias mencionadas na literatura como produtoras de EPSs de importância comercial, sendo elas: *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14683, *Sphingomonas capsulata* NRRL B-4261 e *Zymomonas mobilis* NRRL B-4286. Os cultivos foram realizados em meio apropriado para cada micro-organismo e formulados com as diferentes fontes de carbono. Os meios foram inoculados com suspensão da bactéria em estudo, avaliando-se parâmetros relativos ao crescimento celular e à produção de EPSs. Para *X. campestris* a concentração de EPSs, em torno de 4 g.L⁻¹, foi encontrada para as três diferentes fontes de carbono testadas. Para a bactéria *P. oleovorans*, apenas o meio composto por S (0,8 g.L⁻¹) diferiu dos demais meios, sendo encontrado resultados maiores com o glicerol residual e a mistura de ambos. A bactéria *S. capsulata* apresentou uma maior concentração em meio contendo somente S e a mistura SGR, ficando em torno de 3,4 g.L⁻¹, sendo que em meio contendo GR este valor caiu para 1,7 g.L⁻¹. Já a bactéria *Z. mobilis* apresentou um melhor resultado em meio contendo SGR (1,3 g.L⁻¹), sendo que em meio contendo S e GR, estes valores foram inferiores, alcançando 0,2 e 0,7 g.L⁻¹, respectivamente. A maior produtividade foi encontrada para a bactéria *X. campestris* utilizando o glicerol residual, não diferindo significativamente ($p>0,05$) da sacarose como fonte de carbono. Quase todas as bactérias atingiram a fase estacionária em 24 h de cultivo e o pH permaneceu praticamente constante, sendo verificada uma queda mais acentuada somente para a bactéria *Z. mobilis*. Os resultados demonstram que é possível utilizar o glicerol residual na produção de EPSs bacterianos.

Palavras-chaves: *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Zymomonas*, glicerol residual, biopolímeros.

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é a principal fonte de energia no mundo, mas por se tratar de um combustível de origem fóssil, e com expectativa de diminuição das suas reservas no futuro próximo, pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de desenvolver fontes de energia renováveis (SILVA, MACK; CONTIERO, 2009).

Os biocombustíveis podem ser definidos como combustíveis produzidos a partir de biomassas agrícolas, portanto renováveis, pois reduzem a emissão de gases de efeito estufa em função da absorção do gás carbônico atmosférico que ocorre na produção da biomassa. Para motores do tipo diesel tem sido mundialmente proposto o uso do biodiesel, constituído por uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos obtida a partir de matérias primas ricas em ácidos graxos, caso dos óleos vegetais e das gorduras animais (BONOMI, POÇO; TRIELLI 2006), gerando cerca de 10% de glicerol (ABAD; TURON, 2012). A indústria do biodiesel considera o glicerol residual gerado na produção do biodiesel como uma *commodity* de baixo valor (AMARAL et al., 2009).

Por outro lado, um alto potencial de aplicação nos mais diversos segmentos industriais tem surgido para biopolímeros microbianos, também chamados de exopolissacarídeos (EPSs), os quais são excretados pelas células, sendo produzidos por diferentes bactérias e usados em produtos alimentícios, farmacêuticos, químicos, entre outros (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009; FREITAS, ALVES; REIS, 2011; PRASANNA et al., 2012). Os açúcares constituem as fontes de carbono mais comumente utilizadas para a produção de EPSs bacterianos. No entanto, substratos de custos inferiores, tais como resíduos industriais, têm demonstrado ser adequados para a produção desses EPSs (FREITAS, ALVES; REIS, 2011). Sendo assim, torna-se importante investigar o uso do glicerol residual como fonte de carbono em cultivos para produção de EPSs, de forma a permitir o aproveitamento do excedente do glicerol gerado na produção do biodiesel, contribuindo assim para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do biodiesel, além de diminuir custos do processo por aproveitar um coproduto de baixo custo e grande disponibilidade.

O presente trabalho propõe verificar a possibilidade de substituir total ou parcialmente a sacarose utilizada na produção de diferentes EPSs bacterianos, avaliando alguns parâmetros do crescimento celular e produção de EPSs em diferentes meios de cultivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Micro-organismos

Foram utilizadas linhagens de bactérias mencionadas na literatura como produtoras de EPSs de importância comercial.

A bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 foi obtida da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF) em Campinas em SP, Brasil.

As demais bactérias, *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14683, *Sphingomonas capsulata* NRRL B-4261 e *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-4286, foram obtidas da ARS Culture Collection, Bacterial Foodborne Pathogens and Mycology Research Unit em National Center for Agricultural Utilization Research em Peoria, Estados Unidos.

2.1.2 Glicerol Residual

O glicerol residual proveniente da obtenção de biodiesel a partir do óleo de soja por via metanólica foi fornecido pela empresa BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A (Passo Fundo - RS). O glicerol residual continha 81,92% (m/m) de pureza, de acordo com laudo fornecido pela própria empresa, sendo que a quantidade adicionada nos meios levou em conta sua composição, a fim de resultar na concentração desejada do substrato (glicerol) nos meios de cultivo.

2.2 Métodos

2.2.1 Re-hidratação das culturas liofilizadas

As culturas acondicionadas em ampolas de vidro foram rompidas em condições assépticas, conforme ilustrado na figura 1. Na ampola que continha a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 foram adicionadas 5 gotas do Caldo Nutriente, contendo (g.L⁻¹): 5 peptona; 5 NaCl; 1,5 extrato de carne; 1,5 extrato de levedura, sendo após incubada em estufa (Quimis Q-316 M2, Brasil) a 28°C durante 60 min. Transcorrido esse

tempo, as suspensões foram transferidas para placas de Petri contendo meio Ágar Nutriente e novamente incubadas a 28°C por 48 h (IBSBF, 2013).

Para as bactérias *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14683 e *Sphingomonas capsulata* NRRL B-4261 foi realizado o mesmo procedimento, sendo utilizado o meio TGY (Tryptone Glucose Yeast Agar), contendo (g.L⁻¹): 5 triptona; 5 extrato de levedura; 1 glicose; 1 K₂HPO₄; 10 ágar. Já para a bactéria *Zymomonas mobilis* NRRL B-4286 o meio utilizado para a reativação foi o YP, contendo (g.L⁻¹): 20 peptona; 10 extrato de levedura; 20 glicose; 20 ágar.

Figura 1 ã Ampola sendo rompida



2.2.2 Manutenção das culturas microbianas

A partir das culturas re-hidratadas foram realizados repiques sucessivos, sendo utilizado para *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 1230 o meio YM (Yeast Malt), composto por (g.L⁻¹): 3 extrato de levedura; 3 extrato de malte; 5 peptona; 20 glicose; 10 ágar; pH 7,2 (MESOMO, 2007). Para as bactérias *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14683 e *Sphingomonas capsulata* NRRL B-4261 foi utilizado o meio contendo (g.L⁻¹): 20 glicose; 5 peptona; 3 extrato de levedura; 5 cloreto de sódio; 20 ágar; água destilada q.s.p.; pH 6,8-7,0 (BAJAJ et al., 2006). Já para a bactéria *Zymomonas mobilis* NRRL B-4286 o meio utilizado continha (g.L⁻¹): 20 sacarose; 2,5 extrato de levedura; 1 KH₂PO₄; 1 (NH₄)₂SO₄; 0,5 MgSO₄.(7H₂O); 20 ágar (OLIVEIRA et al., 2007).

Para o crescimento celular, todas as bactérias foram vertidas em placas de petri e incubadas em estufa (Quimis Q-316 M2, Brasil) com temperatura controlada (28°C) por 48 h. As cepas foram mantidas refrigeradas, sendo realizados repiques mensais.

2.2.3 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi realizada para todas as bactérias a fim de verificar as características das colônias dos micro-organismos, caracterizá-las visualmente, diferenciá-las em Gram-positivas e Gram-negativas, bem como avaliar se as mesmas não apresentavam contaminação ao fim do processo.

2.2.4 Preparo do inóculo e contagem das células viáveis

Inicialmente, a curva de crescimento microbiano, expressa como DO em função do tempo, foi obtida a partir de ensaios em triplicata de preparo de inóculo, a fim de verificar o tempo para atingir a fase de crescimento exponencial das bactérias mencionadas, bem como fixar uma faixa de DO a 560 nm para cada bactéria em estudo, a fim de padronizar o preparo de inóculo. Este procedimento foi realizado por que não havia informações prévias quanto ao crescimento destes micro-organismos.

O inóculo foi preparado partindo de um tubo contendo a cultura microbiana reativada, sendo raspada com 10 mL de água peptonada 0,1 %, a fim de resultar em uma suspensão de células. Esta foi transferida para 90 mL de meio apropriado contido em frasco *Erlenmeyer* de 500 mL (figura 2). Os frascos foram mantidos em incubadora refrigerada com agitação orbital (Tecnal TE - 424, Brasil) a 28°C e 150 rpm, até atingir a densidade ótica (DO_{560nm}) estabelecida para cada bactéria.

Figura 2 - Preparo do inóculo



No momento em que a DO foi atingida, o inóculo correspondente a 10% do volume final foi transferido para o cultivo. Ao mesmo tempo uma alíquota foi submetida a diluições decimais em série, transferindo-se 1 mL do inóculo para 9 mL de água peptonada (0,1%), até a diluição 10^{-8} , transferindo-se 1 mL da amostra diluída para placas contendo meio sólido apropriado para cada micro-organismo. As colônias foram contadas após 48 h de incubação em estufa (Quimis Q-316 M2, Brasil) a 28°C, nas placas que possuíam de 25 a 250 colônias, sendo as diluições realizadas em duplicata e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mL de meio ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) (LUVIELMO, VENDRUSCOLO; SCAMPARINI, 2007).

2.2.5 Cultivos em frascos agitados

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL (ilustrado na figura 3). A suspensão microbiana (com DO a 560 nm estabelecida), correspondente a 10 % do volume total (10 mL) foi transferida para 90 mL de meio de cultivo, a fim de totalizar 100 mL de meio. Os frascos foram mantidos em incubadora refrigerada com agitação orbital (Tecnal TE-424, Brasil), na temperatura de 28°C e 200 rpm de agitação.

Nesta etapa foram utilizados meios de produção específicos para cada micro-organismo, com ajuste inicial do pH, conforme descrito na tabela 1. Como fontes de carbono foram testadas a sacarose (S), o glicerol residual (GR), considerando sua composição a fim de resultar na concentração desejada do substrato, e uma mistura de ambos na proporção de 1:1 m/m, totalizando a concentração indicada (SGR), como sugerido por Reis et al. (2010), já que a sacarose é a fonte de carbono usual na produção dos EPSs estudados.

Para a avaliação do crescimento celular, foram retiradas amostras (10 mL) nos tempos de 0, 24 e 48 h, para determinações analíticas no sobrenadante (pH) e sedimento (biomassa), conforme métodos descritos nos itens 2.3.1 e 2.3.2.

Para determinação dos EPSs, os cultivos foram conduzidos por 48 h, sendo que todo o conteúdo dos frascos (100 mL) foi centrifugado em centrífuga refrigerada (Cientec CT-5000R, Brasil), conforme descrito no item 2.3.3. Tal procedimento foi adotado pelo fato da determinação de EPSs exigir uma alíquota maior, já que o método é gravimétrico.

Figura 3 - Cultivo em frascos agitados**Tabela 1** - Composição dos meios de produção de EPSs.

Micro-organismo	Composição do meio (g.L ⁻¹)*	Referência
<i>Xanthomonas campestris</i>	50 fonte de carbono; 2,5 NH ₄ H ₂ PO ₄ ; 5,0 K ₂ HPO ₄ ; 0,006 H ₃ BO ₃ ; 2 (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,0024 FeCl ₃ ; 0,002 CaCl ₂ .2H ₂ O; 0,002 ZnSO ₄ ; pH 7,0.	REIS et al. (2010)
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	25 fonte de carbono; 3,3 (NH ₄) ₂ HPO ₄ ; 5,8 K ₂ HPO ₄ ; 3,7 KH ₂ PO ₄ ; 10 mL de solução de MgSO ₄ 100 mM; 1 mL de solução de micronutrientes.**; pH 7,0.	FREITAS et al. (2010)
<i>Sphingomonas capsulata</i>	20 fonte de carbono; 10 Na ₂ HPO ₄ ; 1 K ₂ SO ₄ ; 1 NaCl; 0,15 (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,2 MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,01 CaCl ₂ .2H ₂ O; 0,001 FeSO ₄ .7H ₂ O; 0,5 extrato de levedura; pH 6,8-7,0.	BAJAJ et al. (2006)
<i>Zymomonas mobilis</i>	20 fonte de carbono; 2,5 extrato de levedura; 1 KH ₂ PO ₄ ; 1 (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,5 MgSO ₄ .7H ₂ O; pH 7,0.	OLIVEIRA et al. (2007)

* Como fontes de carbono foram usadas sacarose, glicerina residual e a mistura de ambos na mesma proporção mássica (1:1), resultando na concentração indicada.

**Solução de micronutrientes (em g.L⁻¹ de HCl 1N): 2,78 FeSO₄.7H₂O; 1,98 MnCl₂.4H₂O; 2,81 CoSO₄.7H₂O; 1,67 CaCl₂.2H₂O; 0,17 CuCl₂.2H₂O; 0,29 ZnSO₄.7H₂O.

Todos os cultivos foram realizados em triplicata. Os resultados foram analisados por análise de variância e teste de *Tukey* (MONTGOMERY, 2004), a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre os meios estudados para um mesmo micro-organismo, a 95% de confiança (p < 0,05).

2.3 Métodos analíticos

2.3.1 Determinação do pH

O pH do sobrenadante foi medido diretamente em medidor de pH (Marte MB-10, Brasil) previamente calibrado, de acordo com AOAC (2000).

2.3.2 Determinação da biomassa

O crescimento celular foi monitorado por medida da absorvância a 560 nm, em espectrofotômetro visível (Biospectro SP-22, China), baseado no procedimento descrito por Prieto et al. (2008). A concentração de biomassa foi expressa em peso seco (g.L^{-1}), obtido a partir de uma curva de calibração previamente determinada para cada micro-organismo.

A partir das curvas de concentração celular foi $X_{\text{máx}}$ (g.L^{-1}), correspondente a biomassa máxima atingida;

2.3.3 Determinação da concentração de EPSs e produtividade

A recuperação dos EPSs do meio de cultivo foi realizada através da centrifugação (Cientec CT-5000R, Brasil) do meio a $3400 \times g$ por 30 min a 4°C , para remoção de células, seguido de precipitação do EPS pela adição de etanol 96,4 °GL (1:4 v/v), repouso por 24 h a 4°C , sendo novamente centrifugado por 30 min, sob refrigeração (4°C). A concentração dos EPSs foi determinada por gravimetria, secando em estufa com circulação forçada de ar (Quimis, Q314M242, Brasil) a 50°C até peso constante, relacionando ao volume de amostra (MESOMO, 2007).

A partir da concentração de EPSs foi obtida a produtividade dos mesmos ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), conforme equação 2, onde:

$$\text{Prod} = \frac{[\text{EPS}]}{t} \quad (1)$$

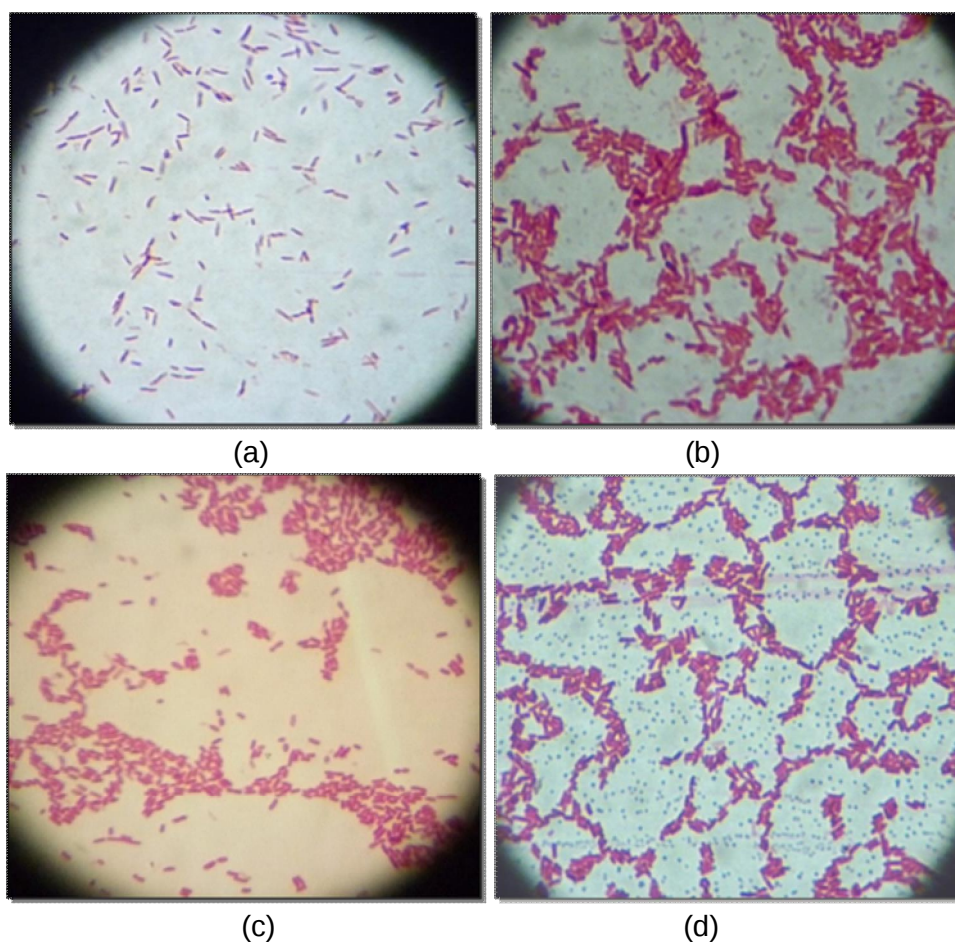
Sendo [EPS] correspondente à concentração do EPS no respectivo tempo de cultivo t.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Coloração de Gram

Na figura 4, encontram-se a coloração de Gram das seguintes bactérias: *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14683, *Sphingomonas capsulata* NRRL B-4261 e *Zymomonas mobilis* NRRL B-4286.

Figura 4 - Coloração de Gram das bactérias: (a) *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, (b) *P. oleovorans* NRRL B-14683, (c) *S. capsulata* NRRL B-4261 e (d) *Z. mobilis* NRRL B-4286



De acordo com a coloração de Gram pode-se visualizar que todas as bactérias apresentam-se como Gram-negativas, pois possuem coloração rosa.

A bactéria *X. campestris* possui formato de bastonetes, o que está de acordo com o descrito por Mesomo et al. (2007) e Garcia-Ochoa et al. (2000). A bactéria *P. oleovorans*

mostrou a mesma morfologia, estando de acordo com Lima et al. (2010). Também a mesma morfologia de bastonete foi observada na bactéria *Z. mobilis*, estando de acordo com o descrito por Malvessi (2008) e Weber (2003). Segundo Berwanger (2005), bactérias do gênero *Sphingomonas* apresentam formato de bastonetes ou cocos e, de acordo com o visualizado na coloração, a bactéria *S. capsulata* apresentou morfologia de bastonetes.

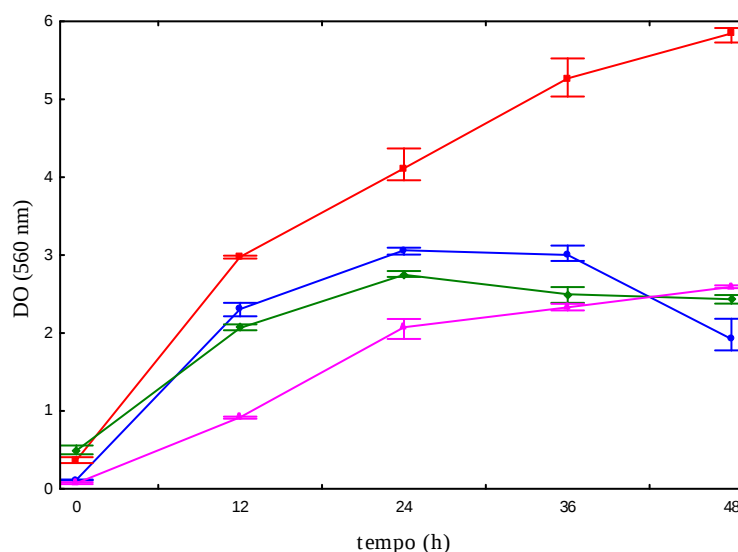
3.2 Avaliação dos inóculos

3.2.1 Curvas do crescimento celular

As curvas de crescimento microbiano durante o preparo do inóculo foram determinadas por medida da DO a 560 nm, a fim de obter informações sobre a fase exponencial das bactérias (figura 5).

A partir das curvas observou-se crescimento acelerado nas primeiras 12 h de incubação para as bactérias *X. campestris*, *P. oleovorans* e *S. capsulata*, podendo-se afirmar que neste período encontram-se na fase exponencial de crescimento, havendo uma desaceleração do crescimento após as 12 h de cultivo. Entretanto, *P. oleovorans* apresentou um crescimento mais acentuado, atingindo DO bastante superior às demais bactérias, e com uma desaceleração do crescimento celular menos acentuada. Por outro lado, para a bactéria *Z. mobilis* foi observado um crescimento mais lento, atingindo valores de DO mais próximos às das demais bactérias somente após 24 h de incubação. De acordo com esses resultados fixou-se uma DO de 1,9 a 2,1 a fim de padronizar o inóculo e utilizar células na fase exponencial de crescimento.

Figura 5 - Crescimento celular das bactérias (X) *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, (Ω) *P. oleovorans* NRRL B-14683, (κ) *S. capsulata* NRRL B-4261 e (Y) *Z. mobilis* NRRL B-4286 em função do tempo.



3.2.2 Contagem de células viáveis

A contagem das células viáveis foi realizada a fim de verificar as Unidades Formadoras de Colônias por mL de meio no inóculo.

Tabela 2 Contagem de células nos inóculos das diferentes bactérias ao atingir a DO_{560nm} recomendada.

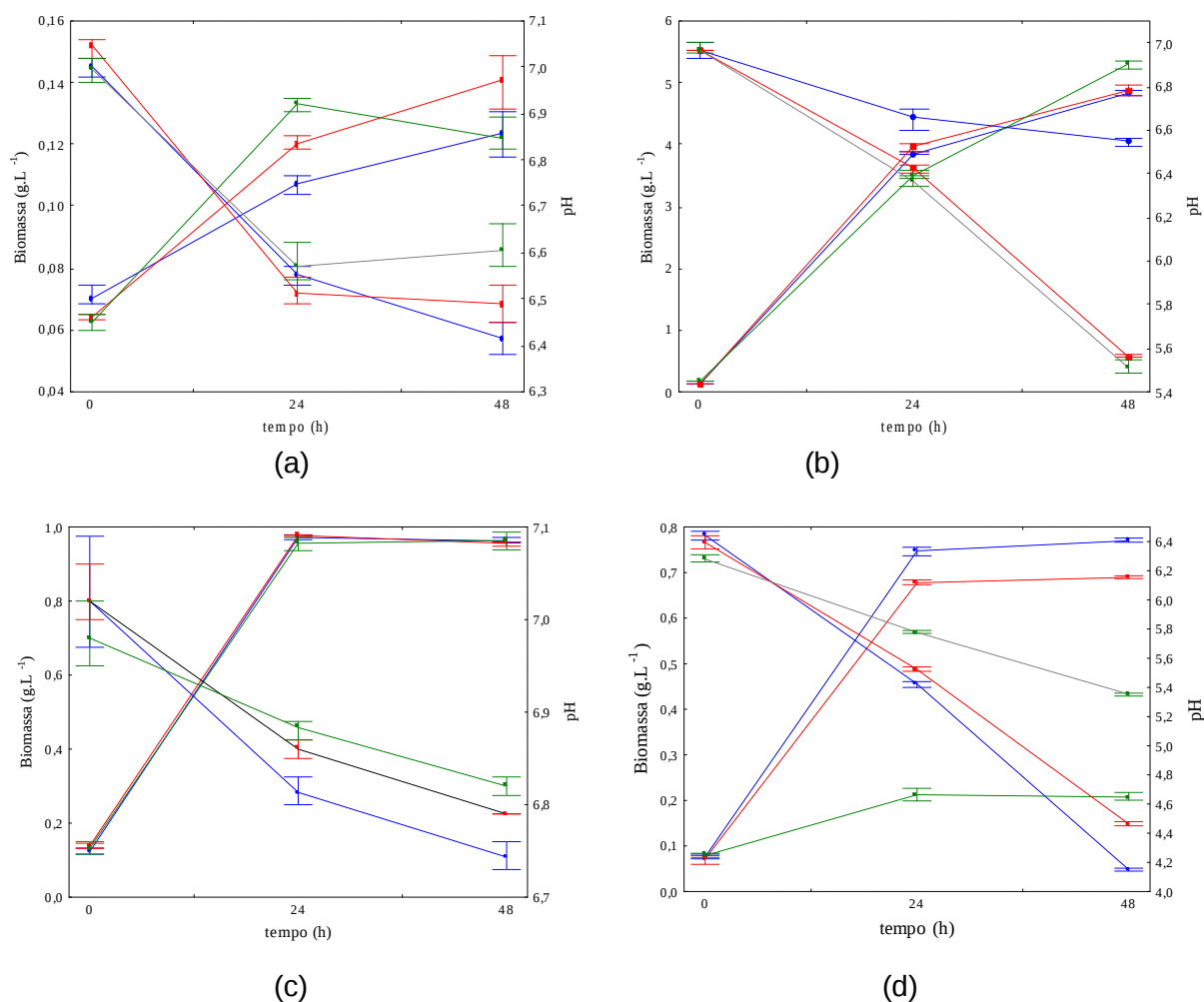
Micro-organismo	UFC.mL ⁻¹
<i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> IBSBF 1230	$4,60.10^9$
<i>P. oleovorans</i> NRRL B-14683	$1,77.10^9$
<i>S. capsulata</i> NRRL B-4261	$2,50.10^9$
<i>Z. mobilis</i> NRRL B-4286	$2,74.10^8$

De acordo com a tabela 2, a bactéria *Z. mobilis* foi a que apresentou uma menor contagem no inóculo, sendo que para as outras bactérias a concentração foi na ordem de 10^9 UFC.mL⁻¹, estando de acordo com Pan, Moreira; Vendruscolo (2000), que ao avaliar o efeito da concentração inicial do inóculo da bactéria *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 6, concluíram que com uma concentração de $2,6.10^9$ UFC.mL⁻¹ a concentração da goma xantana aumentou em relação a concentrações iniciais de células menores, não diferindo significativamente de concentrações mais elevadas, além de apresentar uma maior viscosidade. O número de células iniciais tem influência sobre a produção e qualidade do biopolímero, sendo que os cultivos com concentrações iniciais elevadas apresentam maior produção, viscosidade aparente e estabilidade celular.

3.2.3 Produção de biomassa utilizando diferentes fontes de carbono

As figuras 6 (a), 6 (b), 6 (c) e 6 (d) apresentam o acompanhamento da biomassa e pH observados nos cultivos das bactérias *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, *P. oleovorans* NRRL B-14683, *S. capsulata* NRRL B-4261 e *Z. mobilis* NRRL B-4286, respectivamente, para as diferentes fontes de carbono testadas.

Figura 6 ñ Biomassa (linha contínua) e pH (linha tracejada) das bactérias *X. campestris* IBSBF 1230 (a), *P. oleovorans* NRRL B-14683 (b), *S. capsulata* NRRL B-4261 (c), *Z. mobilis* NRRL B-4286 (d) em meio contendo (X) sacarose, (Ω) sacarose e glicerol residual (proporção de 1:1) e (κ) glicerol residual



Ao analisar a biomassa, verificou-se que para as bactérias *S. capsulata* e *Z. mobilis* a fase estacionária foi atingida a partir de 24 h de cultivo nos diferentes meios estudados. Para as bactérias *X. campestris* e *P. oleovorans* a fase estacionária não foi tão acentuada, havendo ainda um decréscimo na concentração de biomassa quando utilizado o glicerol residual para o cultivo da bactéria *X. campestris*.

Quando analisado o pH, para a bactéria *P. oleovorans* pode-se perceber que, em meio contendo S o comportamento do pH diferiu dos demais meios em estudo, sendo 6,55. Já em meio com GR e SGR o pH caiu para 5,51 e 5,56, respectivamente, em 48 h de cultivo, sendo que a biomassa nestes dois meios foi superior. Para a bactéria *Z. mobilis* houve uma queda no pH, em relação as demais bactérias, chegando a 4,15 e 4,46 usando S e SGR, respectivamente, e 5,35 quando utilizado apenas GR, podendo-se observar o mesmo comportamento da bactéria *P. oleovorans*, ou seja, acidificação do meio acompanhada de aumento da biomassa, sendo a queda do pH provavelmente ocasionada pela produção de algum ácido. No entanto, para as demais bactérias a queda no pH foi menos acentuada.

A tabela 3 apresenta os resultados relativos à biomassa máxima para as bactérias em estudo.

Tabela 3 Biomassa máxima das bactérias *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, *P. oleovorans* NRRL B-14683, *S. capsulata* NRRL B-4261 e *Z. mobilis* NRRL B-4286 nos para diferentes fontes de carbono*

Fonte de carbono	<i>X. campestris</i> pv <i>mangiferaeindicae</i> IBSBF 1230	<i>P. oleovorans</i> NRRL B-14683	<i>S. capsulata</i> NRRL B-4261	<i>Z. mobilis</i> NRRL B-4286
S	0,124 ± 0,007 ^b	4,855 ± 0,071 ^b	0,972 ± 0,006 ^a	0,769 ± 0,005 ^a
SGR	0,141 ± 0,008 ^a	4,896 ± 0,086 ^b	0,977 ± 0,003 ^a	0,689 ± 0,003 ^b
GR	0,133 ± 0,002 ^{a,b}	5,299 ± 0,069 ^a	0,963 ± 0,024 ^a	0,212 ± 0,014 ^c

*Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as fontes de carbono para um mesmo micro-organismo ($p < 0,05$).

A bactéria *X. campestris* apresentou o maior valor de biomassa máxima utilizando SGR (0,141 g.L⁻¹) em 48 h de cultivo, não diferindo de quando utilizado o GR (0,133 g.L⁻¹) como fonte de carbono em 24 h de cultivo, o qual não diferiu de quando utilizado a S (0,124 g.L⁻¹), sendo este valor alcançado em 48 h.

Com a bactéria *P. oleovorans* obteve-se uma maior biomassa em relação às demais bactérias em estudo, alcançando em 48 h de cultivo uma concentração de 5,299 g.L⁻¹ em meio contendo GR como única fonte de carbono, diferindo significativamente ($p < 0,05$) quando utilizado a S (4,855 g.L⁻¹) e SGR (4,896 g.L⁻¹).

Para a bactéria *S. capsulata*, a concentração de biomassa não diferiu significativamente entre as diferentes fontes de carbono, pois os valores máximos encontrados foram muito próximos, em torno de 1 g.L^{-1} , e alcançados em 24 h de cultivo em S e SGR, e em 48 h de cultivo com GR.

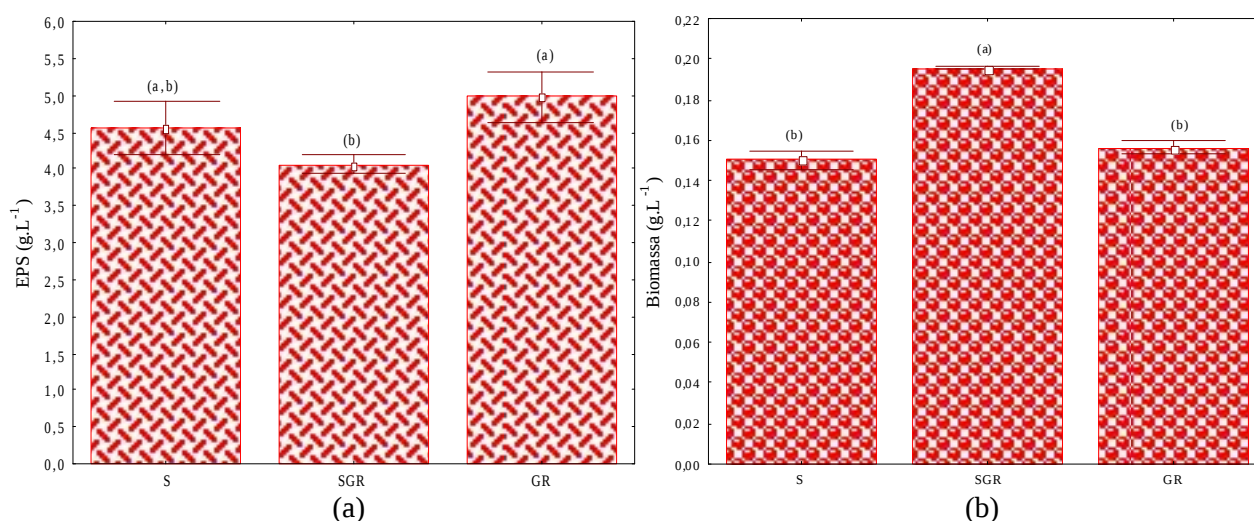
A bactéria *Z. mobilis* alcançou uma máxima concentração celular com S (cerca de $0,8 \text{ g.L}^{-1}$), seguido de SGR (cerca de $0,7 \text{ g.L}^{-1}$), em 48 h de cultivo, sendo que utilizando o GR como fonte de carbono a biomassa máxima foi de $0,212 \text{ g.L}^{-1}$, em 24 h de cultivo, portanto diferindo entre si ($p < 0,05$).

3.3 Produção de EPSs utilizando diferentes fontes de carbono

A produção dos EPSs, bem como a biomassa, foi determinada em 48 h de cultivo, após todo o meio ser centrifugado. Cabe salientar que, pelo fato de que a precipitação foi feita com adição de etanol (conforme descrito no item 2.3.3) para todos os ensaios, sem posterior purificação, algum outro material extracelular pode ter precipitado conjuntamente. Portanto, os valores de EPSs apresentados correspondem ao material extracelular precipitável por etanol, conforme descrito por Staudt; Wolfe, Shrout (2012).

A figura 7 (a) apresenta os resultados referentes à produção de EPSs e 7 (b) biomassa pela bactéria *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 em 48 h de cultivo.

Figura 7 ã EPSs (a) e biomassa (b) produzidos por *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 em 48 h de cultivo utilizando diferentes fontes de carbono*



*Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as fontes de carbono para uma mesma resposta ($p < 0,05$).

De acordo com a figura 7 (a) pode-se observar que foi encontrada uma produção de EPS de 4,98 g.L⁻¹, quando GR foi utilizado como fonte de carbono, não diferindo significativamente do EPS produzido com S (4,55 g.L⁻¹). Ainda, o meio contendo somente S não diferiu significativamente do meio contendo SGR (4,07 g.L⁻¹). A maior concentração de biomassa (7 b) foi encontrada com SGR (0,19 g.L⁻¹), diferindo significativamente ($p < 0,05$) das demais fontes de carbono.

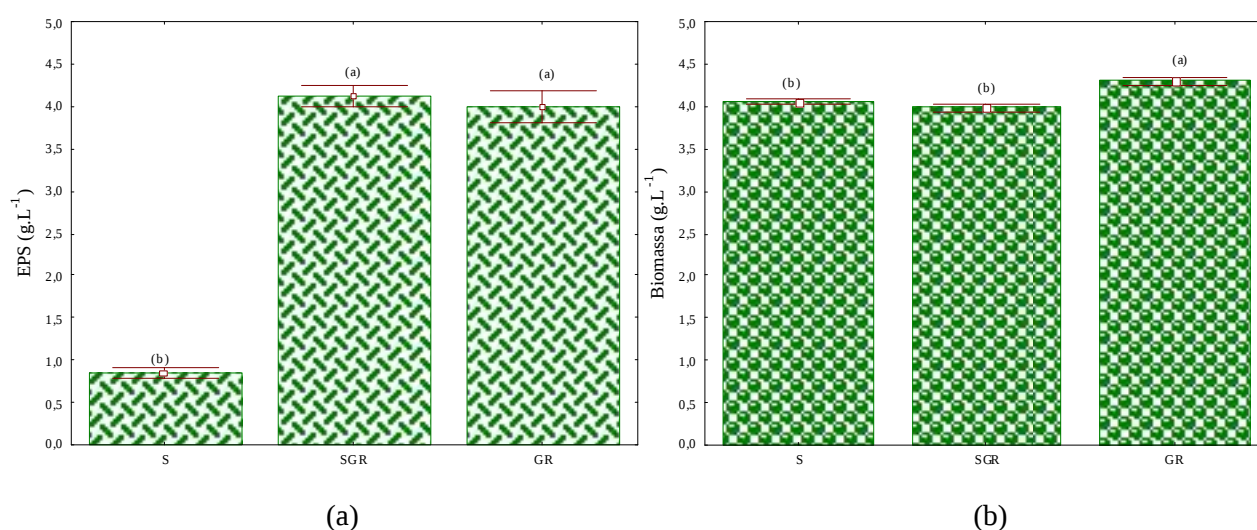
Reis et al. (2010) avaliaram a capacidade das bactérias *Xanthomonas* sp C1 e C9 de produzirem um biopolímero em meio contendo as mesmas fontes de carbono utilizadas nesse trabalho (S, SGR e GR), encontrando resultados inferiores ao presente trabalho. Os

autores observaram que o uso da sacarose e da mistura de sacarose e glicerol residual não representou diferenças significativas, sendo em torno de $0,33 \text{ g.L}^{-1}$ para S. Já para o meio composto somente por GR a concentração da goma foi de $0,157$ e $0,186 \text{ g.L}^{-1}$ para C1 e C9, respectivamente, diferindo das demais fontes de carbono.

Moreira et al. (2001) avaliaram a produção da goma xantana por 18 cepas da bactéria *X. campestris* pv pruni, utilizando a sacarose como fonte de carbono, sendo os cultivos realizados a 28°C e 200 rpm de agitação, obtendo-se concentrações da goma variando de $2,3$ até $8,3 \text{ g.L}^{-1}$ após 72 h de cultivo.

As figuras 8 (a) e 8 (b) apresentam, respectivamente, os resultados referentes à produção de EPSs e biomassa pela bactéria *P. oleovorans* NRRL B-14683, em 48 h de cultivo.

Figura 8- EPSs (a) e biomassa (b) produzidos por *P. oleovorans* NRRL B-14683 em 48 h de cultivo utilizando diferentes fontes de carbono*



*Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as fontes de carbono para uma mesma resposta ($p < 0,05$).

Através da figura 8 (a) pode-se perceber que foi encontrada uma maior concentração de EPSs com SGR ($4,11 \text{ g.L}^{-1}$) e GR ($3,99 \text{ g.L}^{-1}$), não diferindo significativamente entre si. A concentração de EPSs em meio com sacarose foi bastante inferior, diferindo significativamente das demais. Já a concentração de biomassa (figura 8 b) foi maior em meio com GR ($4,30 \text{ g.L}^{-1}$), diferindo significativamente dos demais meios, mas a diferença foi pequena.

Hiliou et al. (2009), utilizando a mesma cepa e utilizando como fonte de carbono 25 g.L^{-1} de glicerol e como fonte de nitrogênio $3,3 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ com pH 6,75-6,85 e

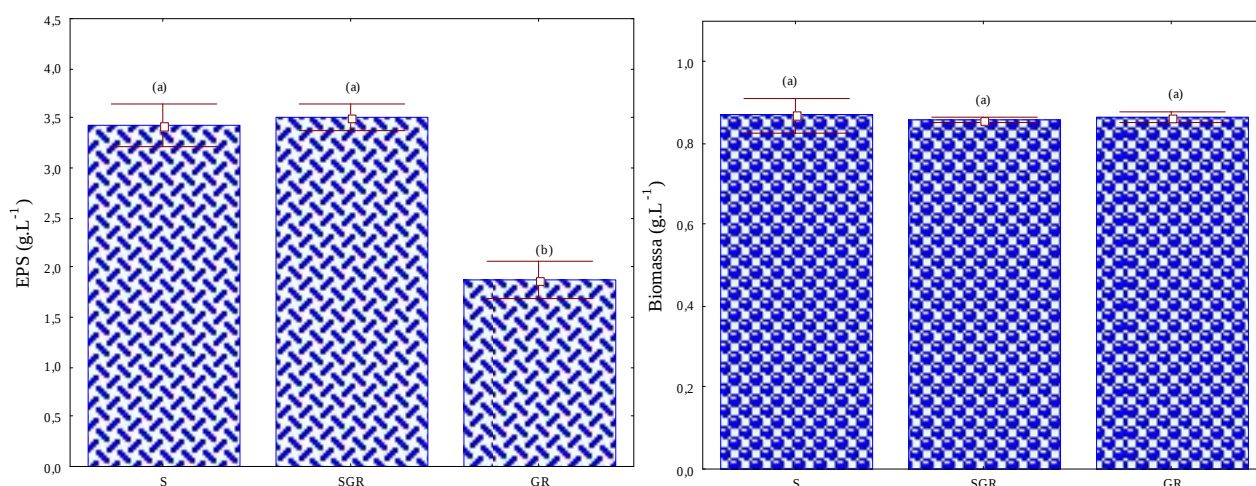
aeração de 0,125 vvm, obtiveram 13,3 g.L⁻¹ de EPSs em 7 dias de cultivo, utilizando biorreator de 10 L, onde as condições de agitação e aeração são muito mais eficientes.

Freitas et al. (2009) encontraram para a mesma cepa uma concentração de biomassa máxima de 7,32 g.L⁻¹ em meio contendo glicerol residual em 48 h de cultivo, sendo utilizado um biorreator alimentado com 200 g.L⁻¹ de glicerol e 0,9 g.L⁻¹ de NH₄⁺.

Freitas et al. (2010), cultivando em biorreator a mesma cepa e glicerol residual como fonte de carbono, encontraram na temperatura de 25°C uma concentração de biomassa de 4,50 g.L⁻¹, sendo a produção de EPSs de 5,00 g.L⁻¹. Já na temperatura de 30°C a biomassa e a concentração de EPSs aumentaram para 9,55 e 11,92 g.L⁻¹, respectivamente.

A figura 9 (a) apresenta os resultados referentes à produção de EPSs, e a figura 9 (b) a biomassa produzida pela bactéria *S. capsulata* NRRL B-4261 em 48 h de cultivo.

Figura 9 - EPSs (a) e biomassa (b) produzidos por *S. capsulata* NRRL B-4261 em 48 h de cultivo utilizando diferentes fontes de carbono*



*Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as fontes de carbono para uma mesma resposta ($p < 0,05$).

Ao analisar a figura 9 (a) pode-se perceber que a maior concentração de EPSs foi encontrada quando utilizada S (3,44 g.L⁻¹) e GR (3,51 g.L⁻¹) como fonte de carbono, não diferindo entre si, sendo a concentração encontrada, quando utilizado o glicerol residual como fonte de carbono, bastante inferior (1,87 g.L⁻¹). As concentrações de biomassa (figura 8 b) para as três fontes de carbono não diferiram significativamente, ficando em torno de 0,90 g.L⁻¹.

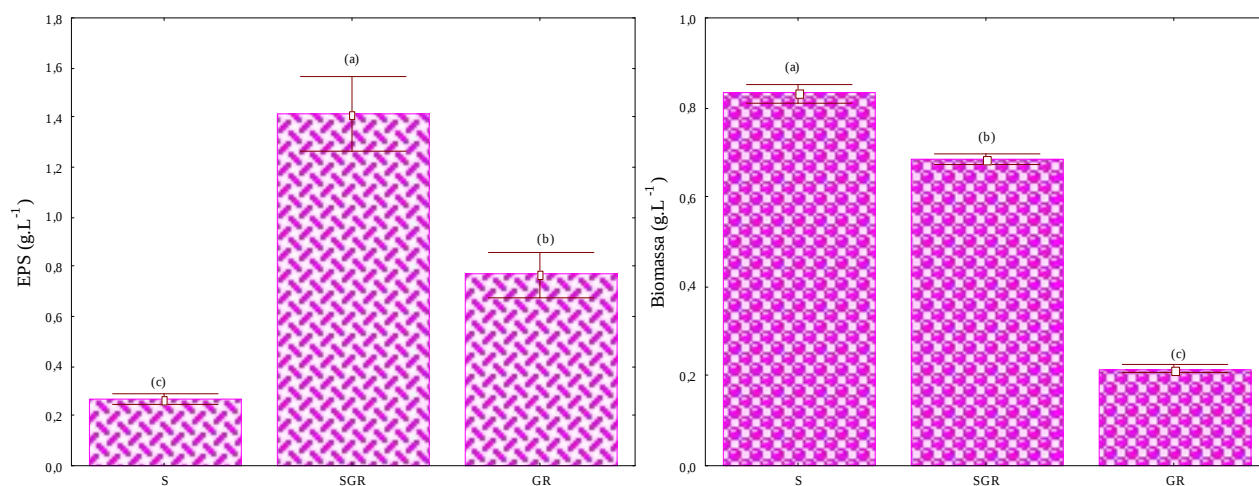
Arockiasamy; Banik (2008) encontraram para a bactéria *S. paucimobilis* uma concentração de biomassa e EPS de 3,80 e 8,76 g.L⁻¹, respectivamente, utilizando como fonte de carbono 40 g.L⁻¹ de sacarose, entretanto utilizando um biorreator com capacidade de 3 L,

onde os parâmetros de agitação e aeração são mais eficientes quando comparado ao cultivo com frascos agitados.

Bajaj et al. (2006) encontraram para a bactéria *S. paucimobilis* em meio contendo S como fonte de carbono uma concentração de biomassa em torno de $0,25 \text{ g.L}^{-1}$, sendo a maior concentração de biomassa encontrada quando amido solúvel foi utilizado como fonte de carbono ($0,46 \text{ g.L}^{-1}$).

A figura 10 (a) apresenta os resultados referentes à produção de EPSs e a figura 10 (b) os resultados de biomassa obtidos para a bactéria *Z. mobilis* NRRL B-4286, em 48 h de cultivo.

Figura 10 - EPSs (a) e biomassa (b) produzidos por *Z. mobilis* NRRL B-4286 em 48 h de cultivo utilizando diferentes fontes de carbono*



*Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as fontes de carbono para uma mesma resposta ($p < 0,05$).

Para a bactéria *Z. mobilis* pode-se perceber que houve uma maior concentração de EPSs (figura 10 a) em meio contendo a mistura SGR ($1,42 \text{ g.L}^{-1}$), seguido pelo GR ($0,77 \text{ g.L}^{-1}$) e S ($0,27 \text{ g.L}^{-1}$). A concentração de biomassa (10 b) foi maior em meio com S ($0,83 \text{ g.L}^{-1}$), seguido por SGR ($0,68 \text{ g.L}^{-1}$) e GR ($0,22 \text{ g.L}^{-1}$).

Oliveira et al. (2007), utilizando 250 g.L^{-1} de sacarose (fonte de carbono), em 24 h de cultivo, encontraram uma concentração de biomassa de $0,85 \text{ g.L}^{-1}$, resultado este similar ao encontrado neste trabalho ($0,83 \text{ g.L}^{-1}$) quando S foi usada.

A tabela 4 apresenta os resultados referentes à produtividade de EPSs para as bactérias *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, *P. oleovorans* NRRL B-14683, *S. capsulata* NRRL B-4261 e *Z. mobilis* NRRL B-4286.

De acordo com a tabela 4, analisando as diferentes bactérias, pode-se perceber que a maior produtividade foi encontrada para a bactéria *X. campestris* nos meios contendo GR e S, sendo que para esta bactéria não houve diferença significativa entre as fontes de carbono testadas.

Tabela 4 - Produtividade de EPSs para os diferentes micro-organismos cultivados nos meios contendo S, SGR e GR*

Micro-organismo	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)		
	S	SGR	GR
<i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> IBSBF 1230	0,095 ± 0,008 ^{a,A}	0,085 ± 0,003 ^{b,A}	0,104 ± 0,007 ^{a,A}
<i>P. oleovorans</i> NRRL B-14683	0,018 ± 0,001 ^{b,C}	0,086 ± 0,003 ^{a,A}	0,083 ± 0,004 ^{a,B}
<i>S. capsulata</i> NRRL B-4261	0,072 ± 0,004 ^{a,B}	0,073 ± 0,003 ^{a,B}	0,039 ± 0,004 ^{b,C}
<i>Z. mobilis</i> NRRL B-4286	0,005 ± 0,000 ^{c,D}	0,029 ± 0,003 ^{a,C}	0,016 ± 0,002 ^{b,D}

*Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as fontes de carbono para um mesmo micro-organismo (p<0,05). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os micro-organismos para uma mesma fonte de carbono (p<0,05).

Para a bactéria *P. oleovorans* foi encontrada uma maior produtividade quando SGR e GR foram utilizados como fonte de carbono, não diferindo significativamente entre si. Com *S. capsulata* foi encontrada uma maior produtividade quando SGR e S foram utilizadas como fonte de carbono, não diferindo significativamente entre si.

Já a *Z. mobilis* foi a bactéria que apresentou uma menor produtividade em relação às demais, sendo sua maior produtividade encontrada quando a mistura SGR foi utilizada como fonte de carbono, diferindo significativamente das outras fontes de carbono.

Berwanger et al. (2006) avaliaram a capacidade da bactéria *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666 em produzir um biopolímero, utilizando como fonte de carbono o melaço bruto e pré-tratado e resíduos de proteína texturizada de soja (PTS), testando diferentes concentrações (2,66; 4; 6 e 8%), e cujas condições de cultivo foram 28 ± 2°C, 208 rpm e 72 h. O melhor valor de produtividade foi encontrado para o melaço pré-tratado 8% (0,290 g.L⁻¹.h⁻¹), seguido do extrato aquoso de resíduo de PTS 6 % (0,240 g.L⁻¹.h⁻¹) e melaço bruto 8 % (0,190 g.L⁻¹.h⁻¹), resultados esses superiores aos encontrados no presente trabalho.

Freitas et al. (2010) avaliaram a produtividade da bactéria *P. oleovorans*, utilizando o glicerol residual como fonte de carbono e encontraram na temperatura de 25°C uma produtividade de 0,0341 g.L⁻¹.h⁻¹ e, na temperatura de 30 °C, uma produtividade de 0,083 g.L⁻¹.h⁻¹, sendo este último o mesmo valor encontrado no presente trabalho, com uma temperatura de 28°C.

Como a maior produtividade foi encontrada para a bactéria *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 com as diferentes fontes de carbono utilizadas, foi este o EPS escolhido para a caracterização parcial, em termos de viscosidade, propriedades térmicas e índice de emulsificação.

4. CONCLUSÕES

Ao comparar as bactérias *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, *P. oleovorans* NRRL B-14683, *S. capsulata* NRRL B-4261 e *Z. mobilis* NRRL B-4286, todas foram capazes de crescer e produzir EPSs em meio contendo somente GR como fonte de carbono, em 48 h de cultivo, sendo que as bactérias *X. campestris* e *P. oleovorans* foram capazes de produzir iguais ou maiores concentrações de EPSs quando utilizado somente GR como fonte de carbono em relação às demais fontes de carbono, não havendo uma relação definida entre concentração de biomassa e produção de EPSs. Desta forma, foi demonstrado que o GR pode ser uma boa alternativa de fonte de carbono, em substituição à sacarose, no cultivo de algumas bactérias produtoras de EPSs.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, S.; TURON, X. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 733-740, 2012.

AMARAL, P.F.F.; FERREIRA, T.F.; FONTES, G.C.; COELHO, M.A.Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 179-186, 2009.

AOAC, **Official Methods of Analysis** (17th edn). Washington: Association of Official Analytical Chemists, 2000. CD-ROM.

AROCKIASAMY, S.; BANIK, R.M. Optimization of gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 with nonionic surfactants using central composite design. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 3, p. 204-210, 2008.

BAJAJ, I. B.; SAUDAGAR, P.S.; SINGHAL, R.S.; PANDEY, A. Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, n. 3, p. 150-156, 2006.

BERWANGER, A.L.S.; DOMINGUES, N.M.; VANZO, L.T.; LUCCIO, M.D.; TREICHEL, H.; PADILHA, F.F.; SCAMPARINI, A.R.P. Production and rheological characterization of biopolymer of *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666 using conventional and industrial media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129, p. 942-950, 2006.

BERWANGER, A.L.S. **Produção e caracterização de um biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata***. 2005. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim.

BONOMI, A.; POÇO, J.G.; TRIELLI, M.A. Biocombustíveis: a solução brasileira para uma matriz energética sustentável. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 22, p. 16-21, 2006.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. **Carbohydrates Polymers**, v. 78, p. 549-556, 2009.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; PAIS, J.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 297-305, 2010.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; REIS, M.A.M. Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 388-398, 2011.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GOMÉZ, E. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549-579, 2000.

HILLIOU, L.; FREITAS, F.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M.; LESPINEUX, D.; GRANDFILS, C.; ALVES, V.D. Solution properties of an exopolysaccharide from a *Pseudomonas* strain obtained using glycerol as sole carbon source. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 526-532, 2009.

IBSBF. **Coleção de Cultura de Fitobactérias do Instituto Biológico**. Instruções para re-hidratação das culturas. Campinas, São Paulo, 2013.

LIMA, R.A.; ANDRADE, R.F.S.; SANTOS, L.Q.; TAKAKI, G.M.C. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em caldo de abacaxi (*Ananas comosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remoção de derivado do petróleo. **Rede de Revistas Científicas de América Latina**, v. 8, n. 2, p. 201-210, 2010.

LUVIELMO, M.M.; SCAMPARINI, A.R.P. Goma xantana: Produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, p. 50-67, 2009.

LUVIELMO, M.M.; VENDRUSCOLO, C.T.; SCAMPARINI, A.R.P. Seleção de linhagens de *Xanthomonas campestris* para a produção de goma xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 161-172, 2007.

MALVESSI, E. **Produção de sorbitol e ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis***. 2008. 237 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre.

MESOMO, M.C. **Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio à base de soro de queijo**. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim.

MONTGOMERY, D.C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2004.

MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S.; GIL-TURNES, C.; VENDRUSCOLO, C.T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 469-474, 2001.

OLIVEIRA, M.R.; SILVA, R.S.S.F.; BUZATO, J.B.; CELLIGOI, M.A.P.C. Study of levam production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 177-183, 2007.

PAN, A.; MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, C.T. Efeito da concentração inicial do inóculo no crescimento celular e qualidade de biopolímeros de *Xanthomonas campestris* pv. pruni cepa 06. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, n 3, p. 273-277, 2000.

PRASANNA, P.H.P.; BELL, A.; GRANDISON, A.S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Emulsifying, rheological and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* subsp. Infantis CCUG 52486 and *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 533-540, 2012.

PRIETO, L. M.; MICHELON, M.; BURKERT, J.F.M.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V. The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. **Chemosphere**, v. 71, p. 1781-1785, 2008.

REIS, E.C.; ALMEIDA, M.; CARDOSO, J.C.; PEREIRA, M.A.; OLIVEIRA, C.B.Z.; VENCESCAU, E.M.; DRUZIAN, J.I.; MARIANO, R.; PADILHA, F.F. Biopolymer synthesized by strains of *Xanthomonas* sp isolate from Brazil using biodiesel-waste. **Macromolecular Symposia**, v. 296, p. 347-353, 2010.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30-39, 2009.

STAUDT, A.K.; WOLFE, L.G.; SHROUT, J.D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v. 194, p. 197-206, 2012.

WEBER, A. **Estudo da síntese de frutooligossacarídeos por levanasacarase imobilizada em reator de coluna**. 2003. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas.

Artigo II:

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA GOMA XANTANA PRODUZIDA POR
Xanthomonas campestris pv *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 UTILIZANDO
DIFERENTES FONTES DE CARBONO**

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA GOMA XANTANA PRODUZIDA POR
Xanthomonas campestris pv *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 UTILIZANDO
DIFERENTES FONTES DE CARBONO**

RESUMO

Xantana é um biopolímero sintetizado pela bactéria *Xanthomonas campestris*, possuindo importantes propriedades reológicas e a capacidade de produzir soluções viscosas em baixas concentrações, além da estabilidade em altas temperaturas e importantes propriedades pseudoplásticas. Todas essas características fazem com que a goma xantana seja almejada nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e petrolíferas. Por outro lado, com a obrigatoriedade da adição de 5% do biodiesel ao diesel, aumenta cada vez mais a quantidade dos coprodutos gerados na produção do mesmo, como o glicerol residual. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o impacto do uso do glicerol residual (GR) em substituição total ou parcial da sacarose (S) utilizada como fonte de carbono no meio de cultivo convencional, verificando os efeitos em algumas propriedades reológicas, térmicas e de emulsificação da goma xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230. Os cultivos para obtenção da goma foram realizados em triplicata, em frascos agitados a 28°C, 200 rpm por 48 h, utilizando como fontes de carbono S, GR e uma mistura de ambas (SGR) na proporção de 1:1 m/m. O polímero foi obtida por centrifugação do meio, adição de etanol (1:4 v/v) para precipitação, repouso por 24 h, nova centrifugação e secagem em estufa a 50°C até massa constante. A viscosidade aparente, bem como o índice de emulsificação (IE₂₄) foram determinados em suspensões contendo 5% m/v da xantana produzida com as três diferentes fontes de carbono, utilizando para o IE₂₄ diferentes óleos vegetais. O comportamento térmico foi analisado por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). O comportamento reológico foi similar para as xantanas produzidas nos diferentes meios, entretanto a viscosidade inicial foi maior com o meio S (637 cP), seguido de SGR (279 cP) e GR (60 cP). O IE₂₄ foi superior quando utilizado o óleo de milho, atingindo valores de 97, 72 e 64% em S, SGR e GR, respectivamente. Desta forma, pode-se afirmar que a mudança na fonte de carbono afetou estas propriedades.

Palavras-chaves: glicerol residual, goma xantana, *Xanthomonas campestris*

1. INTRODUÇÃO

A bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* é responsável pela produção da goma xantana (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009). De acordo com *Food and Drugs Administration* (FDA), dos Estados Unidos, e com a legislação brasileira, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1999), a goma xantana sintetizada por *Xanthomonas campestris* é aprovada para o uso alimentar.

Essa bactéria é excepcional na produção de significativas quantidades deste exopolissacarídeo (EPS), não produzindo outros polímeros, podendo assim alcançar conversões muito elevadas de xantana (FREITAS, ALVES; REIS, 2011). É facilmente cultivada em laboratório, por ser aeróbica e microaerófila, com temperatura ótima de crescimento entre 25-30°C. Possui crescimento rápido, produzindo turbidez no meio com 2-3 dias de cultivo (DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007) e um pH ótimo entre 6,0 e 8,0 (DONOT et al., 2012).

Xantana ocupa um lugar de destaque por suas propriedades reológicas diferentes dos outros biopolímeros microbianos, tais como um elevado grau de pseudoplasticidade, viscosidade elevada mesmo em baixas concentrações, solubilidade e estabilidade em soluções ácidas e alcalinas, resistência à degradação em elevadas temperaturas e em diferentes níveis de pH (FARIA et al., 2011). Sendo assim, sua aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica e petroquímica é de extrema importância (MESOMO, 2007).

Por outro lado, de acordo com o PNPB (2012), a Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005 estabeleceu a obrigatoriedade da mistura do biodiesel ao diesel. O glicerol é o principal coproduto gerado na produção do biodiesel, sendo aproveitado em vários setores industriais. Entretanto, com o crescimento do mercado, o glicerol residual tem sido gerado em proporções maiores que a demanda. Desta forma, a produção deste biocombustível em larga escala pode se tornar um problema em relação à disposição dos coprodutos gerados (SILVEIRA, 2007).

Por outro lado, têm sido relatados estudos que visam à utilização de outras fontes de carbono na produção de goma xantana, em substituição à sacarose em geral utilizada, tais como soro de leite (MESOMO et al., 2009) e glicerol (REIS et al., 2010). Entretanto, é necessário verificar se a substituição da fonte de carbono pode implicar em mudanças nas propriedades do EPS produzido.

Neste contexto, este trabalho objetiva avaliar a influência do uso de GR em substituição total ou parcial da S utilizada como fonte de carbono no meio de cultivo convencional, verificando os efeitos em algumas propriedades reológicas, térmicas e de

emulsificação da xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Micro-organismo

A bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 foi obtida a partir da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF) ã Campinas ã SP, Brasil.

2.1.2 Glicerol residual

O glicerol residual proveniente da obtenção de biodiesel a partir do óleo de soja por via metanólica foi fornecido pela empresa BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A (Passo Fundo-RS). O glicerol residual continha 81,92% (m/m) de pureza, de acordo com laudo fornecido pela própria empresa, sendo que a quantidade adicionada na elaboração dos meios levou em conta sua composição, a fim de resultar na concentração desejada do substrato.

2.2 Métodos

2.2.1 Re-hidratação da bactéria *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230

A cultura acondicionada em ampola de vidro foi rompida em condições assépticas. Foi adicionado, na ampola, 5 gotas do Caldo Nutriente, contendo (g.L⁻¹): 5 peptona; 5 NaCl; 1,5 extrato de carne; 1,5 extrato de levedura, sendo após incubada em estufa (Quimis Q-316 M2, Brasil) a 28°C durante 60 min. Transcorrido esse tempo, a suspensão foi transferida para placas de Petri contendo meio Ágar Nutriente e novamente incubadas a 28°C por 48 h (IBSBF, 2013).

2.2.2 Manutenção da Cultura

A partir da cultura re-hidratada foram realizados repiques sucessivos, sendo utilizado o meio YM (*Yeast Malt*), composto por (g.L⁻¹): 3 extrato de levedura; 3 extrato de malte; 5 peptona; 20 glicose; 10 ágar; pH 7,2 (MESOMO, 2007). A bactéria foi incubada em estufa (Quimis Q-316 M2, Brasil) com temperatura controlada (28°C) por 48 h. A cepa foi mantida refrigerada, sendo realizados repiques mensais.

2.2.3 Preparo do Inóculo

O inóculo foi preparado partindo de um tubo contendo a cultura microbiana reativada, sendo raspada com 10 mL água peptonada 0,1 %, a fim de resultar em uma suspensão de células. Esta foi transferida para 90 mL de meio apropriado contido em frasco Erlenmeyer de 500 mL. Os frascos foram mantidos em incubadora refrigerada com agitação orbital (Tecnal TE-424, Brasil) a 28°C e 150 rpm, até atingir a densidade ótica (DO_{560nm}) recomendada (2,0).

2.2.4 Cultivos em frascos agitados

Foram realizados cultivos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, com volume de inóculo (10 mL), correspondente a 10% do volume total, sendo transferido para 90 mL de meio de cultivo, a fim de totalizar 100 mL de meio. Os frascos foram mantidos em incubadora refrigerada com agitação orbital (Tecnal TE-424, Brasil) na temperatura de 28°C e 200 rpm de agitação durante 48 h.

Nesta etapa, foi utilizado o meio de produção composto por (g.L⁻¹): 50 fonte de carbono; 2,5 (NH₄)H₂PO₄; 5,0 K₂HPO₄; 0,006 H₃BO₃; 2 (NH₄)₂SO₄; 0,0024 FeCl₃; 0,002 CaCl₂.2H₂O; 0,002 ZnSO₄; pH 7,0. Como fontes de carbono foram testadas S, GR (considerando sua composição a fim de resultar na concentração desejada do substrato) e uma mistura de ambas (na proporção de 1:1 m/m, totalizando a concentração indicada), como sugerido por Reis et al. (2010), já que a sacarose é a fonte de carbono usual na produção da xantana.

2.2.5 Recuperação da xantana

A recuperação do EPS do meio de cultivo foi realizada através da centrifugação (Cientec CT-5000R, Brasil) do meio a 3400 x g por 30 min a 4°C, para remoção de células, seguido de precipitação do EPS pela adição de etanol 96,4 °GL (1:4 v/v), repouso por 24 h a 4°C, sendo novamente centrifugado por 30 min, sob refrigeração (4°C). A secagem foi realizada em estufa com circulação forçada de ar (Quimis Q314M242, Brasil) a 50°C até massa constante, relacionando ao volume de amostra (MESOMO, 2007).

2.2.6 Solubilização das amostras

Para o preparo das amostras tanto para determinação da viscosidade quanto para atividade emulsificante, foi realizado o procedimento de acordo com Xuewu et al. (1996), onde o EPS foi diluído, na concentração de 5 % m/v, em água destilada, agitado por 2 h, seguido de aquecimento a 60°C por 20 min.

2.2.7 Determinação da viscosidade

Para determinação da viscosidade da xantana produzida, as amostras foram solubilizadas de acordo com o item 2.2.6, e mantidas na temperatura ambiente por 24 h. Foi utilizado um reômetro digital Brookfield (Estados Unidos), acoplado a um banho-maria a 25°C, com adaptador para pequenas amostras, determinando-se as curvas de viscosidade aparente (cP) em função da taxa de cisalhamento (s^{-1}). As leituras foram realizadas em intervalos de 15 s e a taxa de cisalhamento variou de 5 a 100 s^{-1} . O *spindle* escolhido foi CP51.

2.2.8 Índice de emulsificação

O índice de emulsificação (IE₂₄) foi determinado para os biopolímeros produzidos com as diferentes fontes de carbono (S, SGR e GR), usando como referência a goma arábica comercial, baseando-se no método de Cooper; Goldemberg (1987). Foram utilizados diferentes óleos vegetais: milho, girassol, soja, canola e azeite de oliva. A suspensão de goma (5% m/v) e cada óleo foram adicionados na proporção de 2:3 v/v, em tubos de ensaio com

rosca, e logo após os tubos foram agitados em vórtex durante 2 min. Após 24 h de repouso, foi medida a altura da camada emulsionada e a altura total da camada líquida.

O IE₂₄ foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$IE_{24} = \frac{\text{altura camada emulsionada}}{\text{altura total}} .100\% \quad (1)$$

2.2.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para o estudo das propriedades térmicas, foi realizada a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

As curvas de DSC foram obtidas no equipamento Shimadzu DSC-60 (Japão), sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL.min⁻¹, utilizando uma taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹, com variação da temperatura de 40 a 25 °C, com suporte de alumínio hermético, sendo pesadas de 3-5 mg de amostra.

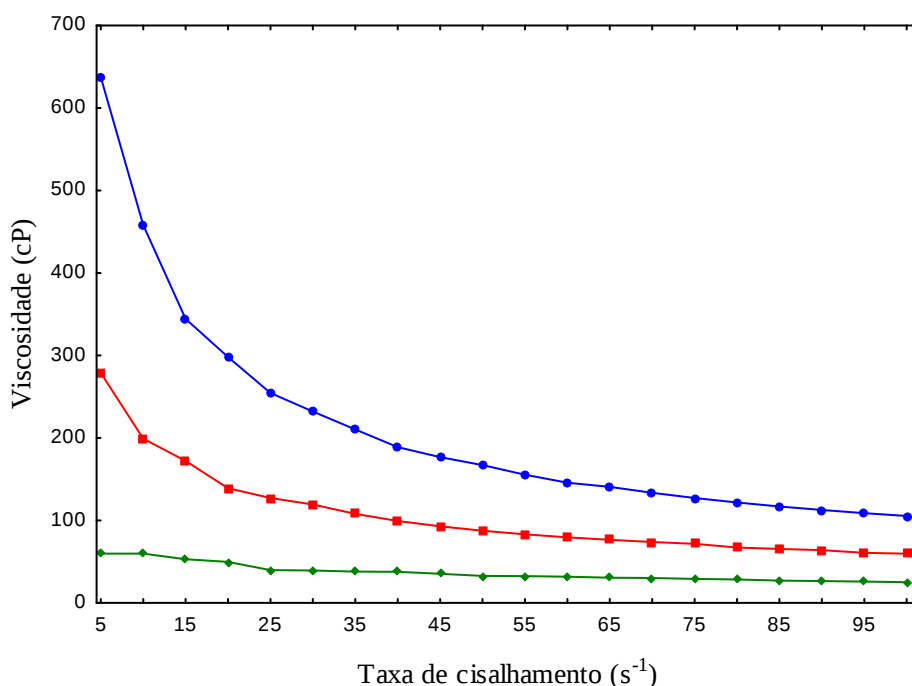
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da viscosidade

As propriedades reológicas das gomas influenciam diretamente no processamento, aplicação e até mesmo nos projetos de equipamentos (MESOMO, 2007). Para verificar a qualidade do biopolímero sintetizado quando S, GR e SGR foram utilizados como fonte de carbono, foi determinada a viscosidade em uma solução aquosa a 5 % (m/v).

A figura 1 apresenta o comportamento da viscosidade aparente (cP) em função da taxa de cisalhamento (s⁻¹) para as gomas produzidas por *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 com as diferentes fontes de carbono utilizadas.

Figura 1 - Viscosidade da xantana (solução aquosa 5% m/v) produzida por *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230. (X) S, (Ω) SGR e (κ) GR.



De acordo com a figura 1, quando compara-se a viscosidade aparente das gomas sintetizadas com as diferentes fontes de carbono, pode-se perceber que uma maior viscosidade inicial foi encontrada para bactéria *X. campestris* quando utilizada S como fonte de carbono (637 cP), seguido de SGR (279 cP) e GR (60 cP).

O comportamento pseudoplástico foi demonstrado pela diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009; MESOMO, 2007), mas foi menos evidenciado para GR.

Reis et al. (2010) compararam a viscosidade aparente de biopolímeros produzidos por *Xanthomonas* sp C1 e C9 tendo S, GR e SGR como fontes de carbono, utilizando soluções aquosas 3 % a 25°C e 0,257 s⁻¹. Como resultados, foram encontrados valores para viscosidade inicial de 941, 143 e 140 cP, respectivamente, para S, SGR e GR, quando utilizado a *Xanthomonas* sp C1. No mesmo trabalho, os autores verificaram um comportamento diferente com a goma produzida por *Xanthomonas* sp C9, com um maior valor de viscosidade encontrado ao utilizar SGR (aproximadamente 93 cP) do que S (aproximadamente 40 cP) nas mesmas condições anteriores.

As propriedades reológicas dos polissacarídeos dependem da concentração da solução aquosa, da massa molecular, bem como do processo de produção do EPS, como meio de composição, pH e temperatura (REIS et al., 2010).

3.2 Índice de Emulsificação (IE₂₄)

Na tabela 1 estão representados os resultados da capacidade emulsificante da goma xantana em formar e estabilizar emulsões em 24 h, utilizando o óleo de soja, canola, girassol, milho, azeite de oliva, comparando com a goma arábica comercial na mesma concentração.

Tabela 1 - IE₂₄ para goma xantana sintetizada com diferentes fontes de carbono e para goma arábica (comercial)

Óleo vegetal	Goma xantana			Goma arábica (comercial)
	S	SGR	GR	
Soja	11,1 ± 0,1 ^{b,D}	5,6 ± 0,1 ^{d,E}	8,3 ± 0,2 ^{c,E}	73,1 ± 1,4 ^{a,A}
Canola	52,9 ± 0,0 ^{c,C}	61,8 ± 1,1 ^{a,B}	58,0 ± 1,3 ^{b,B}	20,8 ± 2,3 ^{d,E}
Girassol	56,4 ± 0,4 ^{a,B}	53,0 ± 0,13 ^{b,C}	46,5 ± 0,3 ^{c,C}	27,6 ± 0,5 ^{d,C}
Milho	96,8 ± 0,2 ^{a,A}	71,6 ± 1,7 ^{b,A}	64,1 ± 1,1 ^{c,A}	24,2 ± 0,0 ^{d,D}
Oliva	11,3 ± 0,1 ^{b,D}	6,4 ± 0,2 ^{d,D}	8,5 ± 0,2 ^{c,D}	66,3 ± 2,9 ^{a,B}

*Letras minúsculas diferentes para um mesmo óleo indicam que há diferença significativa entre as fontes de carbono a 95% de confiança (p<0,05). Letras maiúsculas diferentes para uma mesma fonte de carbono indicam que há diferença significativa entre os óleos a 95% de confiança (p<0,05).

De acordo com a tabela 2 pode-se perceber que o IE₂₄ para o óleo de milho foi maior quando a goma com S como fonte de carbono foi utilizada, sendo este 96,8%, seguido da goma SGR (71,6%) e GR (64,1%), sendo que para a goma arábica comercial foi de apenas 24,2 %. Um comportamento similar foi observado para o óleo de girassol, com IE₂₄ de 56,4% para S, diferindo significativamente quando utilizado SGR e GR como fonte de carbono, sendo encontrado para goma arábica neste mesmo óleo apenas 27,6%.

O óleo de canola apresentou um maior IE₂₄ quando a mistura SGR foi utilizada como fonte de carbono (61,8%), seguido por GR (58,0%) e S (52,9%), e por último a goma arábica comercial (20,8%).

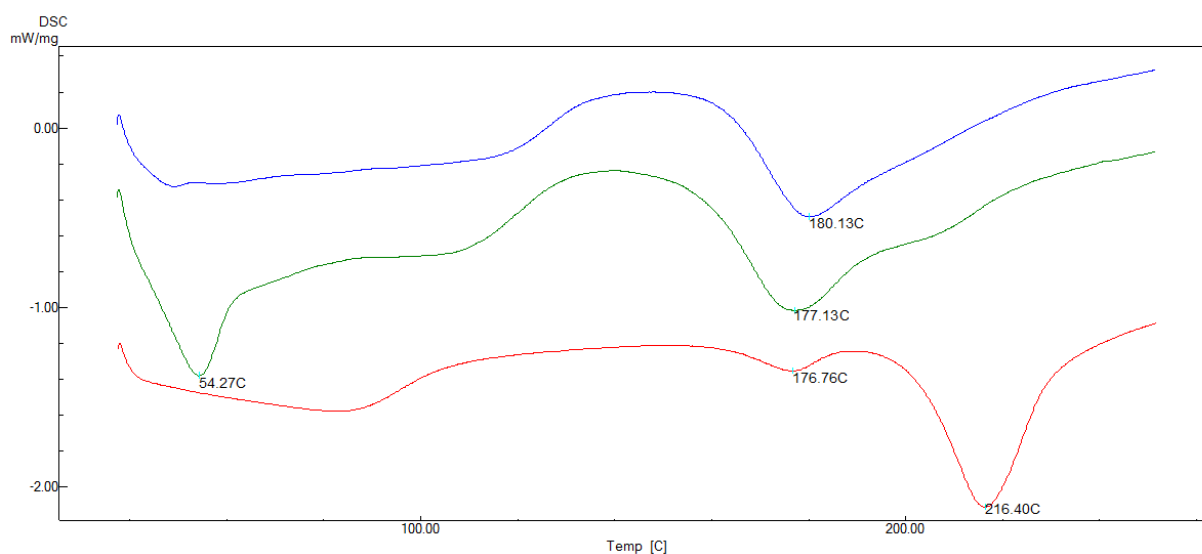
Quando avaliado o azeite de oliva, o comportamento foi bem diferente em relação aos outros óleos, sendo um maior IE₂₄ encontrado com a utilização da goma arábica comercial (66,3%).

Iyer, Mody; Jha, (2006) investigaram o EPS produzido pela bactéria *Enterobacter cloacae* em óleo de parafina, algodão, coco, jojoba, amendoim e girassol, com concentração de 1 g.L^{-1} e encontraram um IE_{24} para os óleos de parafina, coco e algodão de 60%, para o óleo de jojoba 65%, girassol 75%, sendo o maior IE_{24} encontrado para o óleo de amendoim (95%). Avaliaram também o IE_{24} nas mesmas concentrações, para as gomas comerciais xantana e arábica, encontrando 33 e 61%, respectivamente.

3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A figura 2 apresenta a análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para as gomas xantana produzidas com S, SGR e GR como fontes de carbono.

Figura 2 ã Resultados DSC para xantanas produzidas utilizando (-) S, (-) SGR e (-) GR como fontes de carbono



Como pode ser observado na figura 2, as curvas DSC obtidas apresentaram perfis diferenciados. Para as xantanas produzidas com SGR e GR, picos endotérmicos muito similares foram observados (180,13°C e 177,13°C, respectivamente), e possivelmente associados ao ponto de fusão das amostras. Entretanto, para a goma xantana produzida com S, observou-se um pequeno pico endotérmico em 176,76°C e um pico maior quando atingiu-se a temperatura de 216,40°C, indicando uma possível mudança na estrutura do polissacarídeo com a mudança na fonte de carbono. Marques et al. (2012) encontraram para goma xantana produzida utilizando a sacarose como fonte de carbono uma

temperatura de fusão de 162°C, enquanto que Calcagno et al. (2013) observaram, na análise térmica de diferentes filmes de EVA-xantana comercial, dois picos endotérmicos na faixa de 170-178°C e 190-231°C atribuídos à xantana. Almeida (2010), com xantana produzida com sacarose, verificaram um pico endotérmico duplo ao redor de 200°C que não foi observado para xantanas produzidas com resíduos provenientes de camarão e de ostras.

Ao avaliar a goma produzida com GR pode-se perceber ainda um pico na temperatura de 54,27°C, que pode ter sido ocasionado por algum contaminante termolábil, já que o glicerol utilizado é um coproduto proveniente do biodiesel.

4. CONCLUSÃO

As xantanas produzidas por *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 utilizando diferentes fontes de carbono (S, SGR e GR) apresentaram distintas curvas DSC, distintas viscosidades aparentes de suspensões a 5% m/v, bem como quanto à formação de emulsões com diferentes óleos vegetais, indicando que a mudança na fonte de carbono afeta estas propriedades, fato provavelmente associado a mudanças estruturais dos EPSs sintetizados. Desta forma, pode-se afirmar que a substituição total ou parcial de S por GR é possível, entretanto esta substituição deve ser considerada com cautela, pois influi nas propriedades diretamente ligadas à aplicação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M.S. **Avaliação e caracterização da goma xantana sintetizada a partir de resíduos aquícolas e de glicerol como fonte de carbono**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, Aracaju.

ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução nº 386. **Diário Oficial da União**. Brasília, 05 de ago. 1999. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/386_99.htm. Acesso em: 01 de mar de 2014.

CALCAGNO, C.I.W.; BALTEZAN, F.S.; MARQUES, J.C. VENDRUSCULO, C.T.; SALLES, C.A. **Propriedades mecânicas e térmicas de EVA/xantana e a influência do estiramento à temperatura ambiente**. In: 12º Congresso Brasileiro de Polímeros. Florianópolis, 2013.

COOPER, D.G; GOLDEMBERG, B.G. Surface active agents of two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p 224-229, 1987.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J.C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951-962, 2012.

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

FARIA, S. **Otimização da produção e caracterização de goma xantana empregando caldo de cana**. 2009. 162f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia.

FARIA, S.; PETKOWICS, C. L.; MORAIS, S.; HERNANDEZ-TERRONES, M.G. ; RESENDE, M. M. ; FRANCA, F. P. ; CARDOSO, V. L. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 469-476, 2011.

FDA - FOOD & DRUG ADMINISTRATION. **Food additives permitted in food for human consumption: Xanthan gum**. Federal Register, Washington, v. 34, n. 53, pt 121, p. 5376, 1969.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; REIS, M.A.M. Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 388-398, 2011.

IBSBF - **Coleção de Cultura de Fitobactérias do Instituto Biológico**. Instruções para re-hidratação das culturas. Campinas, São Paulo, 2013.

IYER, A.; MODY, K.; JHA, B. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 220-222, 2006.

LUVIELMO, M.M.; SCAMPARINI, A.R.P. Goma xantana: Produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, p. 50-67, 2009.

MARQUES, J.C.; SILVA, A.T.; CALAGNO, C.I.W.; SALLES, C.A. **Propriedades térmicas do biopolímero xantana**. In: 13ª Mostra de Pesquisa, Ensino e Extensão. Porto Alegre, 2012.

MESOMO, M.C. **Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio à base de soro de queijo**. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim.

MESOMO, M.; SILVA, M.F.; BONI, G.; PADILHA, F.F.; MAZUTTI, M.; MOSSI, A.; OLIVEIRA, D.; CANSIAN, R.L.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* from cheese whey: Production optimisation and rheological characterisation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 2440-2445, 2009.

PNPB, Biodiesel: **Programa nacional de produção e uso do biodiesel**. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/pnpb.html>>. Acesso em 27 de setembro de 2012.

REIS, E.C.; ALMEIDA, M.; CARDOSO, J.C.; PEREIRA, M.A.; OLIVEIRA, C.B.Z.; VENCESCAU, E.M.; DRUZIAN, J.I.; MARIANO, R.; PADILHA, F.F. Biopolymer synthesized by strains of *Xanthomonas* sp isolate from Brazil using biodiesel-waste. **Macromolecular Symposia**, v. 296, p. 347-353, 2010.

SILVEIRA, L. **Glicerina gerada na produção do biodiesel terá novos usos**. 2007. Biodieselbr online. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>>. Acesso em 05 de janeiro de 2014.

STEFFE, J.F. **Rheological methods in food process engineering**. Estados Unidos da América, 1996.

XUEWU; Z.; XIN, L.; DEXIANG, G.; WEI; Z.; TONG, X; YONGHONG, M. Rheological models for xanthan gum. **Journal of Food Engineering**, v. 27, p. 203-209, 1996.

CAPÍTULO IV:
CONCLUSÕES GERAIS

4. CONCLUSÕES GERAIS

Ao comparar as bactérias *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, *P. oleovorans* NRRL B-14683, *S. capsulata* NRRL B-4261 e *Z. mobilis* NRRL B-4286, todas foram capazes de crescer e produzir EPSs em 48 h de cultivo, em meio contendo somente GR como fonte de carbono. As bactérias *X. campestris* e *P. oleovorans* foram capazes de produzir iguais ou maiores concentrações de EPSs quando utilizado o GR em relação a S e SGR, não havendo uma relação definida entre concentração de biomassa e produção de EPSs. Desta forma, foi demonstrado que o GR pode ser utilizado como fonte de carbono, em substituição à S, no cultivo das bactérias produtoras de EPSs.

As xantanas produzidas por *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 utilizando diferentes fontes de carbono (S, SGR e GR) apresentaram características reológicas distintas quanto à viscosidade aparente, bem como quanto à formação de emulsões com diferentes óleos vegetais (utilizando suspensões de 5%) e quanto aos perfis das curvas DSC, indicando que a mudança na fonte de carbono afeta as propriedades das gomas, fato provavelmente associado a mudanças estruturais dos EPSs sintetizados. Desta forma, pode-se afirmar que a substituição total ou parcial de S por GR é possível, entretanto, influi nas propriedades diretamente ligadas à aplicação.

CAPÍTULO V:
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliar diferentes técnicas para precipitação dos EPSs, a fim de selecionar a melhor para cada bactéria;
- ✓ Otimizar o meio de cultivo para cada bactéria, variando a concentração dos micro e macronutrientes;
- ✓ Avaliar a produção dos EPSs utilizando outros coprodutos;
- ✓ Determinar a massa molecular bem como a composição dos constituintes dos EPSs;
- ✓ Ampliar a escala em biorreator de bancada, estudando os efeitos da agitação, aeração, bem como pH e temperatura.

CAPÍTULO VI:
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, S.; TURON, X. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 733-740, 2012.

ALMEIDA, M.S. **Avaliação e caracterização da goma xantana sintetizada a partir de resíduos aquícolas e de glicerol como fonte de carbono**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, Aracaju.

AMARAL, P.F.F.; FERREIRA, T.F.; FONTES, G.C.; COELHO, M.A.Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 179-186, 2009.

ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução nº 386. **Diário Oficial da União**. Brasília, 05 de ago. 1999. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/386_99.htm. Acesso em: 01 de mar de 2014.

AOAC, **Official Methods of Analysis** (17th edn). Washington: Association of Official Analytical Chemists, 2000. CD-ROM.

AROCKIASAMY, S.; BANIK, R.M. Optimization of gellan Gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 with nonionic surfactants using central composite design. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 3, p. 204-210, 2008.

BAJAJ, I. B.; SAUDAGAR, P.S.; SINGHAL, R.S.; PANDEY, A. Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, n. 3, p. 150-156, 2006.

BANIK, R.M.; SANTHIAGU, A.; UPADHYAY, S.N. Optimization of nutrients for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC-31461 in molasses based medium using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 792-797, 2007.

BERNAL, C.; COUTO, A.B.; BREVIGLIERI, S.T.; CAVALHEIRO, E.T.G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais-DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002

BERWANGER, A.L.S.; DOMINGUES, N.M.; VANZO, L.T.; LUCCIO, M.D.; TREICHEL, H.; PADILHA, F.F.; SCAMPARINI, A.R.P. Production and rheological characterization of

biopolymer of *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666 using conventional and industrial media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p. 942-950, 2006.

BERWANGER, A.L.S. **Produção e caracterização de um biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata***. 2005. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim.

BONOMI, A.; POÇO, J.G.; TRIELLI, M.A. Biocombustíveis: a solução brasileira para uma matriz energética sustentável. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 22, p. 16-21, 2006.

BOUÇAS, C. **Glicerina de biodiesel inunda mercado no país e derruba preços**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>> Acesso em: 12 set. 2013.

CALCAGNO, C.I.W.; BALTEZAN, F.S.; MARQUES, J.C. VENDRUSCULO, C.T.; SALLES, C.A. **Propriedades mecânicas e térmicas de EVA/xantana e a influência do estiramento à temperatura ambiente**. In: 12º Congresso Brasileiro de Polímeros. Florianópolis, 2013.

CANUTO, A.P. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba.

CHATZIFRAGKOU, A.; MAKRI, A.; BELKA, A.; BELLOU, S.; MAVROU, M.; MASTORIDOU, M.; MYSTRIOTI, P.; ONJARO, G.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**, v. 36, p. 1097-1108, 2011.

COOPER, D.G; GOLDENBERG, B.G. Surface active agents of two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.

DIAZ, P.S. **Avaliação comparativa das propriedades hidrodinâmicas de xantanas produzidas pelo pv. pruni e Clairana**. 2008. 105f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Agrícola) - Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas.

DIAZ, P.S. **Influência de parâmetros físicos e químicos e da adição de íons no comportamento reológico de gomas xantana**. 2002. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J.C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951-962, 2012.

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

EBB. **European Biodiesel Board**. Disponível em: <http://www.ebb-eu.org/biodiesel.php>. Acesso em 06 de maio de 2013.

ERNANDES, F.M.P.G.; CRUZ, C.H.G. Uso de caldo de cana-de-açúcar para produção de levana por *Zymomonas mobilis* CCT4494. **Ciência Agrotécnica**, v. 35, n. 2, p. 354-360, 2011.

FARIA, S. **Otimização da produção e caracterização de goma xantana empregando caldo de cana**. 2009. 162f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia.

FARIA, S.; PETKOWICS, C. L.; MORAIS, S.; HERNANDEZ-TERRONES, M.G.; RESENDE, M. M. ; FRANCA, F. P. ; CARDOSO, V. L. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p.469-476, 2011.

FDA - FOOD & DRUG ADMINISTRATION. **Food additives permitted in food for human consumption**: Federal Register, Washington, v. 34, n. 53, pt 121, p. 5376, 1969.

FERRARI, R.A.; OLIVERIA, V.S.; SCABIO, O.A. Biodiesel de soja - Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p.19-23, 2005.

FERRÉS, D.H.S. **Competitividade dos biocombustíveis no Brasil: Uma comparação entre os principais biocombustíveis - etanol e biodiesel**. 2010. 167 f. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) - Fundação Getúlio Vargas Escola de Economia (FGV/EESP), São Paulo.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. **Carbohydrates Polymers**, v. 78, p. 549-556, 2009.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; PAIS, J.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 297-305, 2010.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; REIS, M.A.M. Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 388-398, 2011.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GOMÉZ, E. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549-579, 2000.

HAYASHI, T.; FURUTA, Y.; FURUKAWA, K. Respiration-deficient mutants of *Zymomonas mobilis* show improved growth and ethanol fermentation under aerobic and high temperature conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 4, p. 414-419, 2011.

HILLIOU, L.; FREITAS, F.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M.; LESPINEUX, D.; GRANDFILS, C.; ALVES, V.D. Solution properties of an exopolysaccharide from a *Pseudomonas* strain obtained using glycerol as sole carbon source. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 526-532, 2009.

IBSBF - **Coleção de Cultura de Fitobactérias do Instituto Biológico**. Instruções para re-hidratação das culturas. Campinas, São Paulo, 2013.

IYER, A.; MODY, K.; JHA, B. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 220-222, 2006.

LEE, W-C.; HUANG, C-T. Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grown on the media containing glucose and fructose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 217-227, 2000.

LIMA, R.A.; ANDRADE, R.F.S.; SANTOS, L.Q.; TAKAKI, G.M.C. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em caldo de abacaxi (*Ananas comosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remoção de derivado do petróleo. **Rede de Revistas Científicas de América Latina**, v. 8, n. 2, p. 201-210, 2010.

LUVIELMO, M.M.; SCAMPARINI, A.R.P. Goma xantana: Produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, p. 50-67, 2009.

LUVIELMO, M.M.; VENDRUSCOLO, C.T.; SCAMPARINI, A.R.P. Seleção de linhagens de *Xanthomonas campestris* para a produção de goma xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n.2, p. 161-172, 2007.

MALVESSI, E. **Produção de sorbitol e ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis***. 2008. 237 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) ã Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre.

MARQUES, J.C.; SILVA, A.T.; CALAGNO, C.I.W.; SALLES, C.A. **Propriedades térmicas do biopolímero xantana**. In: 13ª Mostra de Pesquisa, Ensino e Extensão. Porto Alegre, 2012.

MEIRELLES, R.M. **Estudo da produção de frutose a partir de levana obtida da sacarose**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas.

MESOMO, M.C. **Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio à base de soro de queijo**. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim.

MESOMO, M.; SILVA, M.F.; BONI, G.; PADILHA, F.F.; MAZUTTI, M.; MOSSI, A.; OLIVEIRA, D.; CANSIAN, R.L.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* from cheese whey: Production optimisation and rheological characterisation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 2440-2445, 2009.

MONTGOMERY, D.C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2004.

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

MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S.; GIL-TURNES, C.; VENDRUSCOLO, C.T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 469-474, 2001.

MOTA, C.J.; SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L.C. Gliceroquímica: Novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009

NAVARRO, R.F. **Fundamentos de reologia de biopolímeros**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 1997.

OLIVEIRA, M.R.; SILVA, R.S.S.F.; BUZATO, J.B.; CELLIGOI, M.A.P.C. Study of levam production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 177-183, 2007.

PADILHA, F.F. **Produção de biopolímeros por microrganismos modificados geneticamente**. 2003. 96 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas.

PAN, A.; MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, C.T. Efeito da concentração inicial do inóculo no crescimento celular e qualidade de biopolímeros de *Xanthomonas campestris* pv. pruni cepa 06. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, n. 3, p. 273-277, 2000.

PNPB, Biodiesel: **Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel**. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/pnpb.html>>. Acesso em 27 de setembro de 2012.

PRASANNA, P.H.P.; BELL, A.; GRANDISON, A.S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Emulsifying, rheological and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CCUG 52486 and *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 533-540, 2012.

PRIETO, L.M.; MICHELON, M.; BURKERT, J.F.M.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V. The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. **Chemosphere**, v. 71, p. 1781-1785, 2008.

RAMOS, B.F.M. **Produção de goma xantana em água produzida na indústria de petróleo**. 2011. 51 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) ã Universidade Federal da Bahia, Salvador.

RAMOS, L.P.; COSTA NETO, P.R.; ROSSI, L.F.S.; ZAGONEL, G.F. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, p. 531-537, 2000.

REIS, E.C.; ALMEIDA, M.; CARDOSO, J.C.; PEREIRA, M.A.; OLIVEIRA, C.B.Z.; VENCESCAU, E.M.; DRUZIAN, J.I.; MARIANO, R.; PADILHA, F.F. Biopolymer synthesized by strains of *Xanthomonas* sp isolate from Brazil using biodiesel-waste. **Macromolecular Symposia**, v. 296, p. 347-353, 2010.

ROTTAVA, I.; BATESINI, G.; SILVA, M.F.; LERIN, L.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F.F.; TONIAZZO, G.; MOSSI, A.; CANSIAN, R.L.; LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 65-71, 2009.

SANTOS, A.P.B.; PINTO, A.C. Biodiesel: uma alternativa de combustível limpo. **Química Nova na Escola**, v. 31, n. 1, p. 58-62, 2009.

SELVERIO, G.A.; PENNA, A.L.B. Propriedades reológicas e efeito da adição de sal na viscosidade de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 895-899, 2010.

SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30-39, 2009.

SILVEIRA, L. **Glicerina gerada na produção do biodiesel terá novos usos**. 2007. Biodieselbr online. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>>. Acesso em 05 de janeiro de 2014.

STAUDT, A.K.; WOLFE, L.G.; SHROUT, J.D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v. 194, p. 197-206, 2012.

STEFFE, J.F. **Rheological methods in food process engineering**. Estados Unidos da América, 1996.

TALEBIAN-KIAKALAIEH, A.; AMIN, N. A. S.; MAZAHARI, H. A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. **Applied Energy**, v. 104, p. 683-710, 2013.

WEBER, A. **Estudo da síntese de frutooligossacarídeos por levanasacarase imobilizada em reator de coluna**. 2003. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas.

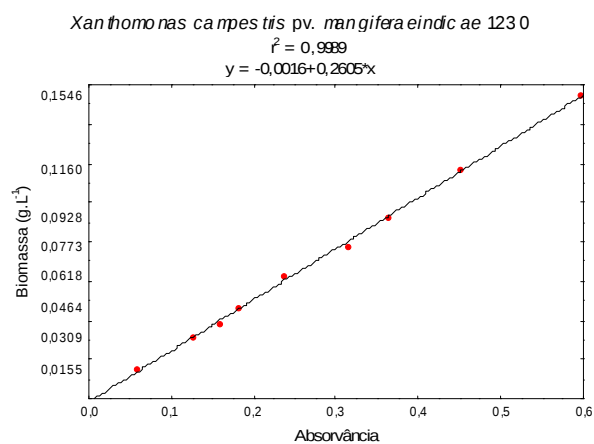
WEST, T. P.; STROHFUS, B. Effect of carbon source on exopolysaccharide production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. **Microbiology Research**, v. 153, p. 327-329, 1998.

XIAO, G.; ZHU, Y.; WANG, L.; YOU, Q.; HUO, P.; YOU, Y. Production and storage of edible film using gellan gum. **Procedia Environmental Sciences**, v. 8, p. 756 - 763, 2011.

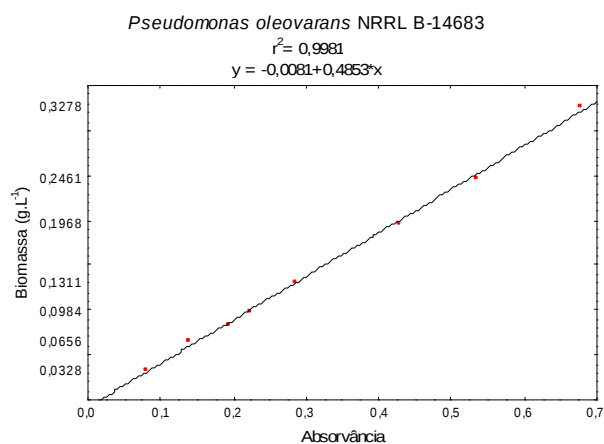
XUEWU; Z.; XIN, L.; DEXIANG, G.; WEI; Z.; TONG, X; YONGHONG, M. Rheological models for xanthan gum. **Journal of Food Engineering**, v. 27, p. 203-209, 1996.

APÊNDICE

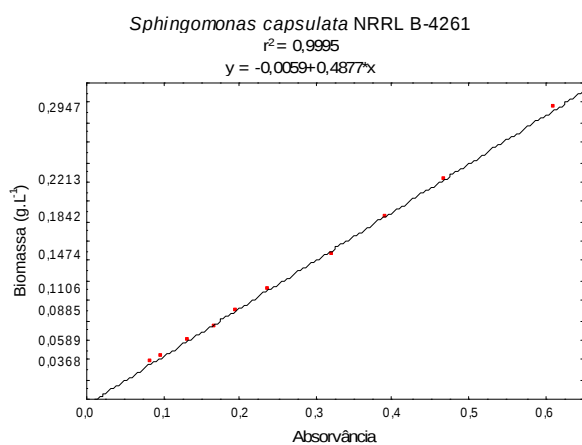
Figura 1 - Curva padrão de biomassa das bactérias (a) *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 1230; (b) *Pseudomonas oleovarans* NRRL B-14683; (c) *Sphingomonas capsulata* B-4261; (d) *Zymomonas mobilis* B-4286



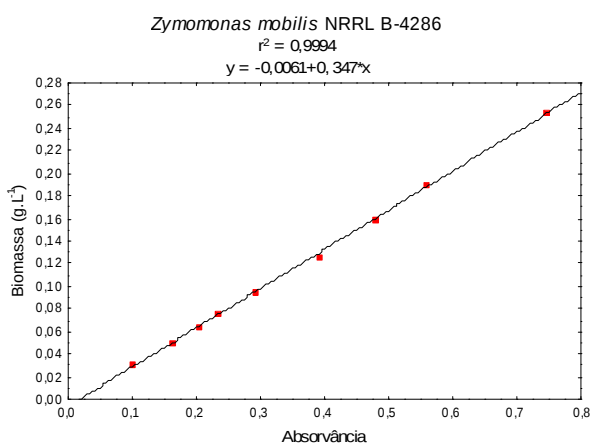
(a)



(b)



(c)



(d)