

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola



TESE

**Avaliação Comparativa das Propriedades
Hidrodinâmicas de Xantanas Produzidas
pelo pv pruni e Clairana**

Patrícia Silva Diaz

Pelotas, 2008

PATRÍCIA SILVA DIAZ

**Avaliação Comparativa das Propriedades
Hidrodinâmicas de Xantanas Produzidas pelo pv pruni
e Clairana**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia Agrícola da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Ciências (área de conhecimento:
Microbiologia Industrial e de Fermentações).**

**Orientador: Prof^a. Dra. Claire Tondo Vendruscolo
Co-orientadores: Prof. Dr. Ricardo Cunha Michel e
Dra. Rosana Fátima Teixeira Lomba.**

Pelotas, 2008

Dados de catalogação na fonte:

Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB-10/1032

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

D542a Diaz, Patrícia Silva

Avaliação comparativa das propriedades hidrodinâmicas de xantanas produzidas pelo pv pruni e clairana / **Patrícia Silva Diaz** ; orientador Claire Tondo Vendruscolo ; co-orientador Ricardo Cunha Michel e Rosana Fátima Teixeira Lomba. – Pelotas, 2009. – 104f. : il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2009.

1.Biotecnologia. 2.Polissacarídeos. 3.Xantana.
4.Viscosidade. 5.Espalhamento de luz. I.Vendruscolo, Claire Tondo. II.Michel, Ricardo Cunha. III.Lomba, Rosana Fátima Teixeira IV.Título.

CDD: 660.62

Banca Examinadora:

Professora Dra. Claire Tondo Vendruscolo

Departamento de Ciências de Alimentos e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Professora Dra. Angelita da Silveira Moreira

Departamento de Ciências de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Dr. João Luiz Silva Vendruscolo

Centro de Pesquisas Agropecuárias de Clima Temperado - Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA-CPACT-Pelotas/RS)

Dra. Léa Maria de Almeida Lopes

Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano (IMA), Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Dra. Rosana Fátima Teixeira Lomba

Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES), Petrobras.

Dr. André Leibsohn Martins

Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES), Petrobras.

Dedico este trabalho:

*Aos meus pais, José Sopena Diaz Filho (in
memoriam) e Ana Gladis Silva Diaz, por
constituírem a base de tudo em minha vida;*

*Aos meus irmãos, José, Marcelo e Hector,
pelo amor dedicado em todos os momentos.*

Agradecimentos

A Deus, que esteve à frente em todos os momentos;

À minha mãe, Ana Gladis Silva Diaz, pelo amor, carinho, apoio e dedicação de sempre, especialmente neste período;

Aos meus irmãos, José, Marcelo e Viviani, Hector e Cândida pela amizade, incentivo e carinho. Aos amados sobrinhos Helena e Lucas, pelo amor que faz renovar diariamente a alegria de viver;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade concedida. Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola Professor Dr. Odir Antônio Dellagostin, pela compreensão e amizade. A Professora Dra. Claire Tondo Vendruscolo pela amizade e orientação neste trabalho;

À Dra. Rosana Fátima Teixeira Lomba e ao Vítor Augusto de Rego M. P. de Lima, do Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES) da Petrobras, pela disponibilização para realização deste trabalho. Aos amigos Edimir, Kléber, Aline, Gabriel, Izabelle, Izabel, Mariana, Francileide, Sílvio, Alex, Hellen e Angelo, que sempre me auxiliaram no que foi preciso, com carinho e amizade;

Ao Instituto de Macromoléculas (IMA) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por oportunizar a continuidade de minha formação. À Professora Dra. Elizabete Fernandes Lucas e a Professora Dra. Cláudia Regina Elias Mansur, pela colaboração no empréstimo dos equipamentos necessários para o desenvolvimento desta Tese. Em especial, ao Professor Dr. Ricardo Cunha Michel, pelo acolhimento, disponibilização e ensinamentos transmitidos. As amigas Renata, Márcia, Luciana e Dalva, pelo auxílio nas atividades desenvolvidas e apoio;

Aos amigos do Centro de Biotecnologia, pelo incentivo diário, amizade e carinho, em especial a Caroline, Sabrina, Luciana, Rudah, Clarisse, Rutilene, Angela, Fabrício e Alegani.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Resumo

DIAZ, Patrícia Silva. **Avaliação Comparativa das Propriedades Hidrodinâmicas de Xantanas Produzidas pelo pv Pruni e Clairana**. 2007. 104f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O conhecimento sobre as propriedades dos biopolímeros é importante para prever futuras aplicações industriais, pois reflete sua estrutura química primária. Além disso, as características físicas e químicas dos biopolímeros microbianos são consequência do processo utilizado em sua síntese. O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização das propriedades dinâmicas de soluções dos biopolímeros xantana, sintetizada pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv pruni, e clairana, sintetizada pela bactéria *Beijerinckia* sp., em volume de 7L. As análises reológicas, o conteúdo dos grupos acetila e piruvato, o conteúdo de íons e a estabilidade térmica foram comparados com os resultados obtidos para uma amostra de xantana comercial. A amostra comercial apresentou propriedades reológicas superiores aos demais biopolímeros, devido a presença de íons divalentes em sua composição. Os resultados obtidos para o conteúdo de acetila e piruvato apresentaram-se compatíveis com os resultados apresentados na literatura. A análise térmica mostrou a presença de proteínas nas amostras de xantana do pv pruni e na clairana, o que não ocorreu na amostra comercial. O comportamento das propriedades hidrodinâmicas dos biopolímeros xantana (Xc06), clairana e tara, em função da concentração das soluções, foi analisado utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico. Os regimes de concentração das soluções foram definidos através da determinação das concentrações críticas c^* e c^{**} , aplicando-se duas metodologias. A primeira metodologia foi baseada no comportamento do coeficiente de difusão em função da concentração das soluções, propondo-se uma curva teórica para avaliar os resultados. Aplicando esta metodologia, foi possível determinar c^* e c^{**} para a xantana e a tara, mas não para a clairana, que apresentou curva irregular. Na segunda metodologia foram analisadas as curvas de distribuição dos tempos de relaxação (DTR) para as soluções de xantana e tara. Estas curvas apresentaram diferente número de modos de relaxação, sendo observado que as concentrações nas quais o número de modos sofreu modificação corresponderam às concentrações c^* e c^{**} , determinadas utilizando a metodologia anterior. Foram então obtidas as curvas de DTR para a clairana, sendo possível determinar as concentrações críticas, bem como os regimes de concentração. Através das curvas do coeficiente de correlação foram obtidas as distribuições de tamanho, os raios hidrodinâmicos e o índice de polidispersão. Os parâmetros analisados apresentaram dependência com relação à concentração das soluções. Conforme a concentração das soluções aquosas aumentou, a distribuição de tamanhos por intensidade passou de um comportamento monomodal para bimodal e trimodal. Este comportamento foi atribuído a presença de modos lentos de difusão translacional ocasionados pela formação de aglomerados de partículas. Estes aglomerados causaram variação nos valores do raio hidrodinâmico por apresentarem raio hidrodinâmico superior ao raio das partículas em solução diluída. O índice de polidispersão aumentou com o aumento da concentração das soluções, devido ao surgimento de novos picos, enquanto a largura dos picos de distribuição de tamanho diminuiu.

Palavras-chave: polissacarídeos, viscosidade, espalhamento de luz.

Abstract

DIAZ, Patrícia Silva. **Comparative Evaluation of Hydrodynamic Properties of the Xanthan Produced by pv Pruni and Clairana**. 2007. 104f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The knowledge on the biopolymers properties are important to predict his future industrial applications because reflects his chemical primary structure. Besides, the physical and chemical characteristics of the biopolymers are a consequence of the process used in his synthesis. The aim of this work was the study of the hydrodynamic properties of solution of biopolymers xanthan synthesized by *Xanthomonas arboricola* pv pruni, strains 06 and 82, and clairana FL, synthesized by *Beijerinckia* sp. strain 7070, in 7L fermentation volume. The results from rheological analysis, acetyl and piruvate content, ion content and thermal stability were compared with the ones obtained for commercial xanthan. The commercial xanthan is more efficient in the rheological properties due to divalent ion in their composition. The results for acetyl and piruvate content were in accordance with the literature. Thermal analysis showed presence of protein in the pv pruni xanthan's and in clairana, but not in commercial xanthan. Hydrodynamic properties behavior of xanthan (Xc06), clairana and tara gum, in various concentrations, was examined using dynamic light scattering. Concentration regimes were determined by critical concentrations c^* and c^{**} , applying two methods. The first method was based on diffusional coefficient behavior of a range of biopolymers concentrations. A theoretical curve was proposed for results evaluation. With this method, c^* and c^{**} were determined for xanthan and tara gum, but nor for clairana due to its non-regular behavior. Distribution curves of relaxation times (DTR) were the second method applied. Distribution curves for xanthan and tara gum presented different number of relaxation modes. The concentrations where the number of modes did change corresponds to the c^* and c^{**} , determined using the first method. So, the distribution curves of relaxation times were obtained for clairana and the critical concentrations determined. Size distribution, hydrodynamic radii and polydispersity index for different concentrations were obtained from the respective correlation curves. The parameters showed dependence with solution concentration. The size distribution changed from monomodal to bimodal and to trimodal due to the increase in solution concentration. This behavior was attributed to the slow motion in diffusion due to particle aggregation formation. This aggregation causes hydrodynamic radii variation because their radii are higher than the particle radius in dilute solution. The polydispersity index increases with concentration increment, due to the appearing new peaks, while the width of the peaks of size distribution decreases.

Key-words: polysaccharides, viscosity, light scattering.

Sumário

Agradecimentos	5
Resumo	6
Abstract	7
Sumário.....	8
1 Introdução	10
2 Revisão de Literatura	13
2.1 Xantana	13
2.1.2 Estrutura Química	14
2.1.2 Reologia das soluções de Xantana	19
2.2 Clairana	23
2.2.1 Produção de Clairana	23
2.2.2 Estrutura Química	25
2.2.3 Reologia das Soluções de Clairana	27
2.3 Tara	29
2.3.1 Estrutura química	29
2.3.2 Reologia das Soluções de Tara	30
3 Artigo 1 - Avaliação Comparativa das Propriedades de Xantanas Produzidas pelo pv Pruni e da Clairana com uma Amostra de Xantana Comercial	32
1 Introdução	33
2 Materiais e Métodos	34
2.1 Biopolímeros	34
2.2 Conteúdo de Acetila e Piruvato	34
2.3 Conteúdo de Íons	34
2.4 Análises Reológicas.....	34
2.5 Análise de viscosificante para fluido de perfuração	34
3 Resultados e Discussões.....	35
3.1 Conteúdo de Acetila e Piruvato.....	35
3.2 Conteúdo de Íons.....	36
3.3 Análises Reológicas.....	36
3.4 Análise de viscosificante para fluido de perfuração	38

4 Conclusão.....	39
5 Referências Bibliográficas.....	39
 4 Artigo 2 - Regimes dinâmicos de concentração de biopolímeros por espalhamento de luz dinâmico	42
1 Introdução	43
2 Materiais e Métodos	47
2.1 Biopolímeros	47
2.2 Preparo das Soluções	48
2.3 Espalhamento de Luz Dinâmico	49
3 Resultados e Discussões	49
3.1 Avaliação das Curvas dos Coeficientes de Difusão Translacional Médios	49
3.2 Avaliação das Curvas de Distribuição dos Tempos de Relaxação	58
4 Conclusão	62
5 Referências Bibliográficas	62
 5 Artigo 3 - Medidas do Raio Hidrodinâmico, Polidispersão e Distribuição de Tamanho de Xantana, Clairana e Tara por Espalhamento de Luz Dinâmico	69
1 Introdução	70
2 Materiais e Métodos	74
2.1 Biopolímeros	74
2.2 Preparo das Soluções	75
2.3 Espalhamento de Luz Dinâmico	76
3 Resultados e Discussões	76
4 Conclusão	87
5 Referências Bibliográficas	87
 6 Conclusão Geral	92
 7 Referências Bibliográficas	93

1 Introdução

O crescente interesse por polissacarídeos microbianos para aplicação científica e industrial deve-se a inúmeros fatores. Além de suas propriedades funcionais únicas, esses polissacarídeos podem ser produzidos sob condições controladas, em menor período de tempo, independentemente de condições climáticas e ecológicas, com garantia de qualidade do material, fornecimento constante. Apresentam ainda a possibilidade de manipulação de características químicas através de modificações nas condições do processo produtivo. Tais fatores têm acelerado o uso de gomas microbianas como a pululana, curdulana, dextrana e a xantana (SUTHERLAND, 2001; ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005).

A xantana tem provocado grande interesse científico e industrial desde sua descoberta. Somente em 1999, mais de 300 referências de artigos ou patentes com xantana foram listados no *Chemical Abstracts*. Desde 1990, mais de 2000 patentes foram listadas no *Derwent World Patents Index*. Esse interesse é devido às extraordinárias propriedades da xantana bem como ao sucesso estabelecido de um processo para sua produção (STEINBUCHEL; DOI, 2005).

Atualmente, a xantana é produzida comercialmente por várias companhias, como Monsanto/Kelco, Rhodia, Jungbunzlauer, Archer Daniels Midland, e SKW Biosystems. Do total de xantana produzido mundialmente, em torno de 65% é usado na indústria alimentícia, 15% na indústria petrolífera e 20% em aplicações técnicas (STEINBUCHEL; DOI, 2005). As aplicações industriais da xantana são como agente espessante, suspensivo, estabilizante, floculante e intumescedor (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002).

A xantana utilizada no Brasil não é produzida em âmbito nacional, dependendo exclusivamente de importações. Os países produtores têm os custos de produção relativamente altos devido à utilização de glicose ou sacarose como única fonte de carbono (YOO; HARCUM, 1999). No Brasil, o açúcar obtido da cana em conjunto com o etanol, necessário no processo pós-fermentativo, apresentam custos baixos. Além disso, a microflora brasileira é rica em microrganismos produtores de biopolímeros, ao contrário do que ocorre em países com pesquisas avançadas, onde

as condições climáticas são distintas do Brasil. Isso coloca nosso país como um potencial produtor industrial de biopolímeros competitivos no mercado internacional.

Considerando o exposto acima, o Laboratório de Biopolímeros do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas vem desenvolvendo pesquisas na produção, caracterização e aplicação de biopolímeros obtidos por fermentação, nomeadamente xantana e clairana. A xantana é produzida pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv pruni e possui pedido de patente registrado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI, 2006). A clairana é produzida pela bactéria *Beijerinckia* sp. Os estudos realizados por Souza e Vendruscolo (1999), Machado, Vendruscolo e Mattos (1999), Moreira *et al.* (2001), Antunes *et al.* (2003) e Borges e Vendruscolo (2007) objetivaram a seleção de cepas das bactérias *Xanthomonas arboricola* pv pruni e *Beijerinckia* sp, considerando a produtividade e viscosidade dos biopolímeros sintetizados. A otimização dos parâmetros de fermentação em escala de bancada, bem como a caracterização dos biopolímeros sintetizados pelas cepas selecionadas, foram a seqüência das pesquisas realizadas por Antunes *et al.* (2000), Pan, Moreira e Vendruscolo (2000), Moreira (2002), Pinto *et al.* (2002), Borges *et al.* (2004) e Borges (2007). Tais pesquisas comprovaram que a variação dos parâmetros de produção influenciam na produtividade e nas características físicas e químicas dos biopolímeros.

Na transposição de escala (*scale up*), para se chegar a volumes de fermentação industrial, fenômenos de transporte são fatores que mais afetam a biossíntese do biopolímero e, conseqüentemente, as propriedades do produto obtido. O conhecimento sobre as propriedades dos biopolímeros, principalmente a dinâmica é importante para futuras aplicações industriais, refletem sua estrutura química primária e servem para predizer em quais produtos e aplicações podem ser utilizados.

Hipótese

As propriedades dinâmicas dos biopolímeros microbianos xantana produzida pelo patovar pruni e a clairana apresentam similaridades.

Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo principal comparar as propriedades dinâmicas das soluções dos biopolímeros xantana, sintetizada pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv pruni, cepas 06 e 82, e clairana FL, sintetizada pela bactéria *Beijerinckia* sp cepa 7070.

Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar os biopolímeros xantana e clairana FL, sintetizados pelas bactérias *Xanthomonas arboricola* pv pruni cepas 06 e 82 e *Beijerinckia* sp cepa 7070, em volume de 7L utilizando biorreator de 10L, comparando com as propriedades físicas e químicas de uma amostra de xantana comercial de grau industrial;
- ✓ Acompanhar o comportamento dinâmico dos biopolímeros em solução, a fim de determinar os regimes dinâmicos de concentração através das concentrações críticas de sobreposição (c^*) e de agregação (c^{**});
- ✓ Verificar o efeito da concentração das soluções dos biopolímeros xantana, clairana e tara sobre o raio hidrodinâmico, índice de polidispersão e distribuição de tamanhos.

2 Revisão de Literatura

2.1 Xantana

As bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* são essencialmente fitopatogênicas, com exceção da *Xanthomonas maltophilia*, amplamente distribuídas e infectam mais de 240 gêneros. Muitos membros deste grupo são capazes de sintetizar eficientemente polissacarídeos, como a *X. fragariae*, *X. oryzae* e *X. campestris*. O patovar pruni é o causador da mancha bacteriana em espécies do gênero *Prunus* (CIVEROLO; HATTINGH, 1993), como o pessegueiro e ameixeira.

Xantana foi a denominação dada ao heteropolissacarídeo extracelular livre, produzido durante o processo de fermentação aeróbia de bactérias do gênero *Xanthomonas* (LILLY; WILSON; LEARCH, 1958). A xantana produzida em escala industrial é sintetizada pelo patovar *campestris*, mais especificamente a cepa NRRL B-1459 (SUTHERLAND, 2001).

Bactérias do gênero *Xanthomonas* apresentam-se como bastonetes retos e isolados, móveis por flagelo único polar, gram negativos e estritamente aeróbios. As colônias são usualmente amarelas, lisas e com aspecto mucóide. A morfologia e as colônias da bactéria *Xanthomonas* podem ser visualizadas na Figura 1.

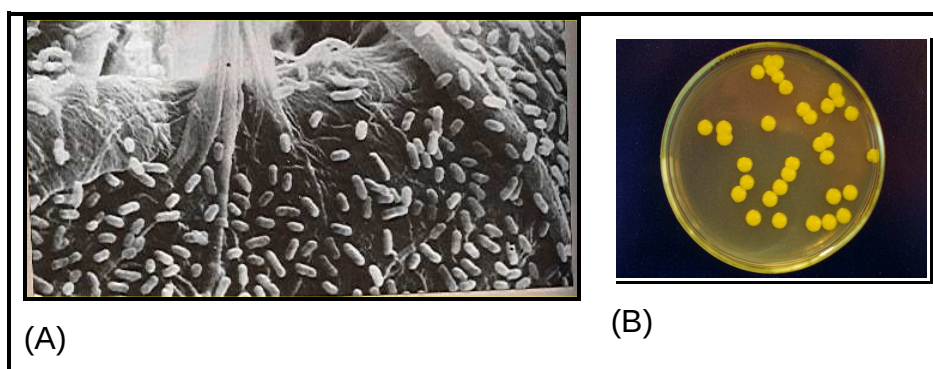


Figura 1 – (A) Morfologia da bactéria *Xanthomonas*. (B) Colônias isoladas de *Xanthomonas arboricola*.

A xantana foi descoberta em 1950 por pesquisadores da Northern Regional Research Laboratory, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, em um trabalho de seleção e identificação de microrganismos que produziam gomas solúveis de interesse comercial. As produções em escala comercial da xantana

iniciaram em 1960, e o primeiro produto disponível comercialmente ocorreu em 1964.

2.1.1 Estrutura Química

A estrutura química da xantana sintetizada por *Xanthomonas arboricola* pv pruni ainda não foi estudada. Entretanto, as análises da composição química realizadas por cromatografia em camada delgada comparativa por Moreira *et al.* (2001) mostraram que as xantanas oriundas do patovar pruni são compostas por glicose, manose e ácido glicurônico. Antunes *et al.* (2003) ainda verificaram a presença de ramnose.

A literatura apresenta a estrutura química da xantana sintetizada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv campestris, a qual é composta por D-glicose, D-manose e ácido D-glicurônico, apresentando ainda os grupos acetila e piruvato, como substituintes (JEANES; PITTSLEY; SENTI, 1961). A estrutura química primária da molécula é composta de repetidas unidades pentassacarídicas, sendo a cadeia principal composta de unidades de β -D-glicose ligadas na posição um e quatro, idêntica à cadeia de celulose. As unidades de manose estão ligadas na posição do C-3 e o ácido D-glicurônico ligado a manose terminal na posição 1 $\rightarrow$ 4, conforme Figura 2 (JANSSON; KENNE; LINDBERG, 1975).

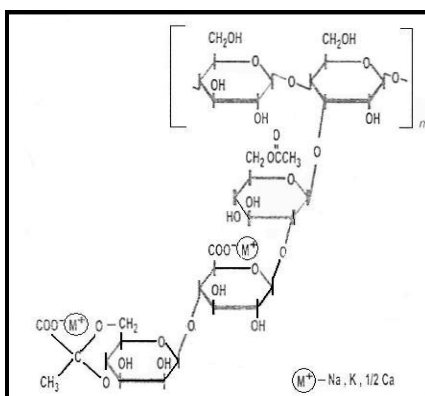


Figura 2 – Estrutura primária da molécula de xantana. Fonte: Pettitt, 1982.

A estrutura secundária ou conformação é ainda assunto de debate, sendo objeto de controvérsia há muito tempo. A partir de análises de cristalografia de raios-X, Moorhouse, Wilkinshaw e Arnott (1977) inicialmente postularam o modelo de

hélice simples, mas em um segundo artigo, esses dados foram combinados com a densidade da amostra, e o modelo de dupla hélice foi postulado, conforme Figura 3. Os autores sugeriram a estrutura em hélice onde os grupos laterais estão alinhados ao longo da hélice, estabilizando a conformação através de ligação hidrogênio, originando a rigidez da macromolécula. Entretanto, os dados de difração são insuficientes para definir a estrutura molecular precisamente.

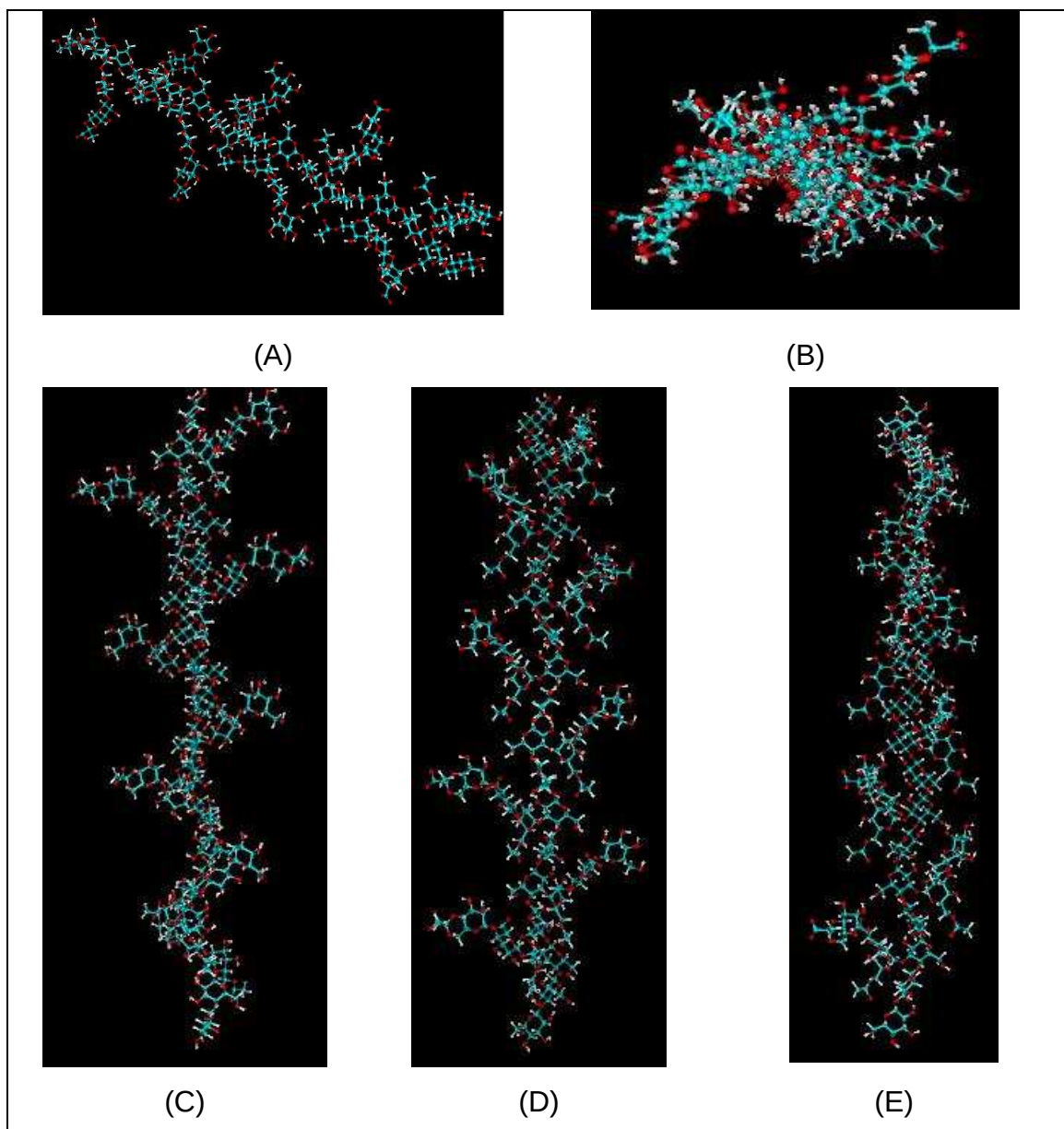


Figura 3 - Conformação em hélice da molécula de xantana. (A) vista perpendicular horizontal ao eixo da hélice; (B) vista por cima do eixo da hélice; (C), (D) e (E) vista perpendicular vertical ao eixo da hélice (girando a molécula vê-se os lados sob diferentes perspectivas). Fonte: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyxanh.html>, acessado em julho de 2007.

Há evidências de que a estrutura observada no estado sólido corresponde à conformação ordenada em solução (MORRIS *et al.*, 1977). Com experimentos de microscopia eletrônica, Holzwarth e Prestridge (1977) concluíram que múltiplas estruturas podem coexistir. Sutherland (2001) concluiu que a molécula de xantana pode existir na forma geométrica de simples, dupla ou tripla hélice.

Dados da literatura esclarecem que a molécula de xantana na forma de hélice simples ou dupla pode ser encontrada, porém, é dependente do tipo de amostra que está sendo utilizada, do tratamento pós-fermentativo aplicado (MULLER *et al.*, 1986) e das condições da solução (SATO; NORISUYE; FUJITA, 1984). A Figura 4 apresenta uma molécula de xantana em estado de dissolução parcial.

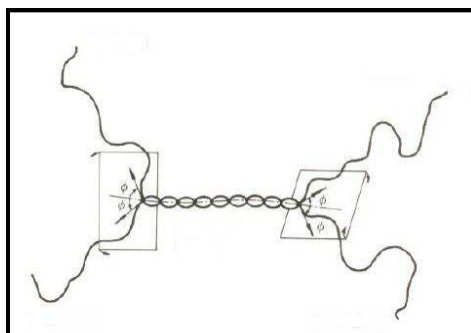


Figura 4 - Modelo da xantana em solução 0,01mol L⁻¹ de NaCl a 25°C, parcialmente dissolvida, dupla hélice. Fonte: Liu e Norisuye (1988).

No primeiro artigo sobre xantana Jeanes, Pittsley e Senti (1961) relataram o comportamento físico-químico da solução aquosa, evidenciando a transição conformacional. Isto é usualmente chamado de fusão de uma hélice, porém, ainda não está esclarecida a controvérsia de ser simples, dupla ou múltiplas.

A molécula de xantana passa por uma transição conformacional de ordenada para desordenada, a qual corresponde a modificações na força iônica, pH e temperatura da solução (MORRIS, 1995), e coincide com as mudanças na viscosidade (MORRIS *et al.*, 1977). A transição ordenada-desordenada não é afetada somente pela adição de sais, mas também pela densidade das cargas das cadeias laterais da molécula de xantana. Correlações entre os conteúdos de acetila e piruvato e a temperatura de transição foram estudadas (HOLZWARTH; OGLETREE, 1979; CALLET; MILAS; RINAUDO, 1987; SHATWELL *et al.*, 1990; SMITH *et al.*, 1981).

Rocheft e Middleman (1987) relataram que a molécula de xantana em solução aquosa ou de baixa força iônica, a 25°C, apresenta sua cadeia em uma conformação parcialmente desordenada mas altamente estendida devido às repulsões eletrostáticas das cargas das cadeias laterais. Na estrutura altamente estendida, as moléculas podem alinhar-se e associar-se (por ligações hidrogênio) para formar um material fracamente estruturado. Neste estado, com o aumento da temperatura, a transição total para conformação desordenada ocorre, causando a dissociação das moléculas e a subsequente mudança nas propriedades reológicas.

Quando sal é adicionado na solução a 25°C, a transição desordenada – ordenada ocorre. A cadeia principal toma a conformação de hélice e as laterais carregadas colapsam na cadeia principal devido aos efeitos da blindagem das cargas, estabilizando a conformação ordenada (MULLER *et al.*, 1986). Nesta conformação de bastão, com a blindagem das repulsões eletrostáticas, as moléculas estão facilmente alinhadas e fortemente associadas devido às ligações hidrogênio e interações iônicas, podendo deste modo formar estrutura semelhante a um gel. Na forma ordenada, quando a temperatura é elevada, a transição para a conformação desordenada ocorre em temperaturas mais altas (80°C – 100°C). Esta é a origem da estabilidade da viscosidade das soluções de xantana com a variação da temperatura (ROCHEFORT; MIDDLEMAN, 1987).

Rocheft e Middleman (1987) combinaram as idéias da transição conformacional da molécula de xantana com os argumentos relativos à estrutura de hélice única e dupla, e apresentaram duas possibilidades para explicar sobre o comportamento reológico extraordinário da molécula de xantana em concentrações moderadas:

A) Se a molécula é uma única hélice ou uma hélice parcialmente ordenada, dependendo da concentração de sal, existem interações intermoleculares fortes devido às ligações hidrogênio, interações iônicas e outras interações não covalentes, as quais conferem à solução um caráter similar ao de um gel em temperatura ambiente. A transição conformacional aparece com o aumento da temperatura e ocorre devido à modificação conformacional intramolecular relativa ao afastamento das cadeias laterais da cadeia principal, levando a uma forma

desordenada. Isto ocorre acompanhado por uma diminuição nas propriedades reológicas devido à dissociação das cadeias. Após resfriamento, as moléculas passam novamente por uma transição, desordenada-ordenada, recuperando sua conformação de hélice e reassociando-se aleatoriamente em um novo estado similar ao de gel.

B) Se a molécula está na forma de dupla hélice, foi proposto que passa por uma transição desta forma ordenada para um estado desnaturado e deste para um renaturado (HOLZWARTH; PRESTIDGE, 1977). A transição conformacional ocorre devido à dissociação da estrutura dupla (desnaturação), em altas temperaturas. Após resfriamento, as cadeias dissociadas reassociam-se na forma dupla (renaturação) com menor perfeição, isto é, com possibilidade de voltas e finais de cadeia não incorporados dentro da hélice. Este retorno é acompanhamento das propriedades reológicas originais. Esta hipótese foi baseada nas evidências obtidas por Besio *et al.* (1987), de que o material renaturado pode formar agregados maiores devido ao aumento das interações intermoleculares dos finais das cadeias que estão fora da hélice.

Lambert, Milas e Rinaudo (1985) relataram que a estrutura ordenada é particularmente estabilizada por cátions, enquanto que nas soluções diluídas, a redução da força iônica pode induzir a formação da estrutura desordenada. A transição é termicamente reversível e a estrutura retorna ao estado original após resfriamento (SWORN, 2000).

Consideráveis trabalhos foram empreendidos para determinar o tamanho e a forma da molécula de xantana durante os dois estados de transição (MORRIS, 1995). Whitcomb (1978) concluiu que a xantana adota a estrutura de um bastão rígido na forma ordenada. A mesma conclusão foi obtida por Sato, Norisuye e Fujita (1984) através de análise por espalhamento de luz.

A estrutura química da xantana ainda apresenta os substituintes acetila e piruvato. O teor destes grupos na molécula de xantana pode variar de acordo com a cepa, condições de fermentação e com os processos pós-fermentativos empregados para a recuperação do biopolímero (SLONEKER; JEANES, 1962). Variações na

proporção dos grupos acetila e piruvato podem afetar certas propriedades da xantana em solução, tais como, a temperatura de transição conformacional (HOLZWARTH; OGLETREE, 1979), a flexibilidade da cadeia e a capacidade de interações intermoleculares e intramoleculares (SMITH *et al.*, 1981).

A remoção dos substituintes piruvato aumenta a temperatura de transição conformacional (T_m) pela redução da repulsão eletrostática entre os segmentos da cadeia. O substituinte acetila, porém, parece contribuir para a estabilidade da estrutura ordenada e sua remoção diminui a temperatura de transição conformacional (SMITH *et al.*, 1981). Oposto ao efeito causado pela remoção do piruvato, as interações apolares dos grupos metila da acetila apresentam um efeito de estabilização (SHATWELL *et al.*, 1990).

Jeanes, Pittsley e Senti (1961) estudaram o efeito do piruvato nas associações intermoleculares de soluções de xantana e verificaram aumento na viscosidade da solução, em concentração moderada e adição de KCl ($10,0\text{g.L}^{-1}$), porém, somente quando o grau de substituição por piruvato foi maior que $\sim 0,31\%$. Ainda detectaram que a concentração de sobreposição foi diminuída com o aumento do grau de piruvato.

Tako e Nakamura (1985) estudaram a xantana comercial nos estados natural e desacetilada. Observaram que a amostra desacetilada apresentou as propriedades viscoelásticas superiores, em altas concentrações, porém, estas diminuíram com o aumento da temperatura.

No estudo realizado por Bradshaw *et al.* (1983) foi observado que a viscosidade não apresentou variação entre os diferentes conteúdos de acetila e piruvato de uma mesma amostra de xantana comercial.

2.1.2 Reologia das Soluções de Xantana

A reologia objetiva a medida das propriedades dos materiais que controlam sua deformação e o comportamento do fluxo, quando submetidos a uma força externa; isto é, as relações entre tensão, deformação e tempo (GUNASEKARAN; AK, 2003). A operação fundamental em todos os testes reológicos é aplicar uma força no material sob investigação e medir sua deformação ou, equivalentemente, aplicar uma deformação e medir sua resistência (MORRIS, 1995).

As análises reológicas, mais especificamente as análises de viscosidade e viscoelasticidade, são utilizadas para indicar a qualidade de polímeros, (MARCOTTE; HOSHAHILIA; RAMASWAMY, 2001).

A xantana é completamente solúvel em água quente ou fria (ROCKS, 1971) formando soluções altamente viscosas e pseudoplásticas devido à formação de agregados de alta massa molar das moléculas na forma de bastões rígidos (WHISTLER; BEMILLER, 1997). Quando a tensão é aumentada, a viscosidade é progressivamente reduzida. Após a remoção da tensão, a viscosidade inicial é recuperada quase instantaneamente (SWORN, 2000). Uma pequena quantidade de xantana ($<10,0\text{g.L}^{-1}$) poderá aumentar a viscosidade da água em um fator de 100.000 em baixas taxas de cisalhamento, contudo somente por um fator de 10 em altas taxas de cisalhamento. Este grau de pseudoplasticidade notável só é conseguido por poucos polímeros, o qual é esperado para estruturas na forma de longos bastões (WHITCOMB, 1978).

A xantana forma soluções com alta viscosidade em baixas concentrações (PETTITT, 1982). Comparando com outras gomas, em concentração a $5,0\text{g.L}^{-1}$ e taxa de cisalhamento de $0,1\text{s}^{-1}$, a xantana exibe uma viscosidade aproximadamente 30 vezes maior que a viscosidade da goma guar e 100 vezes maior que a viscosidade do alginato de sódio e carboximetilcelulose. Em taxa de cisalhamento de 100s^{-1} , estas três gomas apresentam o mesmo valor de viscosidade. Acima de 100s^{-1} , a viscosidade da xantana cai acentuadamente comparando com as outras duas gomas, fazendo com que a solução de xantana facilmente flua, seja bombeada ou pulverizada. Essas mesmas qualidades são mantidas em concentrações em torno de $1,0\text{g.L}^{-1}$ a $3,0\text{g.L}^{-1}$. A alta viscosidade em baixas taxas de cisalhamento fornece estabilidade térmica ao sistema coloidal (SWORN, 2000).

A rigidez da molécula de xantana a torna praticamente insensível a variações de temperatura, pH e carga iônica, o que é esperado para moléculas na forma de bastões rígidos em contraste com moléculas na conformação desordenada (WHITCOMB, 1978).

Pequeno decréscimo na viscosidade das soluções de xantana em concentração em torno de $2,5\text{g.L}^{-1}$ é causado pela adição de sais monovalentes como cloreto de sódio (ROCKS, 1971). Entretanto em solução com alta

concentração de goma, a viscosidade aumenta com a adição de sais (SWORN, 2000). Um pico de viscosidade é encontrado com cloreto de sódio em níveis entre $0,2\text{g.L}^{-1}$ e $0,7\text{g.L}^{-1}$ e, acima deste nível o cloreto de sódio adiciona pouco efeito (HOEFLER, 2004). Íons divalentes como cálcio e magnésio tem efeito similar aos monovalentes na viscosidade das soluções de xantana (SWORN, 2000; HOEFLER, 2004). Certos íons metálicos como Cr^{3+} , Al^{3+} e Fe^{3+} estão relacionados a ligações cruzadas com xantana e formam géis complexos (STOKKE; CHRISTENSEN; SMIDSRØD, 1998; RODD *et al.*, 2001).

A viscosidade das soluções de xantana, com concentração em torno de $10,0\text{g.L}^{-1}$ e em solução salina, não sofre alteração em uma faixa de pH entre 1,5 e 11 (PETTITT, 1982; CHALLEN, 1994), porém, a viscosidade se modifica em baixas concentrações de goma (SWORN, 2000). A xantana pode ser solubilizada em diversas soluções ácidas, incluindo ácido acético $50,0\text{g.L}^{-1}$, ácido sulfúrico $50,0\text{g.L}^{-1}$, ácido nítrico $50,0\text{g.L}^{-1}$, ácido fosfórico $250,0\text{g.L}^{-1}$ e hidróxido de sódio $50,0\text{g.L}^{-1}$ (SWORN, 2000).

As soluções de xantana são únicas em sua capacidade de manter a viscosidade até a temperatura de transição conformacional (T_m). O aquecimento acima desta temperatura resulta na transição conformacional ordenada-desordenada da molécula de xantana, passando da conformação ordenada para desordenada. Devido a esta modificação conformacional a viscosidade aumenta. Sob resfriamento, a estrutura retorna ao seu estado original, dependendo da salinidade e concentração da solução (NORTON *et al.*, 1984).

A viscosidade da solução de xantana é estável em uma faixa de temperatura que varia do congelamento até próximo à ebulição, adicionando-se cloreto sódio $1,0\text{g.L}^{-1}$ (PETTITT, 1982). As soluções de xantana também são resistentes a altas temperaturas, mesmo acima de 100°C (WHITCOMB, 1978). Sworn (2000) relatou que a adição de cloreto de sódio $50,0\text{g.L}^{-1}$ ou mais aumentam a temperatura de transição para mais de 100°C , temperatura na qual a viscosidade sofre queda brusca devido à modificação reversível da conformação molecular. Ainda, o mesmo autor relatou que a alta viscosidade inicial foi recuperada sob resfriamento.

Certos polissacarídeos, notadamente exopolissacarídeos bacterianos como a xantana, apresentam propriedades intermediárias entre soluções e géis. A origem

deste comportamento está relacionada à conformação rígida ordenada que a xantana apresenta em solução e forma uma tênue rede tridimensional por fracas associações de cadeias ordenadas lado-a-lado (ROSS-MURPHY; MORRIS; MORRIS, 1983). Embora as soluções de xantana fluam livremente, apresentam espectro mecânico similar ao dos géis; o módulo elástico (G') excede o módulo viscoso (G'') em todas as frequências, com baixa dependência da frequência em ambos os módulos. Em termos práticos, as propriedades similares a gel, em baixas taxas de cisalhamento, é refletida na capacidade que as soluções de xantana exibem de manter partículas em suspensão ou estabilizar emulsões por longos períodos (MORRIS, 1995).

Em concentrações acima de $3,0\text{g.L}^{-1}$ a solução de xantana apresenta propriedades semelhantes a um gel. Em medidas oscilatórias em baixa deformação (ROSS-MURPHY; MORRIS; MORRIS, 1983) a resposta elástica (G') excede substancialmente o módulo viscoso (G'') e ambos os módulos apresentam variação limitada com a frequência. Estas propriedades semelhantes a de um gel são atribuídas a associações tênues de cadeias ordenadas e aos contra-íons (ROSS-MURPHY; MORRIS; MORRIS, 1983) com o aumento efetivo de acordo com a ordem: $\text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Ca}^{2+}$ (MORRIS, 1995).

A xantana não forma gel verdadeiro em qualquer temperatura ou concentração. Entretanto, forma gel quando misturada com galactomananas como carob, tara e guar modificada enzimaticamente (DEA; MORRISSON, 1975; DEA *et al.*, 1977; MORRIS *et al.*, 1977). Também forma gel, e em alguns casos precipitação, na presença de determinados sais metálicos, como relatado nos estudos realizados por Nolte *et al.* (1992), Rodd *et al.* (2001) e Mohammed *et al.* (2007). Um estudo sobre a reatividade da xantana com vários íons metálicos em solução foi realizado pela empresa CPKelco (2007), utilizando soluções com $10,0\text{g.L}^{-1}$ de xantana e $5,0\text{g.L}^{-1}$ de sais metálicos variando o pH das soluções. Observaram que na presença de altas concentrações de sais monovalentes, a gelatinização raramente ocorre. Muitos íons divalentes necessitam que o pH da solução seja alto para que ocorra a gelatinização, enquanto que para íons trivalentes a gelatinização da xantana pode ocorrer em condições de pH neutro, e até mesmo ácido.

2.2 Clairana

As bactérias do gênero *Beijerinckia* são bastonetes Gram-negativos, uni ou bicelulares estritamente aeróbios e, algumas das bactérias deste gênero possuem a capacidade de produzir biopolímeros com diferentes composições, dependendo da espécie (KANG; MCNELLY, 1977). São bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, porém, é indispensável o uso de fonte de carbono na forma de carboidratos como glicose, sacarose ou manitol para a produção do biopolímero (SUTHERLAND, 2001). As bactérias pertencentes a este gênero distribuem-se em solos de zona tropical e, em menor quantidade, em zonas subtropicais (DOBEREINER, 1959). No Brasil, foram encontradas no cerrado (BARBOSA; STRUCKEL, 1985) e em solos canavieiros (VENDRUSCOLO, 1995). A cepa 7070 foi isolada do solo canavieiro do município de Ribeirão Preto (SP) por Vendruscolo (1995). Novas cepas destas bactérias produtoras de biopolímero foram isoladas de solos arrozeiros (MACHADO; VENDRUSCOLO; MATTOS, 1999).

O biopolímero sintetizado pela bactéria *Beijerinckia* sp. cepa 7070 recebe denominações diferentes, de acordo com os autores do estudo. Vendruscolo (1995) denominou o biopolímero de B-27. Moreira *et al.* (1998) e Moreira *et al.* (2003, 2005) identificaram o biopolímero por clairana. Padilha *et al.* (1998, 2000) e Borges *et al.* (2004) não utilizaram denominações, se referem como o biopolímero produzido pela bactéria *Beijerinckia* sp. cepa 7070. Pinto *et al.* (2002), por estudarem diferentes cepas, referiram-se a este biopolímero como cepa 7070. Scamparini *et al.* (1997) utilizaram a identificação de CV-70. Boza *et al.* (2004) denominam biopolímero *Beijerinckia*. Neste trabalho, para o biopolímero sintetizado pela bactéria *Beijerinckia* sp. cepa 7070, a denominação utilizada será de clairana.

2.2.1 Produção de Clairana

A clairana é um exopolissacarídeo produzido em fermentações aeróbias de culturas puras de *Beijerinckia* em meio líquido. Segundo Barbosa e Struckel (1985), a quantidade do biopolímero obtido pela bactéria *Beijerinckia* é afetada pelas condições do processo de fermentação. De acordo com a formação do biopolímero,

o meio de cultura torna-se extremamente viscoso constituindo-se uma barreira para que a bactéria tenha acesso às fontes de alimentação e oxigenação (difusão do oxigênio no meio de fermentação) necessárias para a produção, conforme Figura 5.

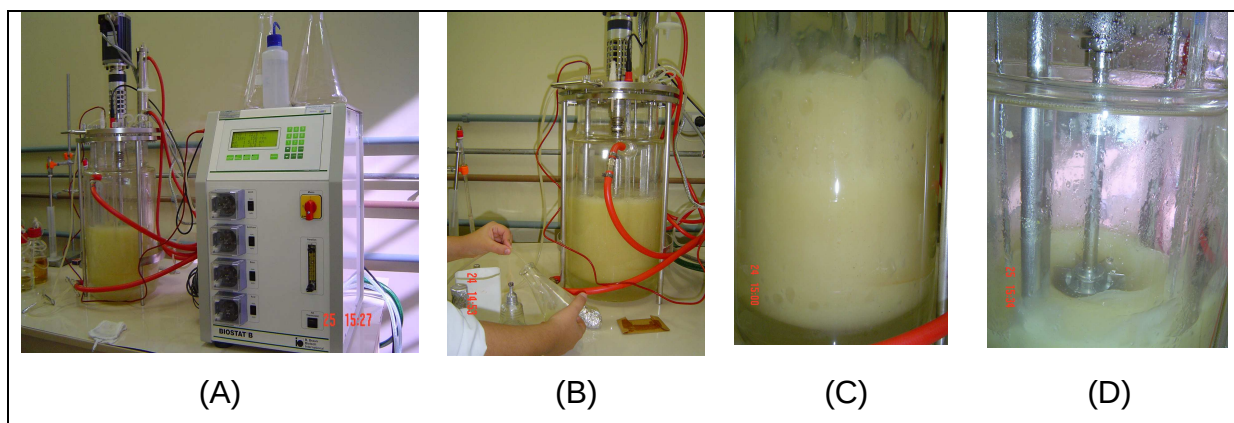


Figura 5 - Fermentação para produção de clairana. (A) fermentador; (B) retirada de amostra; (C) meio de cultura altamente viscoso; (D) observando o agitador no centro do fermentador, verifica-se a diminuição de velocidade de movimento do meio de cultura nas paredes do vaso de fermentação devido à alta viscosidade.

Moreira *et al.* (2003) estudaram a produção, por enzimas purificadas, de clairana através de lise e inativação das células durante o processo fermentativo. Verificaram que ocorre produção do biopolímero por via enzimática e que o processo de lise das células apresentou produção superior ao processo de inativação, e ainda que, dependendo das condições fermentativas, o processo via enzimática, utilizando a lise celular, apresentou produção superior quando comparado ao modelo convencional.

A literatura registra que, na produção de clairana, dois tipos de fibras podem ser obtidos, denominados de fibras longas e curtas. Estas fibras apresentam diferenças quanto à composição e comportamento reológico (PADILHA, 1997; BORGES *et al.*, 2004). O estudo realizado por Borges *et al.* (2004) mostrou que a produtividade do biopolímero de fibra longa permaneceu constante por um período de 48 horas de fermentação e, após este período apresentou um declínio. Para o biopolímero de fibra curta foi observado decréscimo da produtividade com o tempo de fermentação, sendo este fenômeno atribuído a polimerização realizada por enzimas específicas. Este fato justifica as diferenças encontradas entre as fibras do biopolímero. As fibras longas podem ser visualizadas na Figura 6.

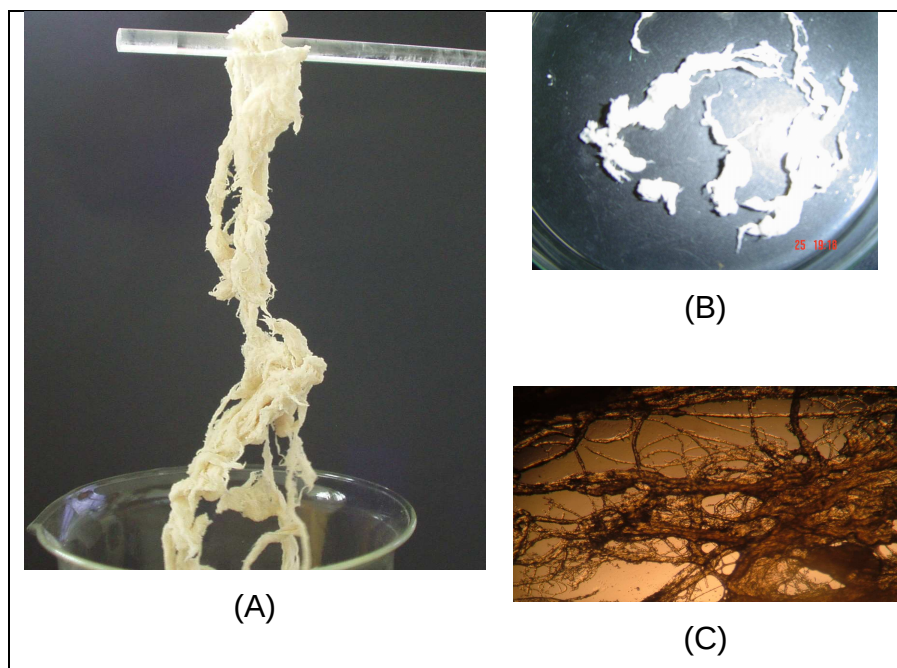


Figura 6 – Clairana obtida após o processo de fermentação. (A) Fibra longa obtida na precipitação com etanol; (B) Fibra longa após secagem em estufa e (C) Micrografia da fibra longa obtida na precipitação com etanol, obtida em microscópio óptico com aumento de 40X.

2.2.2 Estrutura Química

A composição química da clairana foi determinada por Vendruscolo (1995) sendo composta por glicose, galactose, fucose e ácido glicurônico. A mesma composição química foi encontrada por Moreira *et al.* (1998) e Borges *et al.* (2004). Pinto *et al.* (2002) verificaram que a clairana e o biopolímero sintetizado por *Beijerinckia* sp cepa UR4, sintetizados sob condições e meio de cultura idênticos, apresentaram os mesmos componentes: fucose, glicose, galactose, ácido glicurônico e ácido galacturônico. A composição química determinada por Scamparini *et al.* (1997) através de HPLC, apresentou os monossacarídeos glicose, galactose e fucose na razão de 3:1:3, respectivamente, não sendo detectado ácido glicurônico e ácido galacturônico. Borges *et al.* (2004) sugeriram que a presença do ácido glicurônico seja um produto de degradação que surgiu durante o processo de preparo das amostras para a análise (hidrólise). Provavelmente o mesmo fato tenha originado a presença de ácido galacturônico na composição apresentada por Pinto *et al.* (2002), como mostra a Figura 7.

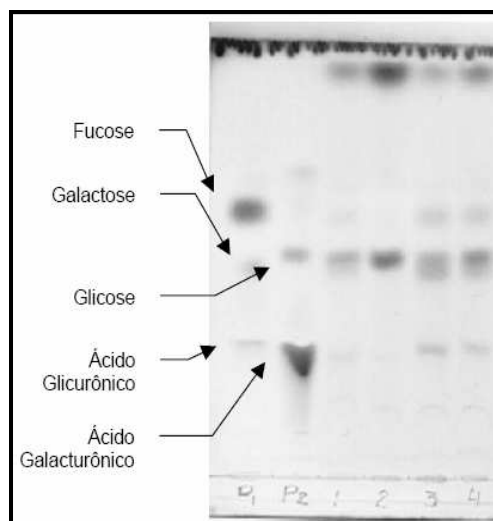


Figura 7 - Análise cromatográfica comparativa para a clairana e para o biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. cepa UR4: (P1) fucose, galactose e ácido glicurônico; (P2) glicose e ácido galacturônico com os biopolímeros das cepas (1)UR4 FL, (2)UR4 FC, (3)clairana FL, (4)clairana FC. Fonte: Pinto *et al.* (2002).

O trabalho desenvolvido por Padilha *et al.* (1998) detectou variação na concentração dos monossacarídeos que compõe a clairana, produzida em diferentes tempos de fermentação. O biopolímero sintetizado no menor período apresentou concentração superior em glicose, galactose e ácido glicurônico, e o sintetizado no maior período apresentou concentração superior em fucose. Borges *et al.* (2004) também observaram diferenças na concentração dos monossacarídeos com o tempo de fermentação, porém detectaram este fenômeno entre as fibras longa e curta. Todos os biopolímeros de fibra curta apresentaram maior teor de glicose e os de fibra longa apresentaram, geralmente, maior teor de ácido glicurônico. Pinto *et al.* (2002) observaram que o biopolímero de fibra curta da cepa UR4 não apresentou unidades de galactose.

Scamparini *et al.* (1997) determinaram que a cadeia principal da clairana é formada por β -D-galactose e α -L-fucose ligados através dos carbonos de posição 1-4. As cadeias laterais são formadas por β -D-glicose que estão ligadas através de ligações 1-4. Todos os monossacarídeos encontraram-se na forma piranosídica. A estrutura provável da clairana é apresentada na Figura 8.

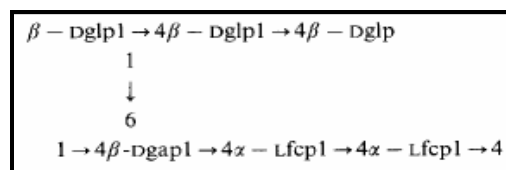


Figura 8 - Composição química da clairana. Fonte: Scamparini *et al.* (1997).

Scamparini *et al.* (2000) no estudo do biopolímero PS-32, sintetizado por *Beijerinckia* sp., determinaram que sua estrutura química é idêntica a estrutura apresentada por Scamparini *et al.* (1997) para a clairana.

Ohtani *et al.* (1995) estudaram a caracterização do polissacarídeo extracelular sintetizado por *Beijerinckia indica* cepa TX-1. A estrutura química deste biopolímero consiste de D-glicose, L-fucose, D-ácido glicurônico e D-glicero-D-mano-heptose, em uma razão molar de 5,0:1,0:0,9:2,0. Ainda apresenta o grupo acetila, 16,2%. Os pesquisadores também determinaram a massa molar por GPC e encontraram valor de $6,5 \times 10^5 \text{Da}$, apresentando distribuição monomodal.

2.2.3 Reologia das Soluções de Clairana

Os polímeros de origem microbiana vêm sendo estudados com visível interesse por suas propriedades reológicas, que em muitos casos superam as características funcionais dos polissacarídeos de origem vegetal (SANDERSON; CLARK, 1983; RINAUDO, 1993). Em geral, suas soluções mantêm a viscosidade em ampla faixa de pH e temperatura.

A clairana é solúvel em água e suas soluções aquosas são viscosas e apresentam comportamento pseudoplástico (BOZA *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2005). Scamparini *et al.* (2000) relataram que o biopolímero PS-32, sintetizado por *Beijerinckia* sp, o qual apresenta estrutura química idêntica a da clairana, apresenta propriedades de fluidos pseudoplásticos.

Martínez-Padilla e Cabada-Celis (1996), avaliaram os efeitos da temperatura e pH sobre as propriedades reológicas das soluções do biopolímero sintetizado pela bactéria *Beijerinckia* sp, isolada em solo mexicano. Verificaram que a adição de sais não apresentou influência nos parâmetros reológicos obtidos aplicando a lei de

potência, porém, as modificações do pH, temperatura e adição de íons afetaram as propriedades do módulo elástico.

Pinto *et al.*, (2002) estudaram a clairana e o biopolímero produzido pela cepa UR4 da bactéria *Beijerinckia* sp, em solução aquosa $10,0\text{g.L}^{-1}$, variando a temperatura. Verificaram que a viscosidade dos biopolímeros diminuiu com o aumento da temperatura e que a viscosidade apresentada pela clairana é superior a viscosidade apresentada pelo biopolímero sintetizado pela cepa UR4, em ambas as fibras. Relacionando com a composição química, verificaram que os biopolímeros que produziram soluções mais viscosas apresentaram maior teor de galactose e fucose, e os menos viscosos maior teor de glicose. Ainda observaram que somente a fibra longa produzida pela clairana apresentou comportamento pseudoplástico e os demais biopolímeros apresentaram comportamento newtoniano. Entretanto, os autores não realizaram análises referentes a massa molar e conformacional dos biopolímeros microbianos. Borges *et al.* (2004) estudaram a viscosidade da clairana a 25°C e obtiveram resultados com o mesmo comportamento.

Pinto *et al.* (2002) ainda estudaram a influência do pH e a adição de sais nas soluções aquosas da clairana fibra longa. Verificaram que o pH da solução aquosa é igual a 6,5. Quando o pH foi alterado a viscosidade da solução decresceu, sendo igual para os valores de pH 7,0 e 5,0 e substancialmente menor em pH 3,0. Em pH 6,5, a adição de $10,0\text{g.L}^{-1}$ de CaCO_3 à solução não alterou a viscosidade, porém, a adição de KCl ($1,0\text{g.L}^{-1}$ e $10,0\text{g.L}^{-1}$) e CaCO_3 ($1,0\text{g.L}^{-1}$) diminuíram a viscosidade do biopolímero. Para o biopolímero PS-32, Scamparini *et al.* (2000) observaram que maiores valores de viscosidade foram alcançados em solução de pH igual a 6,5 (natural), em pH extremamente básico (pH=12) a viscosidade diminuiu drasticamente, porém, em pH ácido (pH=2) o desvio do comportamento natural foi menor.

Borges *et al.* (2004) caracterizaram as clairanas sintetizadas em diferentes tempos de fermentação. Concluíram que o tempo de fermentação altera, consideravelmente, a viscosidade das soluções aquosas. As fibras longas apresentam viscosidade superior à viscosidade das fibras curtas (PINTO *et al.*, 2002; BORGES *et al.*, 2004).

2.3 Tara

As galactomananas são mananas que contém mais de 5% de galactose (ASPINALL, 1959). São polissacarídeos naturais extraídos de sementes de plantas e, as mais conhecidas, são denominadas Tara, Guar e Locusta (LBG). Diferem-se na razão manose/galactose (M/G), na distribuição de massa molar e distribuição da cadeia lateral de galactose ao longo da cadeia principal. (RINAUDO, 2004). São utilizadas como agentes espessantes e estabilizantes em sistemas aquosos para muitas aplicações industriais (RINAUDO, 2004).

A tara (TG) é uma galactomanana extraída por moagem do endosperma das sementes da leguminosa *Caesalpinia spinosa* (FSANZ, 2005), nativa da região Cordilheira da Bolívia, Peru e norte do Chile. Também é encontrada no Equador, Colômbia, Venezuela e Cuba. Acredita-se que o Peru é o maior exportador da goma tara.

2.3.1 Estrutura química

Tara, locusta e guar apresentam estruturas químicas similares sendo polissacarídeos neutros compostos de cadeia principal linear formada por unidades de manose (piranosídica) por ligações β -1-4 e cadeia lateral por uma unidade de galactose (piranosídica) unida por ligação α -1-6 à cadeia principal. Os biopolímeros diferem na razão entre as unidades de manose e galactose (M/G). A galactomanana comercial mais substituída é a guar (M/G 2:1); na tara, a razão M/G é 3:1, enquanto que na locusta é 4:1, como ilustrado na Figura 9 (RUIZ-ANGEL *et al*, 2002). As unidades de galactose são distribuídos aleatoriamente na cadeia principal (FSANZ, 2005).

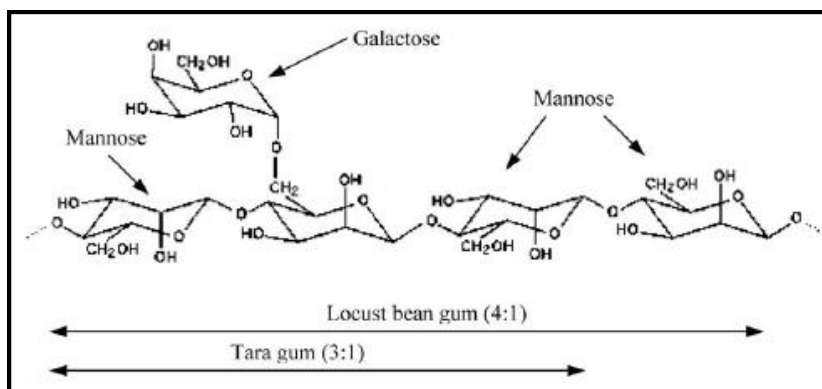


Figura 9 - Ilustração esquemática das estruturas das gomas locusta e tara. Fonte: Sittikijyothin, Torres e Gonçalves (2005).

2.3.2 Reologia das Soluções de Tara

As propriedades das soluções diluídas das galactomananas foram estudadas principalmente por medidas de viscosidade e mostraram que os polímeros em solução aquosa apresentam conformação desordenada com algum grau de rigidez (LAGUNA; TARAZONA; SAIZ, 2003).

As soluções aquosas de tara apresentam alta viscosidade em baixas concentrações e variações no pH, temperatura e adição de íons afetam pouco as propriedades reológicas (SITTIKIYOTHIN; TORRES; GONÇALVES, 2005).

As soluções aquosas de tara apresentam comportamento pseudoplástico com região newtoniana em baixas taxas de cisalhamento (SITTIKIYOTHIN; TORRES; GONÇALVES, 2005). O comportamento pseudoplástico deve às modificações na organização macromolecular em solução, de acordo com as modificações da taxa de cisalhamento. Em baixas taxas de cisalhamento, o rompimento dos agregados imposto pelo cisalhamento é balanceado pela formação de novos agregados, de forma que mantém uma razão de aglomerados estável, caracterizando a região do platô newtoniano, mantendo a viscosidade em um valor constante. Em altas taxas de cisalhamento, ocorre predominância do rompimento dos agregados sobre a formação de novos e as moléculas alinham-se na direção do fluxo, assim a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento.

A presença de galactose na cadeia lateral tende a inibir a agregação; assim, quanto maior a quantidade de galactose, mais fácil é a dissolução do biopolímero

em água. A goma tara possui solubilidade intermediária, entre a goma guar, que é solúvel em água fria, e a LBG, que é solúvel em água quente (PICOOUT *et al*, 2003).

A massa molar da goma tara é em torno de 10^6 Da (FSANZ, 2005). Sittikijyothin, Torres e Gonçalves (2005) determinaram a massa molar ponderal viscosimétrica apresentando valor de $2,31 \times 10^6$. Não determinaram c^* , porém apresentaram valor de $5,2 \text{g.L}^{-1}$ para c^{**} . Tako (1991) apresentou massa molar viscosimétrica de $2,08 \times 10^6$ Da. Fernandes, Gonçalves e Doublier (1991) determinaram em $0,97 \times 10^6$ Da.

3 Artigo 1

**Avaliação Comparativa das Propriedades de Xantanas Produzidas pelo
pv Pruni e da Clairana com uma Amostra de Xantana Comercial**

Este artigo será submetido para a revista Ciência & Engenharia da
Universidade Federal de Uberlândia.

Avaliação Comparativa das Propriedades de Xantanas Produzidas pelo pv Pruni e da Clairana com uma Amostra de Xantana Comercial

P. S. Diaz^{a,*}; R. C. Michel^b; R. F. T. Lomba^c; C. T. Vendruscolo^a

^aCentro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil. Caixa postal 354, CEP 96010 900.

^bInstituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. Caixa postal 68525, CEP 21945 970.

^cTecnologia de Engenharia de Poço, Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello, Petrobras, Rio de Janeiro, Brasil. CEP 21949 900.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo determinar as propriedades físicas e químicas de amostras de biopolímeros, sintetizados em fermentador de bancada, comparando com as propriedades de uma amostra de xantana comercial de grau industrial. Foram utilizadas análises reológicas, conteúdo dos grupos acetila e piruvato e conteúdo de íons. Ainda, para as amostras de xantana, foi realizada análise de viscosificante para utilização em fluidos de perfuração de poços de petróleo, de acordo com a norma estabelecida pela Petrobras. Os resultados obtidos referentes aos conteúdos de acetila e piruvato, para as amostras de xantana, não apresentaram diferenças significativas, sendo compatíveis com os resultados apresentados na literatura. O biopolímero clairana apresentou em sua estrutura química estes grupos substituintes. Com relação ao conteúdo de íons, a xantana comercial apresentou quantidade de cálcio superior a quantidade das demais amostras. As xantana do pv pruni apresentaram maior teor de potássio e a clairana maior teor de sódio. A viscosidade e a viscoelasticidade da amostra de xantana comercial foi superior. A clairana não apresentou propriedades semelhantes a um gel nas condições testadas. Na análise como viscosificante para fluidos de perfuração as amostras de xantana comercial e a Xc 06 atingiram os requisitos estabelecidos para os parâmetros n e K do modelo de Ostwald-de-Waele. No teste de força gel, somente a amostra de xantana comercial atingiu os valores estabelecidos na norma Petrobras.

Palavras-chave: biopolímeros, viscosidade, acetila, piruvato, íons.

1. INTRODUÇÃO

O grande interesse industrial nos polissacarídeos se deve as suas propriedades físicas e químicas originais. Destacam-se por suas propriedades reológicas, sendo utilizados principalmente como espessantes, agentes gelificantes e estabilizantes. Essas funcionalidades variadas promovem o seu uso em vários domínios como na indústria alimentícia, cosmética, química e petrolífera (MAUGERI, 2001). Exibem uma combinação de propriedades que são essenciais para definir sua aplicação final. Tais propriedades são determinadas por sua composição química, ligações intra e intermoleculares, massa molar e sua distribuição.

O estudo de muitos polissacarídeos de origem microbiana tem sido exposto na literatura, os quais objetivam o conhecimento da estrutura química e do comportamento das suas propriedades em solução (VILLAIN-SIMONNET; MILAS; RINAUDO, 1999; XU; LIU; ZHANG, 2006). Para obter novos biopolímeros microbianos com potencial aplicação industrial, cepas das bactérias *Xanthomonas arboricola* pv pruni e *Beijerinckia* sp têm sido

selecionadas de acordo com sua produtividade, viscosidade de suas soluções aquosas e composição de monossacarídeos em suas estruturas químicas (SOUZA; VENDRUSCOLO, 1999; MACHADO; VENDRUSCOLO; MATTOS, 1999; ANTUNES *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2001; BORGES; VENDRUSCOLO, 2007). A otimização dos parâmetros de fermentação em escala de bancada bem como a caracterização dos biopolímeros sintetizados pelas cepas selecionadas, foram a seqüência das pesquisas realizadas por Antunes *et al.* (2000), Moreira (2002), Teixeira (2005) e Pinto (2005) utilizando a bactéria *Xanthomonas arboricola* pv pruni; e por Padilha *et al.* (2000), Pinto *et al.* (2002), Borges *et al.* (2004) e Moreira *et al.* (2005), para a bactéria *Beijerinckia* sp.

A xantana é um heteropolissacarídeo extracelular produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas*. A estrutura química da xantana sintetizada por *X. arboricola* pv pruni ainda não foi estudada. A literatura apresenta a estrutura química da xantana sintetizada pela bactéria *X. campestris* pv campestris, a qual é composta de repetidas unidades pentassacarídicas, sendo a cadeia principal formada

por unidades de β -D-glicose ligadas na posição um e quatro, idêntica à cadeia de celulose. As unidades de manose estão ligadas na posição do C-3 e o ácido D-glicurônico ligado a manose terminal na posição um e quatro (JANSSON; KENNE; LINDBERG, 1975).

A clairana é o biopolímero sintetizado pela bactéria *Beijerinckia* sp cepa 7070. A estrutura química da clairana foi determinada por Scamparini *et al.* (1997) sendo formada por β -D-galactose e α -L-fucose ligados através dos carbonos de posição um e quatro. As cadeias laterais são formadas por β -D-glicose que estão ligadas através de ligações um e quatro.

O presente trabalho objetivou realizar a caracterização dos biopolímeros xantana e clairana, sintetizados pelas bactérias *X. arboricola* pv pruni cepas 06 e 82 e *Beijerinckia* sp cepa 7070, comparando com as propriedades de uma amostra de xantana comercial de grau industrial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Biopolímeros

As amostras de xantana foram sintetizadas pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv pruni cepas 06 e 82, fornecidas pelo Centro de Pesquisa Agropecuária Clima Temperado (CPACT-EMBRAPA), localizado na cidade de Pelotas (Rio Grande do Sul, Brasil). Neste trabalho, as xantanas obtidas pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv pruni cepas 06 e 82 serão denominadas de Xc 06 e Xc 82. A amostra de clairana foi sintetizada com a bactéria *Beijerinckia* sp. cepa 7070 a qual foi isolada do solo canavieiro do município de Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil) por Vendruscolo (1995). Neste trabalho, a amostra de clairana refere-se às fibras longas (FL) sintetizadas.

A bactéria *X. arboricola* pv pruni foi mantida por repiques mensais (HAYNES *et al.*, 1955) e armazenada a 4°C, de acordo com Muro e Luchi (1989). A bactéria *Beijerinckia* sp foi mantida liofilizada em ampolas. Nesse processo, a suspensão bacteriana, com 1×10^{10} UFC/mL, acrescida de crioprotetor, foi conservada através da dessecação a pressões sub-atmosféricas. Após a abertura da ampola, a bactéria foi mantida por repiques mensais (HAYNES *et al.*, 1955) e armazenada a 4°C, de acordo com Muro e Luchi (1989).

Os meios de cultura utilizados para a produção de células e de biopolímero das amostras de xantana são descritos no pedido de patente registrado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI, 2006). Para a clairana são descritos no pedido de patente registrado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI, 2002).

A produção de células foi realizada em agitador orbital (New Brunswick, Scientific, modelo Innova 4230) e a produção dos biopolímeros

microbianos foi realizada em biorreator de bancada (B. Braun Biotech. Inc., modelo Biostat B) utilizando vaso de 10L.

No processo pós-fermentativo foi realizada a centrifugação (Sorvall Instruments RC-5C) a 16.000g durante 45 minutos para remoção das células. Ao sobrenadante foi adicionado etanol 96°GL na proporção de 1:4, para precipitação do biopolímero. O material obtido foi seco em estufa a 56°C e triturado em moinho de disco (Fritsch, Pulverisette).

A xantana comercial de grau industrial utilizada foi a Xanvis, produzida pela empresa Kelco (Houston – Estados Unidos da América) e fornecida pelo Laboratório de Fluidos do Centro de Pesquisas e Desenvolvimento (Cenpes) da Petrobras.

2.2 Conteúdo de Acetila e Piruvato

A quantificação dos ácidos acético e pirúvico foram realizadas por colorimetria utilizando os métodos do ácido hidroxâmico (MCCOMB e MCCREADY, 1957) e da 2,4-dinitrofenilhidrazina (SLONEKER e ORENTAS, 1962), respectivamente.

2.3 Conteúdo de íons

A quantificação dos íons cálcio, sódio e potássio das amostras foram realizados por espectrometria de emissão atômica utilizando fotômetro de chama (Cole Parmer, modelo 2655-00). Os íons foram mensurados segundo metodologia clássica (ASTM, 1981).

2.4 Análises reológicas

As amostras para as análises reológicas foram preparadas em água destilada com 1×10^{-3} g.L⁻¹ de azida sódica, sob agitação magnética com aquecimento a 40°C por 16 horas. A concentração das soluções foi de 5,0 g.L⁻¹ e verificada por gravimetria.

As análises foram realizadas em reômetro de tensão controlada Rheostress 600 (Haake, Thermo Electron, Alemanha) com controlador de temperatura Peltier ($\pm 1^\circ\text{C}$). A viscosidade foi medida com a taxa de deformação variando de 0,01 s⁻¹ a 1000 s⁻¹. As medidas oscilatórias foram determinadas com frequência variando de 0,02-10 Hz na região de viscoelasticidade linear em taxa de deformação de 0,05 Pa. A geometria utilizada foi cone e placa (diâmetro 60,0 mm; distância 0,105 mm; ângulo 2°).

As medidas foram realizadas nas temperaturas de 5°C, 25°C, 45°C e 65°C. Para retardar a evaporação da água nas temperaturas acima de 25°C, uma fina camada de óleo newtoniano foi utilizada na superfície exposta. O óleo newtoniano é imiscível com a água e mostrou não interferir nos resultados.

2.5 Análise de viscosificante para fluido de perfuração

A análise como viscosificante foi realizada preparando as soluções de acordo com a seguinte

composição: 60g.L⁻¹ de NaCl, 0,2g.L⁻¹ de CaCl₂, 0,06g.L⁻¹ de MgCl₂ e 4,3g.L⁻¹ de xantana. O método de preparo seguiu as especificações contidas na norma N-2605 (Petrobras, 2003).

As análises de viscosidade foram realizadas em reômetro de tensão controlada Rheostress 100 (Haake, Thermo Electron, Alemanha) com controlador de temperatura Peltier (±1°C). A viscosidade foi medida com a taxa de deformação variando de 0,1s⁻¹ a 1000s⁻¹. A geometria utilizada foi cone e placa (diâmetro 60,0 mm; distância 0,105 mm; ângulo 2°). As análises de força gel foram realizadas em viscosímetro Fann 35A, utilizando *bob* com raio de 1,72x10⁻² m. As medidas foram realizadas na temperatura de 25°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Conteúdo de Acetila e Piruvato

A estrutura de muitos polissacarídeos oriundos de bactérias Gram-negativas é relativamente

simples, compreendendo homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos, os quais normalmente são compostos de unidades repetitivas regulares, compostos de dois a quatro tipos de monossacarídeos, ácido glicurônico e radicais de acetato, piruvato, hidroxibutirato e succinato (SUTHERLAND, 2001). A literatura apresenta que o grau de substituição pelos grupos acetila e piruvato na molécula de xantana tem influência sobre a estabilidade na forma de hélice (ordenada) e na faixa de temperatura em que ocorre a transição conformacional (SHATWELL *et al.*, 1990; KIM *et al.*, 2006), na capacidade de associação intermolecular (GOYCOOLEA *et al.*, 2001) e intramolecular (SMITH *et al.*, 1983), bem como a capacidade viscosificante do biopolímero (SHATWELL *et al.*, 1990). Os conteúdos dos substituintes acetila e piruvato das amostras de xantana e clairana foram investigados e são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Conteúdo de acetila e piruvato para os biopolímeros.

Amostras	Acetila (%)	Desvio padrão	Piruvato (%)	Desvio padrão
Xc 06	2,76	0,001	2,48	0,006
Xc 82	3,29	0,001	3,34	0,001
Xanvis	3,88	0,001	3,90	0,006
Clairana (FL)	3,37	0,001	1,96	0,005

O biopolímero Xanvis apresentou maior grau de substituição por acetila e piruvato em sua molécula, seguido pela Xc 82. A xantana Xc 06 apresentou o menor grau de substituição por acetila e a clairana o menor por piruvato. É importante observar que as amostras de xantana apresentaram quantidade estequiométrica entre os grupos acetila e piruvato. Comportamento semelhante foi observado por Bradshaw *et al.* (1983) para xantana comercial Keltrol e por Shatwell *et al.* (1990) para a xantana sintetizada por *Xanthomonas campestris* pv *campestris* cepa 646.

As pesquisas realizadas anteriormente, referentes à composição química e estrutural da clairana, não relataram a presença desses grupos na molécula do biopolímero microbiano. Porém, Ohtani *et al.* (1995) estudaram a caracterização do polissacarídeo sintetizado por *Beijerinckia indica* cepa TX-1 e apresentaram teor de 16,2% de acetila na estrutura. Cooke e Percival (1975) estudaram a estrutura química do polissacarídeo extracelular sintetizado por *Beijerinckia mobilis* cepa NBC 9879 e, através da mesma metodologia utilizada neste trabalho, determinaram teor de 2,6% de ácido piruvico na estrutura do biopolímero.

Na literatura, é possível observar uma variação muito ampla nos teores de acetila e piruvato determinados para amostras de xantana. De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, observou-se

que o grau de substituição na molécula de xantana por acetila e piruvato é dependente da bactéria utilizada na síntese do biopolímero. A maior parte dos resultados da literatura não apresenta quantidade estequiométrica entre os grupos acetila e piruvato, sendo o grau de substituição por acetila superior ao por piruvato. Mutações ocorridas nestas bactérias podem levar a obtenção de xantanas insubstituídas.

A xantana produzida em escala industrial utiliza, tradicionalmente, o patovar *campestris*, mais especificamente a cepa NRRL B-1459 (Sutherland, 1993). Porém, os valores de acetila e piruvato apresentados na literatura para as xantanas comercializadas por diferentes empresas são diferentes. Este fato pode estar relacionado a diferenças nas condições aplicadas na fermentação e pós-fermentação, bem como ao preparo da amostra para a análise. Segundo Candia e Deckwer (1999), a massa molar e a polidispersão são influenciadas pela hidrólise parcial realizada no preparo da amostra para análises, pois tal procedimento pode acarretar em alguma degradação do biopolímero.

Os resultados obtidos neste trabalho para as xantanas oriundas do pv. pruni (Xc 06 e Xc 82) diferem dos resultados obtidos por Teixeira (2005) e Pinto (2005) para a Xc 101 e por Borges (2007) para a Xc 106, os quais não apresentaram relação estequiométrica. Este fato relaciona-se as diferentes cepas utilizadas na obtenção dos biopolímeros. Os

valores apresentados por Teixeira (2005) para a Xc 06 não apresentaram diferenças significativas com relação aos obtidos neste trabalho, considerando-se que a pesquisa foi realizada em volume de 0,1L.

Borges (2007) ainda relatou que o processo de esterilização realizado no caldo de fermentação ocasionou a diminuição nos teores de acetila e piruvato dos biopolímeros.

Tabela 2 – Teores de acetila e piruvato para diferentes amostras de xantana citados na literatura.

Referência	Amostra	Acetila (%)	Piruvato (%)
Slonecker e Jeanes (1962)	<i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i> (NRRL B-1459)	4,6	---
Bradshaw <i>et al.</i> , (1983)	Keltrol (Kelco)	4,1	4,3
	<i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i> 646	4,5	4,4
Shatwell <i>et al.</i> (1990)	<i>X. campestris</i> pv <i>phaseoli</i> 1128	7,7	1,7
	<i>X. campestris</i> pv <i>oryzae</i> PXO61	14,3	0,3
	<i>X. campestris</i> pv <i>phaseoli</i> 556	1,6	6,0
	<i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i>	1,0	0,7
	<i>X. campestris</i> pv <i>gummisudans</i> 2182	1,5	0,7
Sutherland (2001)	<i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i> BD9A	0,2	0,1
	Mutante	1,0	0,0
	Mutante	0,0	0,0
Wang <i>et al.</i> , (2002)	Kelco	5,14	0,24
Teixeira (2005)	<i>X. arboricola</i> pv <i>pruni</i> 101	5,42	0,26
	<i>X. arboricola</i> pv <i>pruni</i> 06	3,25	2,81
Pinto (2005)	Jungbunzlauer	4,1	3,6
	<i>X. arboricola</i> pv <i>pruni</i> 101	5,0	0,8
Khouryieh (2006)	Sigma	3,53	0,9
Borges (2007)	<i>X. arboricola</i> pv <i>pruni</i> 106	3,5	0,31

3.2 Conteúdo de íons

A produção de xantana envolve duas etapas distintas: processo de fermentação e de recuperação. Na fermentação utiliza-se substrato constituído por fonte de carbono, nitrogênio e sais minerais, os quais são adicionados em quantidades que normalmente excedem o consumo pelas bactérias. Deste modo, certa quantidade permanece no caldo de fermentação após a finalização dos processos de fermentação e de recuperação. A quantificação dos íons presentes nas amostras foi realizada e os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Teores de íons determinados nas amostras

Amostra	Íons (g.L ⁻¹)		
	Na	K	Ca
Xc 06	5,4	11,0	0,05
Xc 82	1,0	13,0	0,06
Xanvis	0,26	2,7	2,8
Clairana (FL)	98,0	38,0	0,05

Os teores dos íons diferiram entre as amostras. Observou-se que a quantidade de cálcio presente na Xanvis é muito superior a quantidade presente nos demais biopolímeros. Este alto teor de cálcio foi relatado por Ferreira *et al.* (2006) e por Borges (2007) para amostras de xantanas comerciais de grau industrial. As xantanas Xc 06 e Xc 82 apresentaram maior teor de potássio. A clairana apresentou teores de sódio e potássio muito superiores aos apresentados pelas demais amostras e teor de

cálcio igual ao apresentado pelas xantanas do patovar pruni.

Teores de sódio e potássio superiores aos determinados neste estudo para as amostras de xantana, foram determinados por Pinto (2005) para a xantana comercial (Jungbunzlauer) e para a xantana sintetizada pela bactéria *X. arboricola* pv *pruni* cepa 101 em volume de 0,085L utilizando frasco de 0,25L, a qual apresentou valores de 28,2 g.L⁻¹ de sódio e 1,98g.L⁻¹ de potássio e 2,02g.L⁻¹ de sódio e 1,98g.L⁻¹ de potássio, respectivamente. A análise de íons realizada por Borges (2007) para as xantanas sintetizadas por *X. arboricola* pv *pruni* cepa 106, obtidas em volume de 7L em biorreator de 10L, revelaram teor de íons sódio muito superior ao de íons potássio. Este fato foi atribuído à adição de hidróxido de sódio para o controle do pH do processo de fermentação. A fermentação para a obtenção das amostras de xantana do patovar pruni estudadas neste trabalho não foi realizada com controle de pH. Deste modo, é possível observar que a quantidade de íons presentes em amostras de xantana é variável e dependente dos processos fermentativo e pós-fermentativo.

3.3 Análises Reológicas

As curvas de viscosidade dos biopolímeros apresentaram comportamento pseudoplástico, como esperado para soluções aquosas de xantana (SANDFORD e BAIRD, 1983) e anteriormente apresentado para as xantanas sintetizadas por *X. arboricola* pv *pruni* por Antunes *et al.* (2000) e

Moreira *et al.* (2001) e para a clairana por Moreira *et al.* (2005). Os resultados são apresentados na Figura 1.

Em baixas taxas de cisalhamento, a amostra Xanvis apresentou viscosidade superior às demais amostras, em todas as temperaturas. Todos os biopolímeros apresentaram decréscimo da viscosidade com o aumento da temperatura. Porém, a amostra comercial apresentou maior estabilidade frente à variação da temperatura e a Xc 82 o maior decréscimo de viscosidade.

A xantana Xc 06 apresentou comportamento similar ao apresentado pela amostra Xanvis, com relação à pseudoplasticidade. A Xc 82 e a clairana FL apresentaram menor decréscimo da viscosidade em baixas taxas de cisalhamento. Com o aumento da temperatura este comportamento foi pronunciado. Possivelmente, este comportamento possa ser atribuído a uma maior flexibilidade das cadeias dos biopolímeros Xc 82 e clairana FL.

A viscosidade superior apresentada pela amostra Xanvis, possivelmente, seja devido a

diferenças de massa molar entre as amostras ou devido a esta apresentar teor de íon divalente muito superior ao teor apresentado pelas amostras do patovar pruni (Tabela 3). A presença de sal divalente faz com que ocorra a formação de aglomerados maiores entre as moléculas de xantana e auxilia na estabilidade frente a variações de temperatura e cisalhamento, conforme Figura 1 (A). Além disso, a xantana utilizada em fluidos de perfuração de poços de petróleo, como a Xanvis, contém químicos para melhorar/estabilizar as propriedades reológicas em condições extremas (SHAH e ASHTAPUTRE, 1999).

O resultado de viscosidade apresentado por Borges (2007), para a xantana obtida pelo pv pruni cepa 106 foi de 75mPa.s, enquanto, neste trabalho para a Xc 06, na taxa de cisalhamento de $19s^{-1}$, a viscosidade foi de 182mPa.s e para a Xc 82 foi de 135mPa.s. Porém, é importante observar que a metodologia de solubilização dos biopolímeros utilizada por Borges (2007) foi diferente da aplicada no presente estudo.

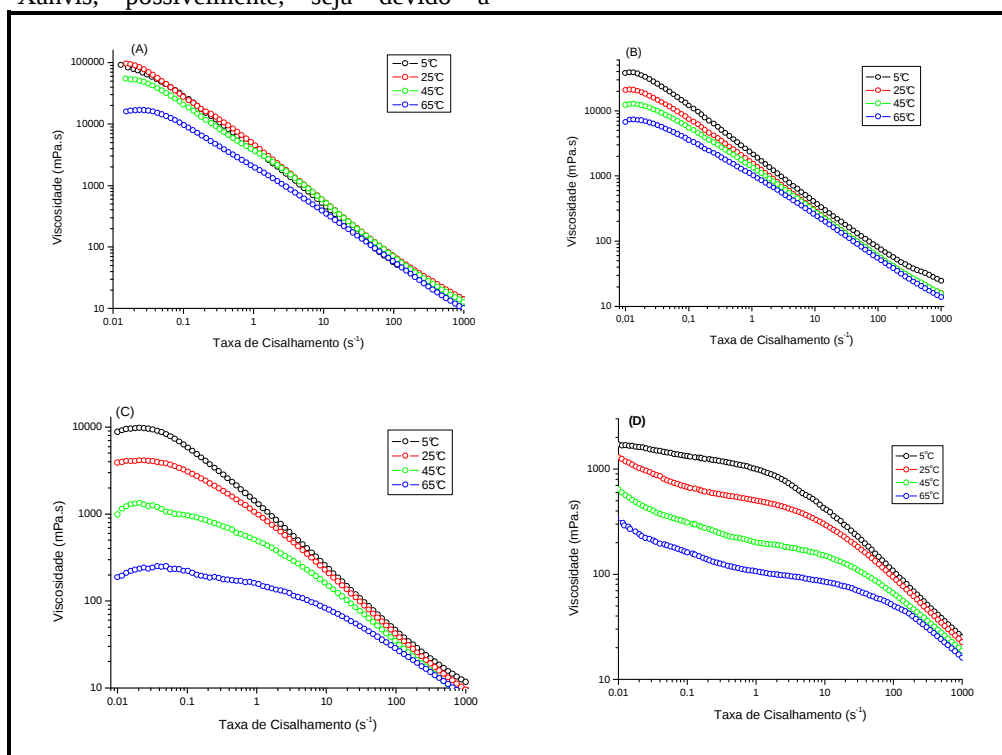


Figura 1 - Curvas de viscosidade para as soluções aquosas dos biopolímeros (A) Xanvis, (B) Xc 06 (C) Xc 82 e (D) clairana, com concentração de $5g.L^{-1}$ em diferentes temperaturas.

Os resultados apresentados na Figura 3 mostram o comportamento dos módulos elástico e viscoso em função da frequência, nas diferentes temperaturas testadas. Todos os biopolímeros apresentaram diminuição no valor dos módulos com o aumento da temperatura.

Para a Xanvis, Figura 3 (A), o módulo elástico (G') foi maior em todas as frequências e temperaturas que o módulo viscoso (G''), mostrando a

existência de estrutura semelhante a um gel. Os módulos elástico e viscoso não apresentam sobreposição em nenhuma das taxas de frequência aplicadas para as temperaturas de 25°C e 45°C, ocorrendo em baixas frequências para a temperatura de 65°C. Para a Xc 06 e Xc 82, Figura 3 (B e C), o módulo elástico (G') apresentou-se superior ao viscoso após uma dada frequência (sobreposição das curvas), a qual variou de acordo com a temperatura. O

aumento da temperatura fez com que a frequência de sobreposição fosse deslocada para valores maiores, isto é, favoreceu o módulo viscoso, sendo necessárias frequências maiores para que o módulo elástico seja superior.

As curvas dos módulos para a clairana, Figura 2 (D), apresentaram o módulo viscoso superior ao elástico em todas as temperaturas analisadas. Isto mostra que esse biopolímero não apresenta propriedades similares a um gel, nas condições estudadas. Comportamento similar foi obtido por

Padilha *et al.*, (2000), para soluções aquosas de clairana (FL) 30,0g.L⁻¹, sintetizadas em condições diferentes das utilizadas no presente estudo. Martínez-Padilla e Cabada-Celis (1996) no estudo reológico do biopolímero obtido por *Beijerinckia* sp também relataram comportamento similar ao obtido neste estudo. Porém, Boza *et al.* (2004) relataram ocorrência de resposta elástica para a clairana, em solução com concentração de 30,0g.L⁻¹, em frequência superior a 3,5Hz, sendo independente da frequência a partir desse ponto.

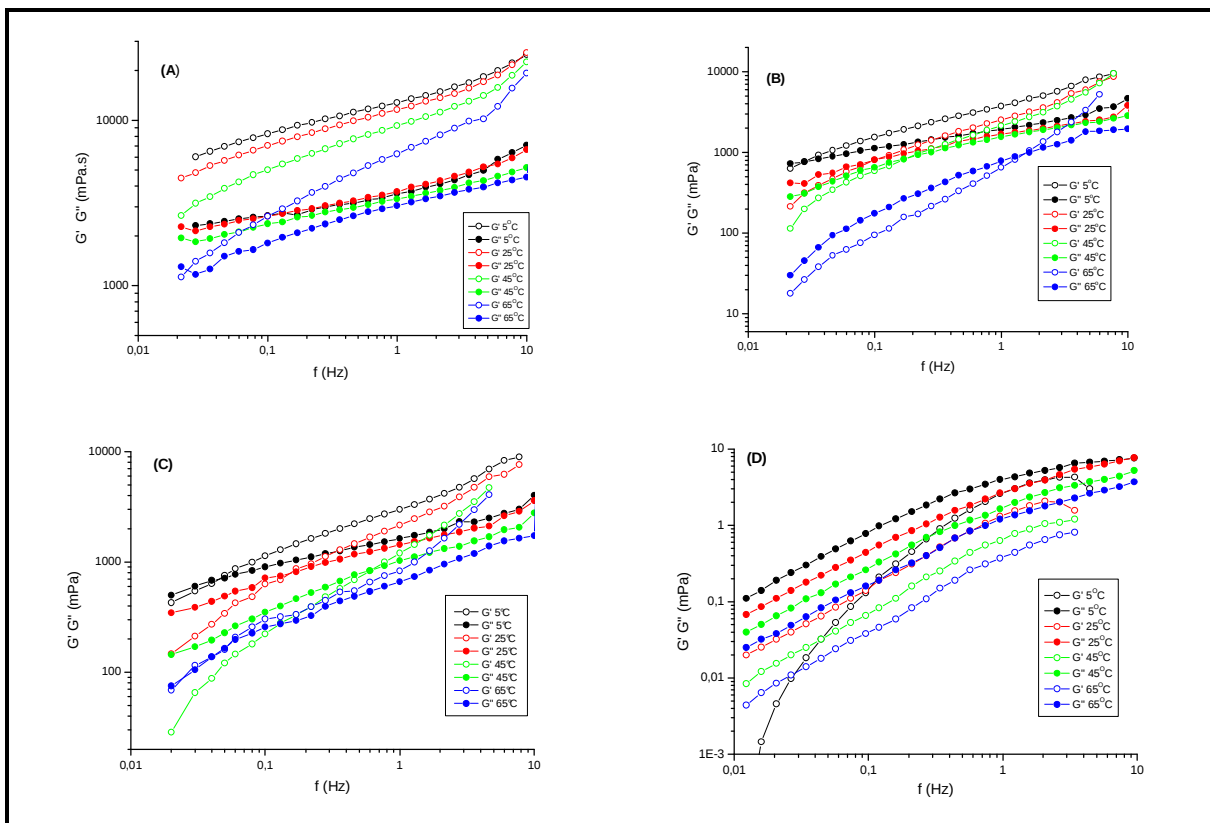


Figura 2 - Curvas dos módulos elástico e viscoso para as soluções aquosas dos biopolímeros (A) Xanvis, (B) Xc 06, (C) Xc 82 e (D) clairana, com concentração de 5g.L⁻¹ em diferentes temperaturas.

3.4 Análise de viscosificante para fluido de perfuração

Os polímeros viscosificantes utilizados em fluidos de perfuração são solubilizados em meio salino e analisados com relação a sua capacidade viscosificante, utilizando os parâmetros K e n do modelo de Ostwald-de-Waele, e quanto as suas propriedades semelhantes a um gel.

As curvas de viscosidade obtidas para as amostras de xantana são apresentadas na Figura 3. As xantanas do patovar pruni apresentaram viscosidade inferior a viscosidade da Xanvis. Contrário ao comportamento apresentado em solução aquosa, a Xc 82 em solução salina apresentou viscosidade similar a viscosidade da Xc 06.

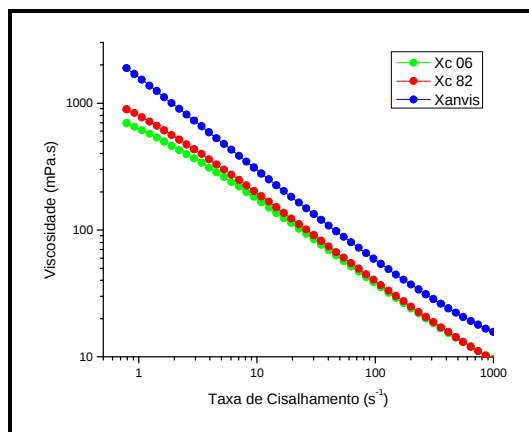


FIGURA 3 - Curvas de viscosidade para as soluções salinas dos biopolímeros.

A norma N-2604 (Petrobras, 2003) especifica que o índice de consistência (K) mínimo deve ser de 1500 mPa.s e o índice de fluxo (n) deve apresentar valor máximo de 0,5. Comparando os resultados dos parâmetros K e n obtidos para as amostras de xantana em solução salina, apresentados na Tabela 4, aos valores determinados na norma observamos que as amostras estão em conformidade com o valor estipulado para o parâmetro n. Com relação ao valor estipulado para o parâmetro K, a amostra Xc 82 não atingiu o valor mínimo. As xantanas Xc 06 e Xc 82 quando preparadas com tratamento térmico no processo pós-fermentativo apresentaram valores de n e K de acordo com as especificações da norma N-2604 (Petrobras, 2003) (resultados não apresentados).

Tabela 4 - Resultados dos parâmetros n e K das amostras de xantana em solução salina.

Amostra	n (adm)	K (mPa.s)
Xc 06	0,318	1597,44
Xc 82	0,468	965,18
Xanvis	0,275	1590,05

A força gel é um parâmetro utilizado para indicar o grau de gelificação. A força gel inicial mede a resistência inicial para colocar o fluido em fluxo. A força gel final mede a resistência do fluido para reiniciar o fluxo quando este fica um tempo em repouso devido a manobras e conexões. A diferença entre as forças géis indica o grau de tixotropia do fluido (Thomas, 2001). A norma N-2604 (Petrobras, 2003) estabelece (em lbf/100ft²) que o valor mínimo para G₀ é de 7; para G₁₀ entre 10 e 15 e G₃₀ valor máximo de 20. Os resultados obtidos para as xantanas são apresentados na Tabela 5. A xantana comercial de grau industrial Xanvis apresentou valor de força gel de acordo com os especificados pela norma N-2604 (Petrobras, 2003). As amostras de xantana Xc 06 e Xc 82 apresentaram valores para G₀, G₁₀ e G₃₀ inferiores aos valores considerados como mínimos na norma.

Tabela 5 - Resultados de força gel de diferentes amostras de xantana em solução salina.

Amostra	Força gel (lbf/100 t ²)		
	G ₀	G ₁₀	G ₃₀
Xc 06	5	5	6
Xc 82	4	5	5
Xanvis	12	15	16

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na análise dos conteúdos de acetila e piruvato mostraram ser dependentes das espécies e cepas dos microrganismos utilizados na síntese dos biopolímeros. Os teores dos grupos determinados para as amostras de xantana estão de acordo com os valores apresentados na

literatura. A determinação dos substituintes acetila e piruvato para a clairana colaborou na elucidação da estrutura química deste biopolímero microbiano que pode ser considerado um polieletrólito. A determinação do conteúdo de íons revelou as diferenças nos processos de produção dos biopolímeros microbianos. A amostra de xantana comercial apresentou propriedades reológicas superiores as demais amostras de biopolímeros microbianos. As amostras de xantana do pv pruni apresentaram viscosidade e viscoelasticidade superiores a apresentada pela clairana. Para aplicação como viscosificante de fluidos de perfuração, somente a amostra comercial atendeu aos requisitos estabelecidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes, A. E. C; Moreira, A. S; Vendruscolo, J. L. S; Vendruscolo, C. T. Screening of *Xanthomonas campestris* pv pruni strains according to their production of xanthan and its viscosity and chemical composition. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 6, n. 2, p. 317-322, 2003.
- Antunes, A. E. C; Moreira, A. S; Vendruscolo, J. L. S; Vendruscolo, C. T. Síntese de biopolímero xantana em meios convencionais e alternativos: viscosidade x composição. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 6, n. 2, p. 83-87, 2000.
- ASTM. D1428-64. Annual Book of ASTM Standards, *American Society for Testing and Materials*, v.10, Philadelphia, 1981.
- Bradshaw, I. J.; Nisbet, B. A.; Kerr, M. H.; Sutherland, I. W. Modified xanthan – its preparation and viscosity. *Carbohydrate Polymers*, v.3, p.23-38, 1983.
- Borges, C. D; Vendruscolo, C. T. Xanthan Synthesized by Strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni: Production, Viscosity and Chemical Composition. *Bioscience Journal*, v. 23, n. 4, p. 67-73, 2007.
- Borges, C. D. 2007, 177p. *Estudo das condições operacionais de produção de xantana por X. campestris pv pruni para aplicação em fluidos de perfuração de poços de petróleo*. Tese (Doutorado em Biotecnologia Agrícola) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Borges, C. D; Moreira, A. N; Moreira, A. S; Del Pino, F. A. B; Vendruscolo, C. T. Caracterização de Biopolímeros Produzidos por *Beijerinckia* sp. 7070 em Diferentes Tempos de Fermentação. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, p. 327-332, 2004.
- Boza, Y; Neto, L.P; Costa, F. A. A; Scamparini, A.R.P. Exopolysaccharide production by encapsulated *Beijerinckia* cultures. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1201–1209, 2004.

- Candia, J. L. F; Deckwer, W. D. Effect of the Nitrogen Source on Pyruvate Content and Rheological Properties of Xanthan. *Biotechnology Progress*, v. 15, p. 446-452, 1999.
- Cooke, A. A; Percival, E. Structural investigations of the extracellular polysaccharides elaborated by *Beijerinckia mobilis*. *Carbohydrate Research*, v. 43, p. 117-132, 1975.
- Ferreira, M. V. D; Martins, A. L; Costa, F. G; Lopes, L. M; Figueiredo, M. S; Paula, B. R.F.C; Naccache, M. F. Evaluation of Polymers with Drag Reduction Potential. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering and 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering - ENPROMER, CD-ROM, Rio de Janeiro, Brasil.
- Goycoolea, F. M; Milas, M; Rinaudo, M. Associative phenomena in galactomannan-deacetylated xanthan systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 29, p. 181-192, 2001.
- Haynes, W. C., Wickerham, L. J., Hesseltine, C. W. (1955). Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. *Applied Microbiology*, v. 3, p.361-368.
- INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, sob o nº PI 0105856-8, de 07 de novembro de 2001. (2002). Processo de produção de polissacarídeo por *Beijerinckia* sp. Disponível em:<http://pesquisa.inpi.gov.br/MarcaPatente/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=591993&PesquisaPorTitulo=BEIJERINCKIA&PesquisaPorResumo=&PesquisaPorDepositante=&PesquisaPorInventor=&PesquisaPorProcurador=>.
- INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, sob o nº PI 0406309-0, de 05 de novembro de 2004. (2006). Processo de produção de biopolímero tipo xantana, biopolímero obtido, seus usos; meio de cultura para crescimento de *Xanthomonas* e uso da mesma para produção de biopolímero. *Revista da Propriedade Industrial*, n. 1849, p. 186.
- Jansson, P. E; Kenne, L; Lindberg, B. Structure of the exocellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydrate Research*, v. 45, p. 275-285, 1975.
- Khouryieh, H. A. M. 2006, 146p. *Rheological characterization of xanthan-guar mixtures in dilute solutions*. Master Thesis (Food Science Graduate Program) - College of Agriculture, Kansas State University, Manhattan.
- Kim, B. S; Takemasa, M; Nishinari, K. Synergistic Interaction of Xyloglucan and Xanthan Investigated by Rheology, Differential Scanning Calorimetry, and NMR. *Biomacromolecules*, v. 7, p. 1223-1230, 2006.
- Maugeri, F. Produção de Polissacarídeos. In: Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., v. 3, 2001.
- Machado, M. I.; Vendruscolo, C.T.; Mattos, M.L.T. Isolamento e caracterização de *Azotobacter* e *Beijerinckia* de solo do Rio Grande do Sul – Brasil. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE LA CIENCIA DEL SOLO, 1999, Tucon. Resumo... Tucon: 1999. v.1. p 123-127.
- Martínez-Padilla, L. P; Cabada-Celis, N. Rheological and functional characterization of a biopolymer obtained from *Beijerinckia* sp. *Food Science and Technology International*, v. 2, n. 6, p. 405-411, 1996.
- McComb, E. A; McReady, R. M. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. *Analytical Chemistry*, v. 29, n. 5, p. 819-821, 1957.
- Moreira, A. N; Moreira, A. S; Diaz, P. S; Vendruscolo, C. T, Del Pino, F. A. B. Rheological behaviour and chemical composition of the *Beijerinckia* sp. 7070 bacterial biopolymer produced by an enzymatic pathway. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 8, n. 2, p. 135-142, 2005.
- Moreira, A. da S. *Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de Xanthomonas campestris pv pruni*. 2002, 75p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- 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.
- Muro, M. A; Luchi, M. R. *Preservação de Microrganismos*. Editora da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, Campinas, Brazil; 1989.
- Ohtani, K; Yasuda, S; Hiruta, O; Uotani, K; Tatsuta, K; Misaki, A. Characterization of an Extracellular Polysaccharide Elaborated by TX-1, a New Strain of *Beijerinckia indica*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 59, n. 9, p. 1628-1631, 1995.
- Padilha, F. F; Vendruscolo, J. L; Dellagostin, O. A; Scamparini, A. R. P; Vendruscolo, C. T. Studies on production and rheology of a polysaccharide synthesized by *Beijerinckia* sp. strain 7070. In: K. Nishinari, *Hydrocolloids. Part 1. Physical Chemistry and Industrial Application of Gels Polysaccharides and Proteins*. Osaka, Japan: Osaka University; 2000, p. 179-185.
- Petrobras. Norma Técnica N-2605 A - *Ensaio de viscosificante para fluidos usados na exploração e produção de poços de petróleo e gás*. 2003.
- Petrobras. Norma Técnica N-2604 A - *Viscosificante para fluidos usados na exploração e produção de poços de petróleo e gás*. 2003.

- Pinto, E. P. *Desacetilação de xantana: influência no comportamento reológico*. 2005, 94p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Pinto, E. P.; Moreira, A. S.; Vendruscolo, C. T. Influência do pH, Adição de Sais e Temperatura na Viscosidade dos Biopolímeros Produzidos por *Beijerinckia* sp cepas 7070 e UR4. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 8, n. 3, p. 247-251, 2002.
- Sandford, P. A.; Baird, J. Industrial utilization of polysaccharides. In: S. O. Aspinall. *The Polysaccharide*. Ed. Academic Press, New York, v. 2, p. 412-490, 1983.
- Scamparini, A. R. P.; Mariuzzo, D.; Fujihara, H.; Jacobusi, R.; Vendruscolo, C. T. Structural studies of CV-70 polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 21, p. 115-121, 1997.
- Shah, A. K.; Ashtaputre, A. A. Evaluation of rheological properties of the exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS-1 for application in oil exploration. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 442-445, 1999.
- Shatwell, K. P.; Sutherland, I. W.; Ross-Murphy, S. B. Influence of acetyl and Pyruvate substituents on the solution properties of xanthan polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 12, p. 71-78, 1990.
- Smith, I. H.; Symes, K. C.; Lawson, C. J.; Morris, E. R. Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 3, p. 129-134, 1983.
- Sloneker, J. H.; Jeanes, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Part I: Constitution. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 40, p. 2066-2071, 1962.
- Sloneker, J. H.; Orentas, D. G. Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide. *Nature*, v. 194, n. 4827, p. 478-479, 1962.
- Souza, A. S.; Vendruscolo, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepas 24 e 58. *Ciência e Engenharia*, v. 8, n. 2, p. 115-123, 1999.
- Sutherland, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, v. 11, p. 663-674, 2001.
- Sutherland, I. W. Xanthan. In: *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 1993, p. 399.
- Teixeira, A. M. *Tempo de fermentação na produção e qualidade de xantana e no perfil eletroforético de X. campestris pv pruni*. 2005, 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Thomas, J.E. *Fundamentos da Engenharia de Petróleo*, 1ªed., Rio de Janeiro: Interciência, p. 55-87, 2001.
- Vendruscolo, C.T. *Produção e caracterização do biopolímero produzido por Beijerinckia sp. isolada do solo da região de Ribeirão Preto-SP Brasil*. Campinas, 1995. 143f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Vendruscolo, C.T.; Scamparini, A.R.P. Gellan gum – production and properties. In: Nishinari, K.; Doi, E. (Ed) *Food hydrocolloids*, New York: Plenum Press, 1993.
- Villain-Simonnet, A.; Milas, M.; Rinaudo, M. Comparison between the physicochemical behaviour of two microbial polysaccharides: RMDP17 and rhamnan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 26, p. 55-62, 1999.
- Xu, X.; Liu, W.; Zhang, L. Rheological behavior of Aeromonas gum in aqueous solutions. *Food Hydrocolloids*, v. 20, p. 723-729, 2006.
- Wang, F.; Wang, Y.; Sun, Z. Food chemistry and toxicology: conformational role of xanthan gum in its interaction with guar gum. *Journal of Food Science*, v. 67, n. 9, p. 3289-3295, 2002.

4 Artigo 2

Regimes Dinâmicos de Concentração de Biopolímeros por Espalhamento de Luz Dinâmico

Este artigo será submetido à revista International Journal of Biological
Macromolecules.

REGIMES DINÂMICOS DE CONCENTRAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

P. S. Diaz^{a,*}, R. C. Michel^b, R. F. T. Lomba^c, C. T. Vendruscolo^a

^aCentro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil. Caixa postal 354, CEP 96010 900.

^bInstituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. Caixa postal 68525, CEP 21945 970.

^cTecnologia de Engenharia de Poço, Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello, Petrobras, Rio de Janeiro, Brasil. CEP 21949 900.

Resumo

Os regimes de concentração das soluções de xantana, clairana e tara, foram examinadas por espalhamento de luz dinâmico, através da determinação das concentrações que limitam estes regimes. Duas metodologias foram aplicadas na determinação das concentrações de sobreposição (c^*) e de agregação (c^{**}). A primeira metodologia foi baseada no comportamento do coeficiente de difusão em função da concentração das soluções. Para analisar os resultados, foi proposta uma curva teórica do coeficiente de difusão em função da concentração. Aplicando esta metodologia, foi possível determinar c^* e c^{**} para a xantana e tara, mas não para a clairana, que apresentou curva irregular. Foram analisadas as curvas de distribuição dos tempos de relaxação (DTR) para diversas concentrações das soluções de xantana e tara. Estas curvas apresentaram diferente número de modos de relaxação, sendo observado que as concentrações nas quais o número de modos mudou corresponderam às concentrações c^* e c^{**} , determinadas utilizando a metodologia anterior. Foram então obtidas as curvas de DTR para a clairana, sendo possível determinar as concentrações críticas, bem como os regimes de concentração.

Palavras-chave: regimes de concentração, concentração crítica, polissacarídeos, espalhamento de luz.

1. Introdução

No estudo de material polimérico em solução é importante conhecer a dependência entre a concentração e as propriedades dinâmicas e estáticas da macromolécula, em particular, da mudança do comportamento da molécula em solução quando passa do regime diluído para o semidiluído e deste para o concentrado (Ying & Chu, 1987).

A determinação dos regimes de concentração para biopolímeros permite conhecer o comportamento destes em solução e assim prever uma correta aplicação. Ainda, permite que amostras sejam preparadas nas condições requeridas para cada tipo de análise. Deste modo, propriedades como raio hidrodinâmico, raio de giração, comprimento de persistência, massa molar e polidispersão, podem ser determinadas adequadamente.

De acordo com a literatura existem três regimes dinâmicos de concentração para uma solução polimérica em um bom solvente: diluído, semidiluído e concentrado (Doi & Edwards, 1986). Basicamente, a diferença entre os regimes está relacionada às interações das macromoléculas em solução.

Muitos polissacarídeos, quando em solução, apresentam-se em conformação de novelo aleatório, cuja forma flutua continuamente devido ao movimento Browniano. Uma maneira simples para entender as propriedades das soluções é conhecer a fração de espaço ocupado pelo polímero. Em baixas concentrações, as cadeias individuais em conformação de novelo aleatório estão bem separadas umas das outras e livres para se moverem de maneira independente. Com o aumento da concentração começam a se tocar e após, somente acomodam-se através de sobreposição e interpenetração de umas com as outras. Nestas condições as cadeias individuais movem-se com maior dificuldade devido à rede formada com as cadeias vizinhas (Morris, 1995).

A concentração na qual ocorre a transição do regime diluído para o semidiluído, em soluções poliméricas, é o ponto em que cada molécula em solução está em contato com as moléculas vizinhas. A concentração em que moléculas individuais de polímero começam a interagir fisicamente é definida como concentração crítica de sobreposição, c^* (*crossover concentration* ou *overlap concentration*) (Doi & Edwards, 1986). O conceito de c^* , introduzido por De Gennes, é baseado na teoria de que os novos poliméricos em solução, em seu estado imóvel, ocupam um volume hidrodinâmico onde, acima da concentração crítica, ocorre o empacotamento entre as moléculas (Rodd, Dunstan & Boger, 2000). O aumento da concentração no regime semidiluído leva à contração das moléculas em solução.

A transição de solução semidiluída para concentrada é chamada de concentração crítica de agregação, c^{**} , na qual as moléculas não podem mais se contrair com o aumento da concentração. Devido a isto, ocorre a formação dos agregados (Nash, Pinder, Hemar & Singh, 2002). A concentração de sobreposição é determinada por dois fatores: o número de cadeias presentes (proporcional à concentração) e o volume que cada uma ocupa (Morris, 1995).

Hofer (1991) definiu que uma solução de polímero é diluída quando a distância entre as cadeias individuais de polímero é muito maior que a extensão da cadeia dada pelo raio de giração. O espaço ocupado pelo polímero é muito menor que o volume disponível. Em termos práticos, significa que os segmentos de diferentes cadeias não se sobrepõem. A solução é semidiluída quando as esferas contendo o raio de giração de cada cadeia individual de polímero se sobrepõem. A concentração de sobreposição (c^*) é definida como a concentração na qual os espaços disponíveis na solução são ocupados pelos novos poliméricos.

Launay, Cuvelier e Martinez-Reyes (1997), relacionam as concentrações ao início (c^*) e ao final (c^{**}) a um fenômeno progressivo de redução do novo polimérico provocado pelo aumento dos espaços ocupados.

A xantana é um exopolissacarídeo produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas*. A xantana comercial é produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, porém outras espécies são capazes de produzir a xantana como *Xanthomonas phaseoli*, *juglandis* e *arboricola*. É um heteropolissacarídeo composto de repetidas unidades pentassacarídicas sendo a cadeia principal formada por unidades de β -D-glicose ligadas na posição um e quatro, e os trissacarídeos ligados lateralmente são compostos por uma unidade de ácido D-glicurônico (α 1-2), duas unidades de manose ligadas na posição do C-3 e por resíduos de glicose ligados (α 1-3) na cadeia principal (Jansson, Kenne & Lindberg, 1975; Melton *et al.*, 1976). A molécula passa por uma transição na conformação de dupla hélice ordenada para desordenada quando submetida a modificações na força iônica, pH e temperatura da solução (Morris, 1995). A conformação ordenada da xantana é semiflexível (Holzwarth, 1978; Ross-Murphy, Morris & Morris, 1983), e a desordenada apresenta-se altamente estendida devido às repulsões eletrostáticas das cargas das cadeias laterais. Sendo a estrutura altamente estendida, as moléculas podem alinhar-se e associar-se (Rochefort & Middleman, 1987).

A amostra de xantana utilizada no presente trabalho foi produzida pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* cepa 06. Várias cepas deste patovar têm sido isoladas pelos pesquisadores do Centro de Pesquisas Agropecuárias de Clima Temperado (EMBRAPA – CPACT – Pelotas). Estas cepas têm sido estudadas com relação a produção e propriedades do biopolímero no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (Antunes *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2001; Moreira, 2002; Pinto, 2005). A produção de biopolímero utilizando a bactéria *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* possui patente registrada no Brasil (INPI, 2006).

Algumas das bactérias do gênero *Beijerinckia* possuem a capacidade de produzir exopolissacarídeos, os quais podem apresentar diferentes composições, dependendo da espécie (Kang & McNelly, 1977). A clairana é o biopolímero sintetizado pela bactéria *Beijerinckia* sp cepa 7070. A composição química da clairana foi determinada por Scamparini *et al.* (1997) sendo composta pelos monossacarídeos glicose, galactose e fucose na razão de 3:1:3, respectivamente.

A cepa utilizada neste trabalho foi isolada do solo canavieiro do município de Ribeirão Preto (São Paulo – Brasil) por Vendruscolo (1995). A produção e propriedades do biopolímero têm sido pesquisadas extensivamente (Moreira, Souza & Vendruscolo, 1998; Padilha, Dellagostin & Vendruscolo, 1998; Pinto, Moreira & Vendruscolo, 2002; Moreira, Del Pino & Vendruscolo, 2003; Borges *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2005).

A tara é uma galactomanana extraída por moagem do endosperma das sementes da leguminosa *Ceretonia siliqua* (L) (FSANZ, 2005). É um polissacarídeo neutro, sendo sua cadeia principal linear formada por unidades de manose e cadeia lateral por uma unidade de galactose na razão de 3:1. A tara difere das demais galactomananas na razão entre as unidades de manose e galactose (M/G). A guar apresenta razão M/G de 2:1 e a locusta de 4:1 (Ruiz-Angel *et al.*, 2002). As unidades de galactose estão distribuídas aleatoriamente na cadeia principal (FSANZ, 2005). As propriedades das soluções diluídas das galactomananas foram estudadas por medidas de viscosidade. As soluções aquosas comportaram-se com conformação desordenada com alguns graus de rigidez (Laguna, Tarazona & Saiz, 2003). São usualmente aceitas como sendo polímeros semiflexíveis na forma desordenada (novelos aleatórios) e, sob condições controladas, formam soluções de entrelaçamentos não associativos (Picout *et al.*; 2001).

A determinação do regime de concentração é um aspecto importante do trabalho preliminar e ilustra a natureza complicada na qual se comporta a xantana em solução, por isso, as soluções de xantana são um dos sistemas de polissacarídeos mais intensivamente estudados com relação as propriedades reológicas e físico-químicas (Rodd, Dunstan & Boger, 2000). O comportamento e as propriedades das soluções de xantana nos diferentes regimes de concentração foram extensivamente estudados (Dintzis, Babcock & Tobin, 1970; Southwick, Jamieson & Blackwell, 1982; Cuvelier & Launay, 1986; Milas *et al.*, 1990; Launay, Cuvelier & Martinez-Reyes, 1997; Esquenet & Buhler, 2002).

As técnicas para determinação de c^* e c^{**} mais utilizadas são análises reológicas e espalhamento de luz. O espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering* - DLS) pode ser usado para traçar a difusividade das moléculas em solução em uma escala de concentrações. Southwick, Jamieson e Blackwell (1982), Coviello *et al.* (1987), Tinland, Maret e Rinaudo (1990) e Rodd, Dunstan e Boger (2000) avaliaram a c^* por aplicação de técnicas de espalhamento de luz, analisando a tendência do coeficiente de difusão aparente. Coviello *et al.* (1986) examinaram por espalhamento de luz estático e dinâmico, amostras de xantana nativa e modificada e comentaram sobre a ambigüidade na determinação de c^* para moléculas semiflexíveis. Sugeriram que o valor obtido é freqüentemente dependente da técnica experimental e interpretação dos dados.

Em reologia, c^* de uma solução polimérica pode ser definida como aquela, a partir da qual, se observa um desvio da linearidade na relação $\log \eta \times \log c[\eta]$, isto é, quando a inclinação da curva modifica-se (Rodd, Dunstan & Boger, 2000). O parâmetro $c[\eta]$. (“*dimensionless coil overlap parameter*”) pode ser definido como sendo a medida da fração em volume do polímero presente na solução. A inclinação observada é de aproximadamente um no regime diluído e entre três e quatro no regime semidiluído, dependendo da rigidez da molécula (Lapasin *et al.*, 1990). A modificação na inclinação ocorre devido a mudanças nas propriedades de escoamento, pois, acima de c^* há formação de entrelaçamentos intermoleculares, e abaixo de c^* as cadeias estão livres para se moverem individualmente.

O presente trabalho teve como objetivo acompanhar o comportamento dinâmico dos biopolímeros em solução, a fim de determinar os regimes dinâmicos de concentração através das concentrações críticas de sobreposição (c^*) e de agregação (c^{**}).

2. Materiais e Métodos

2.1 Biopolímeros

A amostra de xantana foi sintetizada pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv pruni cepa 06, fornecida pelo Centro de Pesquisa Agropecuária Clima Temperado (CPACT-EMBRAPA), localizado na cidade de Pelotas (Rio Grande do Sul, Brasil), a qual, neste trabalho, será denominada de Xc 06. A amostra de clairana foi sintetizada com a bactéria *Beijerinckia* sp. cepa 7070, a qual foi isolada do solo canavieiro do município de Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil) por Vendruscolo (1995).

A bactéria *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* foi mantida por repiques mensais em meio YM (Haynes, Wickerham & Hesseltine, 1955) e armazenada a 4°C, de acordo com Muro e Luchi (1989). A bactéria *Beijerinckia* sp. foi mantida liofilizada em ampolas. Nesse processo, a suspensão bacteriana, com 1×10^{10} UFC/mL, acrescida de crioprotetor, foi conservada através da dessecação a pressões sub-atmosféricas. Após a abertura da ampola, a bactéria foi mantida por repiques mensais, como descrito acima.

A produção de células foi realizada em meio YM e os frascos foram incubados em agitador orbital (New Brunswick, Scientific, modelo Innova 4230). Os inóculos continham aproximadamente 2×10^9 UFC.mL⁻¹, conforme recomendado por Pan, Moreira e Vendruscolo, (2000). A produção dos biopolímeros foi realizada em biorreator de bancada (B. Braun Biotech. Inc., modelo Biostat B) utilizando vaso de 10L.

No processo pós-fermentativo foi realizada a centrifugação (Sorvall Instruments RC-5C) a 16.000g, durante 45 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado etanol 96°GL na proporção 1:4 e após, foi seco em estufa a 56°C e triturados em moinho de disco (Fritsch, Pulverisette).

A goma tara foi fabricada pela empresa Exportadora El Sol (Perú) e distribuída no Brasil pela empresa Metachem Industrial e Comercial Ltda, a qual forneceu a amostra para este trabalho.

2.2. Preparo das Soluções

As três amostras de biopolímeros para a análise de espalhamento de luz dinâmico foram preparadas por solubilização em água destilada e deionizada em concentração de 5g.L⁻¹ e adição de 1×10^{-3} g.L⁻¹ de azida sódica, em agitador magnético por 16 horas a 50°C. A clarificação das amostras foi realizada por filtração em membranas de ésteres mistos de nitrato de celulose e acetato de celulose (Millipore – Millipore Corporation) com tamanho de poro variando de 3,0µm a 0,45µm, sob pressão controlada. A concentração final das soluções foi verificada por gravimetria. A partir da solução estoque, foram preparadas diluições, utilizando o mesmo solvente, sob agitação magnética por uma hora, e armazenadas por 16 horas sob refrigeração. A concentração das soluções dos biopolímeros foi variada em uma faixa em que estivessem contidos os diferentes regimes dinâmicos de concentração.

2.3. Espalhamento de Luz Dinâmico

Espalhamento de luz dinâmico (DLS) é uma técnica não perturbativa usada para medir o coeficiente de difusão de moléculas em solução. O coeficiente de difusão, o qual tem dimensões de $(\text{comprimento})^2/\text{tempo}$, é uma medida média da trajetória difusional de uma molécula individual.

As medidas de espalhamento de luz foram realizadas utilizando o analisador de tamanho de partículas Malvern Nanosizer ZS (Malvern Instruments Ltd., UK). As amostras foram analisadas em cubeta de vidro com, pelo menos, 5 repetições para verificar a repetibilidade. Todas as análises foram realizadas a 25°C. O ângulo de detecção da luz espalhada foi de 173°, denominado de retro-espalhamento. O Nanosizer ZS utiliza um laser He-Ne de 4mW, operando em um comprimento de onda (λ_0) de 633nm.

A viscosidade do solvente (água destilada e deionizada) é 0,8872mPa.s e o índice de refração (RI) é 1,330. A viscosidade das amostras foi assumida como 0,8872mPa.s, o índice de refração (RI) como 1,330 e a absorção (luz absorvida pelas partículas na dispersão) com o valor de 0,001.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o *Dispersion Technology Software 5.00* (Malvern Instruments Ltd., UK). Os valores dos coeficientes de difusão translacional foram calculados a partir da análise por cumulantes, conforme definido na ISO13321 (1996).

3. Resultados e discussões

Para determinar os regimes de concentração é necessário identificar as concentrações críticas c^* e c^{**} , as quais marcam a passagem do regime diluído para semidiluído e deste para o concentrado.

3.1. Avaliação das Curvas dos Coeficientes de Difusão Translacional Médios.

Com o intuito de melhor entender os fenômenos dinâmicos que ocorreram nas soluções dos biopolímeros em cada regime de concentração, bem como as modificações devido às transições entre eles, foi construída uma curva teórica do comportamento do coeficiente de difusão translacional em função da concentração, a qual é apresentada na Fig 1. Esta curva foi construída baseando-se nos resultados obtidos neste trabalho e nas curvas apresentadas por Rodd, Dunstan e Boger (2000) com ângulo de espalhamento de luz de 40° e 90°.

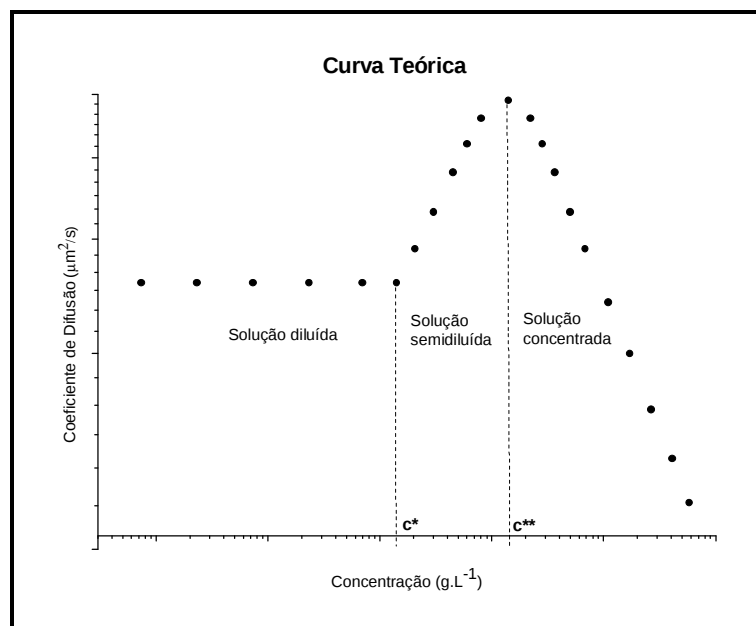


Fig.1. Curva teórica do comportamento do coeficiente de difusão em função da concentração com ângulo de detecção da luz espalhada de 173° .

Southwick *et al.* (1980) definem que uma solução é diluída quando a sobreposição intermolecular não afeta a difusão translacional das moléculas, isto é, $c < c^*$. A Fig. 1 apresenta que, em concentrações muito diluídas (soluções com concentração tendendo a zero, i.e., $c \rightarrow 0$) o coeficiente de difusão translacional não se modifica com o aumento de concentração, isto é, as moléculas estão livres para moverem-se individualmente, pois não ocorrem interações intermoleculares. Cada macromolécula em uma solução muito diluída, em um bom solvente, possui uma tendência a excluir todas as outras do volume que ela ocupa. A partir deste fenômeno é definido o termo volume excluído, o qual é o resultado da repulsão entre moléculas do polímero devido a requisitos espaciais. Devido a isto, as propriedades físicas médias da solução não são alteradas, logo, os valores do coeficiente de difusão translacional mantêm-se iguais, definindo um platô.

Aumentando a concentração a partir de $c \rightarrow 0$, aumenta o número de cadeias de polímero livres na solução. Isto faz com que a distância entre as cadeias diminua e as posições que cada uma ocupa na solução começam a ser restringidas pela presença de outras moléculas. A restrição ocorre devido ao volume excluído de cada uma. A movimentação livre das moléculas cessa quando, em determinada concentração, não há mais espaço disponível entre as cadeias poliméricas, isto é, o volume excluído de uma cadeia toca o volume excluído da outra. Deste modo, a movimentação de uma molécula fica dependente da movimentação da

molécula vizinha. Esta é a concentração que limita os regimes diluído e semidiluído (c^*). Nesta concentração consideramos que não há nenhum tipo de interação intermolecular.

A solução semidiluída apresenta $c^* < c < c^{**}$. Neste sistema o efeito do volume excluído desaparece devido à alta concentração de cadeias poliméricas. Deste modo, ocorrem as interações hidrodinâmicas, as quais são causadas pela movimentação das cadeias devido ao movimento Browniano. Esta movimentação causa movimento nas moléculas do solvente que levam a uma força friccional em outras partes da cadeia polimérica mediada pelo solvente. Esta interação entre as partes da cadeia polimérica domina muitos processos dinâmicos na solução, incluindo a difusão do polímero. Devido a estas interações, não é possível analisar a cadeia polimérica inteira e então aplica-se o modelo de *blobs* para tal finalidade. Neste modelo a cadeia polimérica é vista como um conjunto de esferas ou *blobs*, com raio ξ_h , onde o movimento de cada *blob* não é correlacionado com o dos outros (De Gennes, 1976).

A dinâmica de uma cadeia polimérica quando está rodeada por outras cadeias, como ocorre no regime semidiluído, pode ser explicada pelo fenômeno de reptação, proposto por De Gennes (1971), se as moléculas estiverem em conformação desordenada, ou explicada por limitações topológicas, segundo proposta de Doi e Edwards (1986), se a forma for de bastões rígidos. Considerando-se que os biopolímeros xantana e tara, quando em solução aquosa e em determinadas condições, são aceitos como sendo polímeros semiflexíveis e em conformação desordenada (Morris, 1995; Picout *et al*; 2001; Laguna, Tarazona & Saiz, 2003), sua dinâmica pode ser explicada segundo o fenômeno de reptação. A conformação e o grau de flexibilidade do biopolímero clairana ainda não foram estudados.

O fenômeno de reptação assume que uma determinada cadeia sofre reptação através do emaranhado de cadeias circundantes. Isto significa que a cadeia polimérica está essencialmente confinada pelas cadeias circundantes em um tubo curvilíneo imaginário ao longo de seu contorno, por um pequeno período de tempo. Conseqüentemente, a difusão transversal é zero e a cadeia propaga-se efetivamente por difusão unidimensional ao longo do eixo de seu contorno.

Acima de c^* , a difusão via reptação torna-se o mecanismo dominante na solução polimérica. Com o aumento da concentração, diferentes cadeias interpenetram-se progressivamente causando aumento no coeficiente de difusão de cada *blob*. Segundo De Gennes (1979), o principal fenômeno é o decréscimo do tamanho do *blob* com o aumento da

concentração, pois o maior número de moléculas na solução promoveu a ocorrência de interações intermoleculares, formação de entrelaçamentos e contração estrutural.

A transição de solução semidiluída para concentrada é chamada de concentração crítica c^{**} , na qual as moléculas atingiram sua contração máxima. Devido a isto, ocorre a formação dos agregados (Nash, Pinder, Hemar & Singh, 2002). Em concentrações superiores a c^{**} , ocorrem interações polímero-polímero, as quais causam menor mobilidade das moléculas na solução. Deste modo, com o acréscimo gradual na concentração ocorre decréscimo no coeficiente de difusão translacional e, se propõe que este comportamento represente o regime concentrado. Considera-se que c^{**} depende do tipo de polímero, especialmente de sua rigidez intrínseca, da massa molar e da qualidade do solvente (Launay, Cuvelier & Martinez-Reyes, 1997). Milas *et al.* (1990) especularam que c^{**} representa o começo de um domínio de concentração onde uma distribuição uniforme de segmentos poliméricos está presente no volume da solução.

A literatura apresenta diferentes metodologias para a determinação das concentrações críticas. Rodd, Dunstan e Boger (2000) determinaram a c^* estimando uma variação de 5% no coeficiente de difusão a partir do valor obtido em diluição infinita, isto é, variando a partir do platô de difusão. A c^{**} foi determinada no ponto de mínimo detectado para o coeficiente de difusão, conforme Fig. 2. Tinland, Maret e Rinaudo (1990) estimaram c^* utilizando a condição de que a distância média entre os centros de massa das cadeias é igual a extensão média da cadeia (na ordem de Rg^3) e que, nesta concentração, só existe uma cadeia por volume hidrodinâmico. Deste modo, utilizaram a equação:

$$c^* = \frac{mL}{Rg^3}$$

onde m é a massa por unidade de comprimento de polímero e L o comprimento de contorno. Para c^{**} , utilizaram a dinâmica de reptação e o cálculo foi realizado pela equação:

$$c^{**} = \frac{3m}{2P^2}$$

onde P é o comprimento de persistência. Southwick, Jamieson e Blackwell (1982), determinaram c^* utilizando duas metodologias. O valor calculado foi determinado utilizando a definição de que a solução é diluída quando as moléculas de polímero estão separadas por pelo menos um diâmetro molecular, o qual corresponde a aproximadamente 10% de ocupação pela esfera do polímero e, nesta base, a solução diluída de xantana ocorre quando:

$$c \cong 0,1M \left(\frac{4}{3} \right) \pi R_H^3 N_A$$

onde M é a massa molar, R_H o raio hidrodinâmico e N_A o número de Avogadro. O valor observado foi determinado pela inclinação da curva do coeficiente de difusão em função da concentração da solução de xantana.

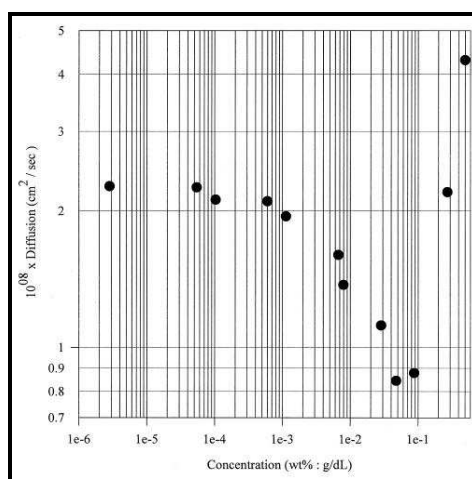


Fig. 2. Curva do coeficiente de difusão *versus* concentração, em $\theta = 40^\circ$, para xantana em solução de 5g.L^{-1} de NaCl. Fonte: Rodd, Dunstan & Boger, 2000.

Em experimentos de DLS, o ângulo de detecção da luz espalhada tem influência sobre os resultados obtidos. Os resultados apresentados por Rodd, Dunstan e Boger (2000) mostraram que em ângulo de 40° a curva de coeficiente de difusão *versus* concentração apresenta um mínimo, o qual não foi observado em ângulos entre 60° e 100° . O equipamento utilizado no presente trabalho realiza as medidas em ângulo de 173° , no qual não foi possível observar o mínimo da curva.

De acordo com Ying e Chu (1987), as propriedades dinâmicas das macromoléculas tendem a apresentar uma modificação abrupta na passagem do regime diluído para o semidiluído, quando estas apresentam-se em conformação desordenada ou na forma de bastão. Neste trabalho as concentrações críticas foram determinadas nos pontos onde ocorreu modificação na inclinação da curva formada pelo coeficiente de difusão em função da concentração das soluções de biopolímeros.

A Fig. 3 apresenta a curva do coeficiente de difusão para uma faixa de concentrações de goma tara. Foi verificado que esta apresentou comportamento semelhante ao da curva

teórica apresentada na Fig. 1. Nas concentrações muito diluídas ($c \rightarrow 0$) foi observado um platô do coeficiente de difusão em torno do valor de $2,5\mu\text{m}^2/\text{s}$. Aumentando a concentração, ocorreu aumento no coeficiente de difusão até determinada concentração a partir da qual, com a continuidade da elevação da concentração, ocorreu decréscimo do coeficiente de difusão. Deste modo, foi possível determinar os regimes de concentração da solução e, conseqüentemente, as concentrações críticas (c^* e c^{**}).

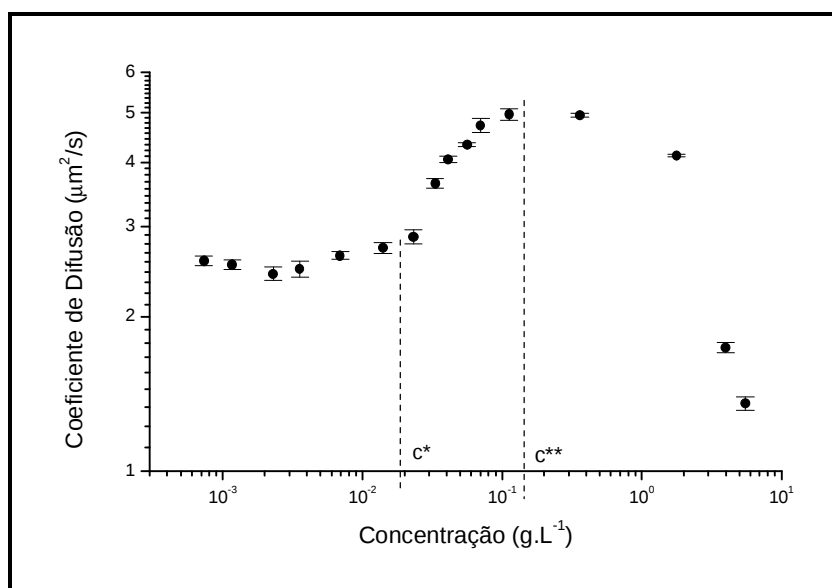


Fig. 3. Determinação de c^* e c^{**} por medidas do coeficiente de difusão em função da concentração para tara.

As concentrações críticas determinadas para a goma tara foram de $1,8 \times 10^{-2} \text{g.L}^{-1}$ para a concentração crítica de sobreposição (c^*) e de $1,3 \times 10^{-1} \text{g.L}^{-1}$ para a de agregação (c^{**}). Deste modo, consideramos que a solução está em regime diluído em $c < 1,8 \times 10^{-2} \text{g.L}^{-1}$, semidiluído em $1,8 \times 10^{-2} \text{g.L}^{-1} < c < 1,3 \times 10^{-1} \text{g.L}^{-1}$ e concentrado quando $c > 1,3 \times 10^{-1} \text{g.L}^{-1}$.

A goma tara é um polissacarídeo que tem sua produção restrita ao seu país de origem, o Peru. Por esta razão, a literatura não registra determinação das concentrações c^* e c^{**} por espalhamento de luz dinâmico para a goma tara, entretanto, valores para as galactomananas determinados por análises reológicas são encontrados. Sittikijyothin, Torres e Gonçalves (2005) determinaram c^{**} por análises reológicas para a goma tara em $5,2 \text{g.L}^{-1}$ e para goma locusta em $7,0 \text{g.L}^{-1}$. Andrade *et al.* (1999) apresentaram valor de c^* igual a $2,4 \text{g.L}^{-1}$ para goma locusta. Launay, Cuvelier e Martinez-Reyes, (1997) determinaram para goma guar c^*

de $0,55\text{g.L}^{-1}$ e c^{**} de $2,8\text{g.L}^{-1}$, enquanto Burke *et al.* (2000) apresentaram c^* de $4,0\text{g.L}^{-1}$. Os valores determinados por análise reológica são superiores aos determinados, neste trabalho, por espalhamento de luz dinâmico.

A Fig.4 apresenta a curva do coeficiente de difusão em função da concentração obtida para a amostra Xc 06. Foi verificado que a curva apresentou comportamento semelhante ao da curva teórica apresentada na Fig. 1. A curva apresentou um platô do coeficiente de difusão em concentrações tendendo a zero, no valor de $0,9\mu\text{m}^2/\text{s}$. Platô semelhante foi detectado nos experimentos desenvolvidos por Rodd, Dunstan e Boger (2000). Aumentando-se a concentração, o coeficiente de difusão apresentou elevação e, após determinada concentração, decréscimo. Assim, foram determinadas as concentrações críticas.

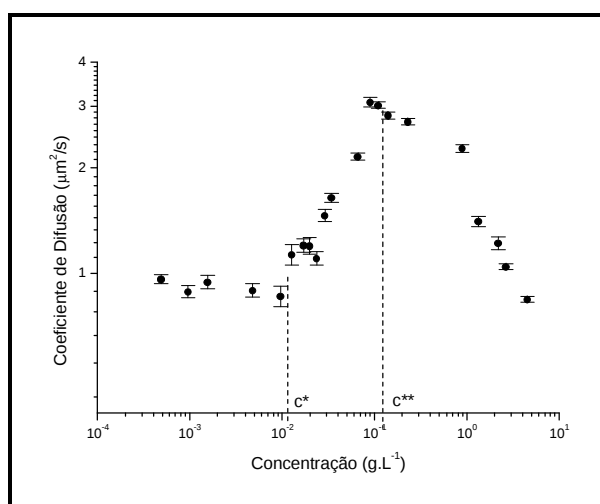


Fig. 4. Determinação de c^* e c^{**} por medidas do coeficiente de difusão em função da concentração para a Xc 06.

A concentração crítica de sobreposição (c^*) foi observada em $1,3 \times 10^{-2}\text{g.L}^{-1}$ e a de agregação (c^{**}) em $1,1 \times 10^{-1}\text{g.L}^{-1}$. Deste modo, consideramos que a solução está em regime diluído em $c < 1,3 \times 10^{-2}\text{g.L}^{-1}$, regime semidiluído em $1,3 \times 10^{-2}\text{g.L}^{-1} < c < 1,1 \times 10^{-1}\text{g.L}^{-1}$ e concentrado quando $c > 1,1 \times 10^{-1}\text{g.L}^{-1}$.

Holzwarth e Prestidge (1977) observaram que a agregação entre as moléculas de xantana ocorre em associações entre os finais das cadeias, enquanto Morris, Franklin e Lanson (1983), observaram que a associação entre as moléculas ocorre lado a lado.

Comparando os valores das concentrações críticas determinados no presente estudo, para a Xc 06, com os valores descritos na literatura, Tabela 1, foi observado que c^* e c^{**}

apresentaram valores menores que os determinados na literatura utilizando a técnica de reologia.

A teoria prevê que os valores obtidos para c^* e c^{**} , determinados por espalhamento de luz, possam ser diferentes dos determinados por análises reológicas. Este fato se deve ao cisalhamento que estas análises impõem. Lapasin e Pricl (1995) relataram que, para soluções de xantana, as forças cisalhantes dominarão o movimento Browniano em baixas taxas de cisalhamento, causando alinhamento molecular, resultando em uma solução que não inicia em um estado de movimento aleatório verdadeiro. Doi e Edwards (1986) apresentaram que, teoricamente, sob a aplicação de forças cisalhantes, moléculas na forma de bastão (*rod-like*) se alinharão em solução antes de ocorrer interação molecular. Este alinhamento das moléculas causa uma redução na fração de volume na direção do cisalhamento, consequentemente, as concentrações c^* e c^{**} ocorrem em concentrações superiores, em comparação aos resultados determinados por DLS. Embora as moléculas de xantana não possam ser consideradas com a forma de um bastão (Coviello *et al.*, 1987), sua forma estendida em solução sugere que o alinhamento das moléculas pode estar ocorrendo. Assim, a natureza semiflexível da xantana dificulta a determinação de c^* quando o cisalhamento é aplicado (Rodd, Dunstan & Boger, 2000).

Em comparação aos valores determinados na literatura por espalhamento de luz dinâmico, a c^* da amostra Xc 06 apresentou valor menor que os apresentados por Southwick, Jamieson e Blackwell (1982); Tinland, Maret e Rinaudo (1990). Esta diferença nos valores deve-se ao fato de que estes autores utilizaram metodologias diferentes da aplicada neste estudo para determinação de c^* , as quais foram expostas anteriormente. Entretanto, o valor de c^* para a Xc 06 está na mesma ordem de grandeza que os valores apresentados por Rodd, Dunstan e Boger (2000) e Rodd *et al.* (2001), obtidos utilizando a mesma metodologia empregada no presente estudo. A concentração crítica de agregação, c^{**} , também apresentou valor na mesma ordem de grandeza que os valores citados na literatura determinados por DLS.

Tabela 1

Valores das concentrações críticas de sobreposição (c^*) e de agregação (c^{**}) para soluções de xantana, citados na literatura.

Autores	Técnica	c^* (g.L ⁻¹)	c^{**} (g.L ⁻¹)
Southwick, Jamieson & Blackwell (1982)	DLS	1,15x10 ⁻¹ (calculado) 1,25x10 ⁻¹ (observado)	7,0x10 ⁻¹
Tinland, Maret & Rinaudo (1990)	DLS	4,0x10 ⁻¹	
Rodd, Dunstan & Boger (2000)	DLS	5,0x10 ⁻²	7,0x10 ⁻¹
Rodd <i>et al.</i> (2001)	DLS	6,0x10 ⁻²	
Nash, Pinder, Hemar & Singh, (2002)	DLS	---	6,0x10 ⁻¹
Cuvelier & Launay (1986)	Reologia	3,0x10 ⁻¹	1,1
Milas <i>et al.</i> (1990)	Reologia	1,26 (nativa) 1,0 (renaturada)	6,0 (nativa) 7,8 (renaturada)
Meyer <i>et al.</i> (1993)	Reologia	---	2,0
Esquenet & Buhler (2002)	Reologia	6,25x10 ⁻¹	----

A Fig. 5 apresenta a curva do coeficiente de difusão em função da concentração para a amostra de clairana. Observou-se nesta curva uma grande variação dos valores do coeficiente de difusão, o que representa um comportamento muito diferenciado daquele proposto na Fig. 1. Deste modo, não foi possível determinar as concentrações críticas c^* e c^{**} para a clairana, utilizando o método proposto.

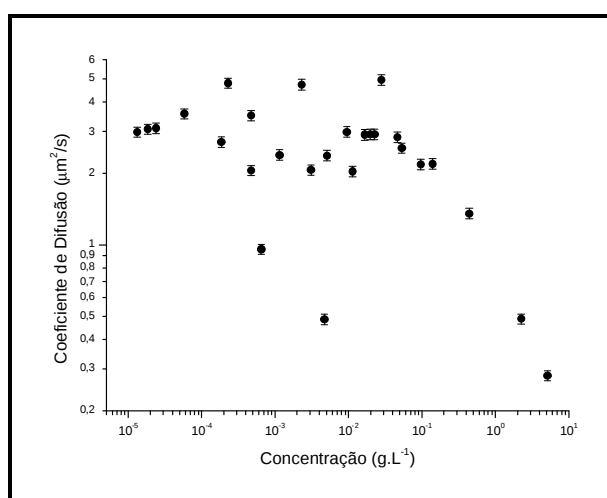


Fig. 5. Determinação de c^* e c^{**} por medidas do coeficiente de difusão em função da concentração para a clairana.

3.2. Avaliação das Curvas de Distribuição dos Tempos de Relaxação.

O tempo de relaxação ou o tempo de correlação da propriedade representa o tempo de decaimento característico da propriedade (Berne & Pecora, 2000) e é igual a $1/Dq^2$, onde D é o coeficiente de difusão e q é o vetor de espalhamento.

Na técnica de espalhamento dinâmico de luz é sabido que o processo de difusão translacional de uma partícula depende de seu tamanho, isto é, partículas grandes apresentam baixa velocidade de difusão e, partículas pequenas apresentam alta velocidade de difusão. Deste modo, as diferentes classes de tamanho de partículas presentes em uma amostra vão gerar diferentes classes do processo de difusão. Estes diferentes processos de difusão correspondem a uma determinada percentagem de partículas presentes na solução e, apresentam tempos de relaxação distintos. Deste modo, foi avaliado o efeito da variação da concentração das soluções dos biopolímeros sobre as distribuições dos tempos de relaxação (DTR) baseada na intensidade de luz espalhada.

A Fig. 6 apresenta a distribuição de tempos de relaxação em função da intensidade da luz espalhada, para várias concentrações, da amostra de goma tara.

Foi observado que, a cada regime de concentração corresponde um diferente número de modos na distribuição de tempos de relaxação, isto é, o regime concentrado apresenta uma distribuição de tempos de relaxação trimodal; o regime semidiluído apresenta distribuição bimodal, enquanto o regime diluído apresenta uma distribuição monomodal de tempos de relaxação.

Observou-se que, em cada regime de concentração, a redução da concentração da solução levou a um alargamento dos modos presentes nas curvas de distribuição e a aproximação entre esses modos. Essa aproximação entre os modos progrediu até que ocorreu a supressão de um destes modos. A concentração na qual esta supressão ocorreu corresponde a passagem por uma concentração crítica. A passagem de três para dois modos de tempos de relaxação corresponde a concentração de agregação, c^{**} , enquanto, a passagem de dois para um modo corresponde a concentração de sobreposição, c^* .

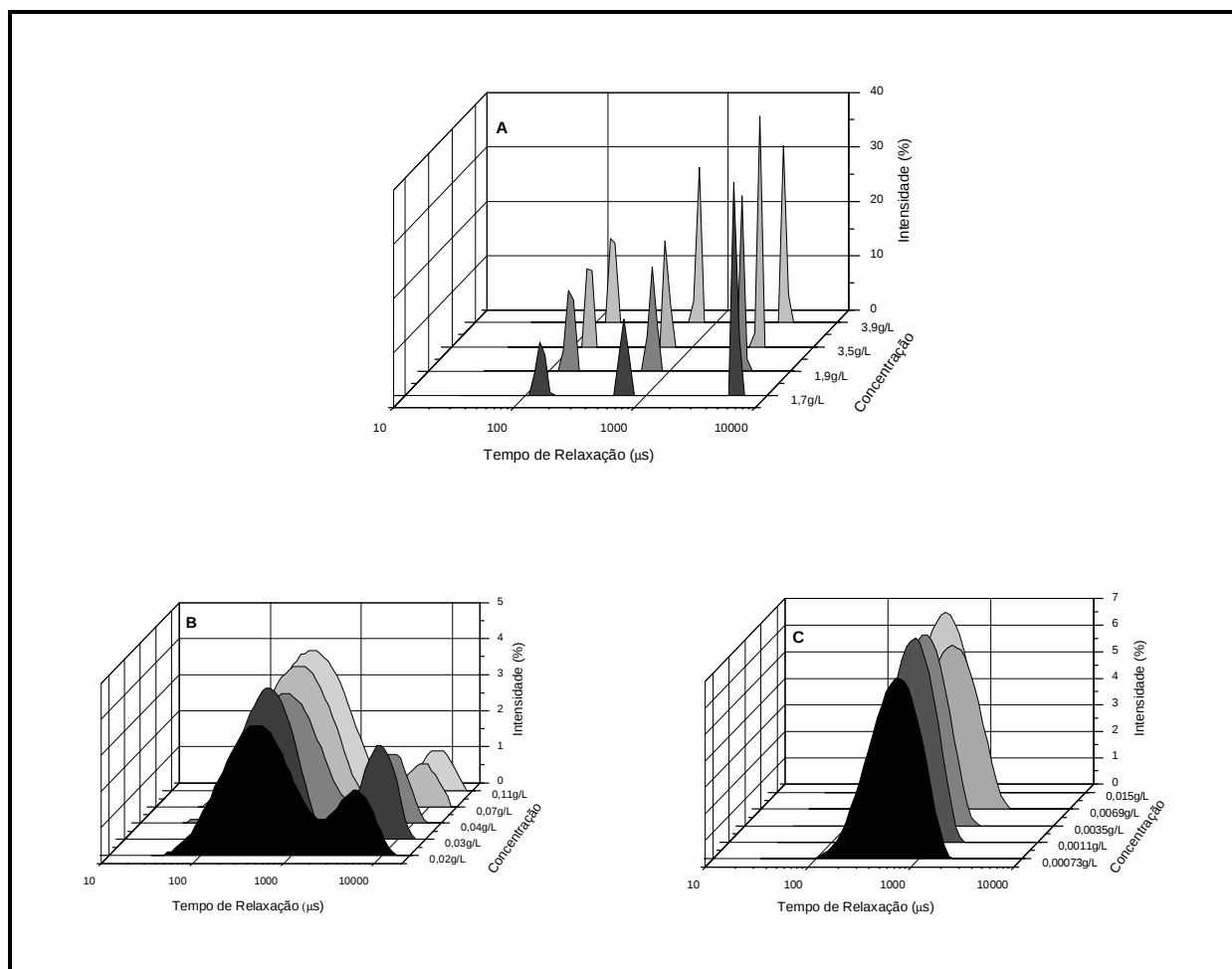


Fig. 6. Intensidade da luz espalhada em função dos tempos de relaxação para a tara nos regimes: (A) concentrado, (B) semidiluído e (C) diluído.

Realizou-se a análise das distribuições do tempo de relaxação para a amostra de Xc 06. Estes resultados são apresentados na Fig. 7, e o mesmo comportamento descrito para a goma tara foi verificado para a amostra Xc 06.

Southwick, Jamieson e Blackwell (1982) relataram que soluções com baixa concentração de xantana apresentaram modo de tempo de relaxação monomodal e em concentrações acima da c^{**} apresentaram comportamento bimodal. Este mesmo comportamento foi descrito por Nash *et al.*, (2002) e Esquenet e Buhler (2002).

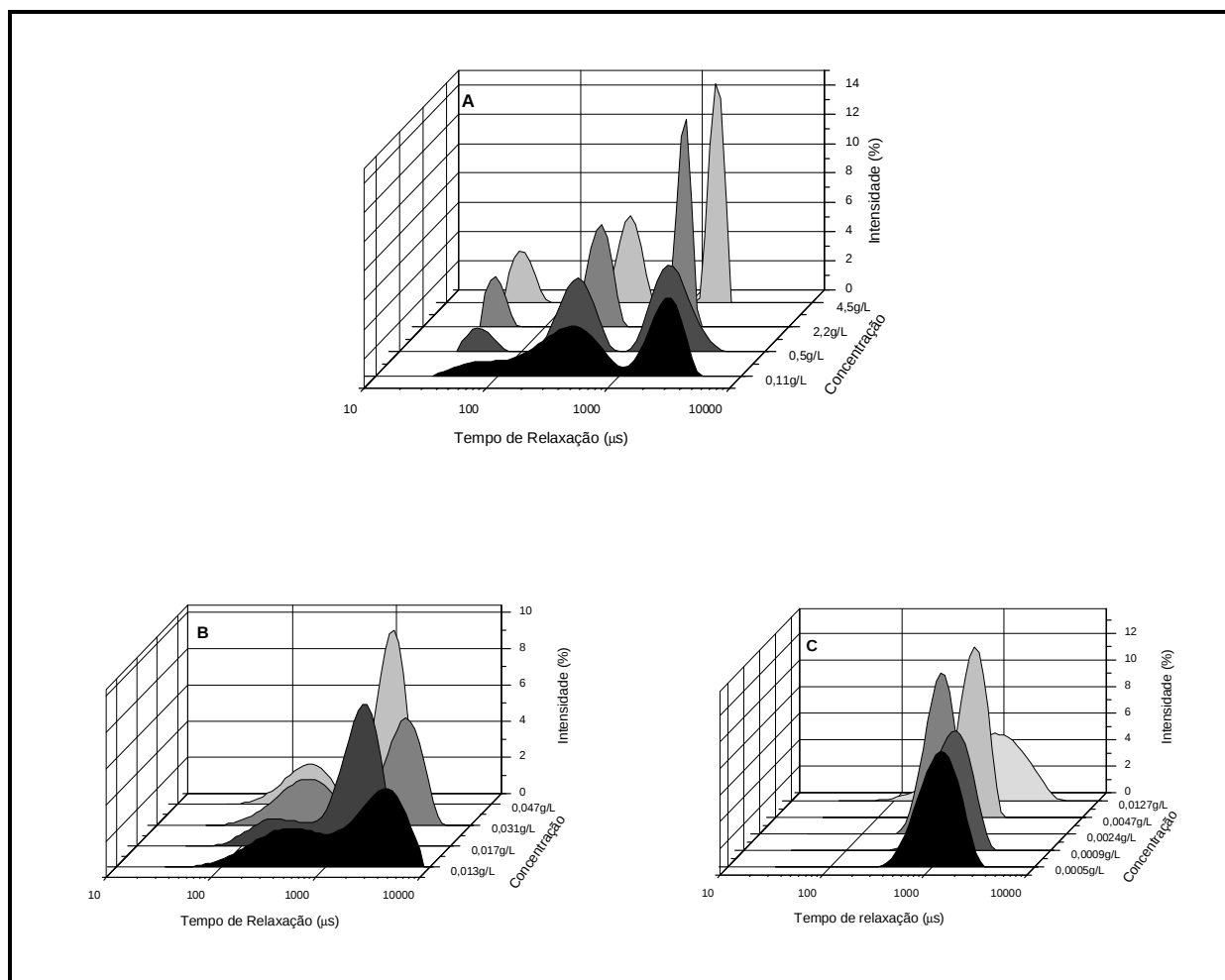


Fig. 7. Intensidade da luz espalhada em função dos tempos de relaxação para a Xc 06 nos regimes (A) concentrado, (B) semidiluído e (C) diluído.

Observou-se que as concentrações de sobreposição, c^* e c^{**} , determinadas por distribuição dos tempos de relaxação correspondem as concentrações de sobreposição e de agregação determinadas através das curvas do coeficiente de difusão translacional *versus* concentração, apresentadas nas Figs. 3 e 4, para as amostras de goma tara e Xc 06. Em função disso, propõe-se que a avaliação das curvas de DTR possam ser usadas como uma ferramenta alternativa na avaliação das curvas do coeficiente de difusão translacional na determinação de c^* e c^{**} .

Para testar esta proposta, aplicou-se o método de DTR ao experimento com a clairana, cujo resultado de c^* e c^{**} não pode ser obtido pela avaliação da curva do coeficiente de difusão translacional *versus* concentração.

A Fig. 8 apresenta as distribuições de tempos de relaxação *versus* concentração para a amostra de clairana, separadas de acordo com o número de modos de relaxação. Observou-se

que, as supressões de modos de relaxação ocorreram nas concentrações $4,1 \times 10^{-2} \text{g.L}^{-1}$, correspondendo a c^{**} e na $4,7 \times 10^{-3} \text{g.L}^{-1}$, correspondendo a c^* . A partir desses resultados, foram definidos os intervalos para os três regimes de concentração para a clairana. Deste modo, consideramos que a solução está em regime diluído em $c < 4,7 \times 10^{-3} \text{g.L}^{-1}$, semidiluído em $4,7 \times 10^{-3} \text{g.L}^{-1} < c < 4,1 \times 10^{-2} \text{g.L}^{-1}$ e concentrado quando $c > 4,1 \times 10^{-2} \text{g.L}^{-1}$.

A curva de DTR apresenta os diferentes modos de relaxação, os quais representam diferentes valores de coeficientes de difusão. Estes valores são representados na curva de coeficiente de difusão *versus* concentração por um único valor de difusão médio Z . No caso da clairana, as curvas de DTR levam a valores de difusão médio Z , para diferentes concentrações, que oscilam em torno de um valor central, por este motivo a curva do coeficiente de difusão *versus* concentração não foi similar ao modelo teórico proposto.

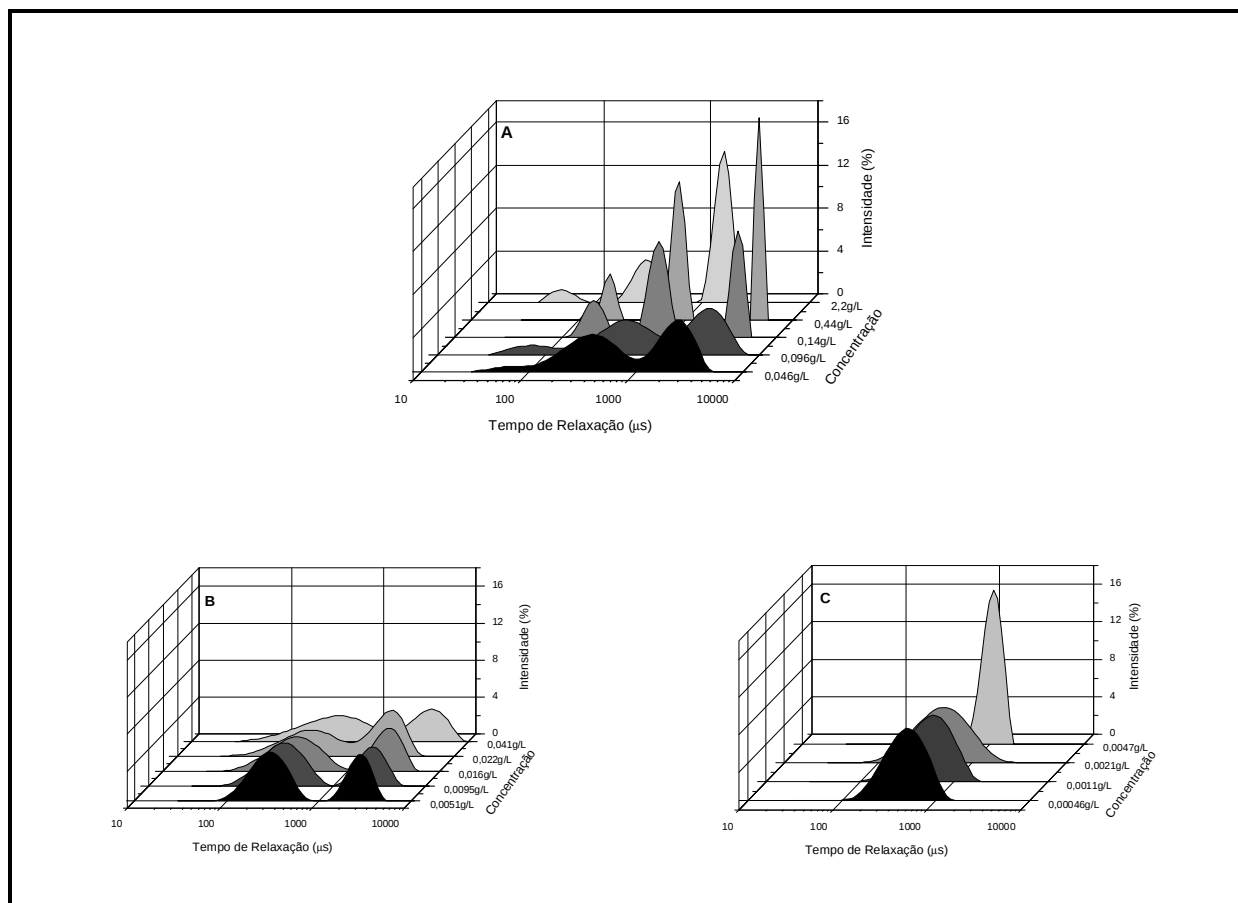


Fig. 8. Intensidade da luz espalhada em função dos tempos de relaxação para a clairana nos regimes (A) concentrado, (B) semidiluído e (C) diluído.

4. Conclusão

Os valores para as concentrações críticas de sobreposição, c^* , e de agregação, c^{**} , as quais definem os limites dos regimes dinâmicos de concentração, foram determinados para as soluções dos biopolímeros xantana e tara, utilizando uma curva teórica proposta para descrever o comportamento do coeficiente de difusão translacional em função da concentração determinado por retro-espalhamento.

As curvas de Distribuição dos Tempos de Relaxação para as diversas concentrações preparadas apresentaram mudanças no número de modos de distribuição em valores de concentração coincidentes com os valores de c^* e c^{**} , sugerindo um método alternativo para a determinação destes valores.

A aplicação da metodologia de análise dos modos de distribuição dos tempos de relaxação (DTR) permitiu determinar as concentrações críticas c^* e c^{**} mesmo no caso em que a curva do coeficiente de difusão translacional em função da concentração não pode ser comparada à curva teórica proposta.

Os resultados obtidos para as concentrações de sobreposição e agregação dos biopolímeros Xc 06 e goma tara apresentaram valores similares. A clairana apresentou valores menores para as concentrações críticas em comparação com a xantana e goma tara. Os valores das concentrações críticas determinados por espalhamento de luz foram menores que os valores apresentados pela literatura, quando determinados por análises reológicas. Para a xantana os valores foram condizentes com os apresentados na literatura utilizando a mesma técnica.

5. Referências Bibliográficas

- Andrade, C. T., Azero, E. G., Luciano, L., Gonçalves, M. P. (1999). Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 26, p. 181–185.
- Antunes, A. E. C., Moreira, A. S., Vendruscolo, J. L. S., Vendruscolo, C. T. (2000). Síntese de biopolímero xantana em meios convencionais e alternativos: viscosidade x composição. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 6, n. 2, p. 83-87.

- Berne, B. J., & Pecora, R. (2000). *Dynamic Light Scattering With Applications to Chemistry, Biology and Physics*. Ed. Dover Publications. New York, USA.
- Borges, C. D., Moreira, A. N., Moreira, A. S., Del Pino, F. A. B., Vendruscolo, C. T. (2004). Caracterização de Biopolímeros Produzidos por *Beijerinckia* sp. 7070 em Diferentes Tempos de Fermentação. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, p. 327-332.
- Burke, M. D., Park, J. O., Srinivasarao, M., Khan, S. A. (2000). Diffusion of Macromolecules in Polymer Solutions and Gels: A Laser Scanning Confocal Microscopy Study. *Macromolecules*, v. 33, p. 7500-7507.
- Coviello, T., Burchard, T. W., Dentini, M., Crescenzi, V. (1987). Solution Properties of Xanthan. 2. Dynamic and Static Light Scattering from Semidilute Solution. *Macromolecules*, v. 20, p. 1102-1107.
- Coviello, T., Kajiwarra, K., Burchard, T. W., Dentini, M., Crescenzi, V. (1986). Solution Properties of Xanthan. 1. Dynamic and Static Light Scattering from Native and Modified Xanthans in Dilute Solutions. *Macromolecules*, v. 19, p. 2826-2831.
- Cuvelier, G., & Launay, B. (1986). Concentration Regimes in Xanthan Gum Solutions Deduced from Flow and Viscoelastic Properties. *Carbohydrate Polymers*, v. 6, p. 321-333.
- De Gennes, P. G. (1979). *Scaling concepts in polymer solutions*, London: Cornell University Press.
- De Gennes, P. G. (1976). Dynamics of Entangled Polymer Solutions. II. Inclusion of hydrodynamic interactions. *Macromolecules*, v. 9 p. 594-598.
- De Gennes, P. G. (1971). Reptation of a Polymer Chain in the Presence of Fixed Obstacles. *The Journal of Chemical Physics*, v. 55, n. 2, p. 572-579.
- Dintzis, F. R., Babcock, G. E., Tobin, R. (1970). Studies on dilute solutions and dispersion of the polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Carbohydrate Research*, v. 3, n. 2, p. 257-267.
- Doi, M., & Edwards, S. F. (1986). *The Theory of Polymer Dynamics*, New York: Oxford University Press.
- Esquenet, C., & Buhler, E. (2002). Aggregation Behavior in Semidilute Rigid and Semirigid Polysaccharide Solutions. *Macromolecules*, v. 35, p. 3708-3716.
- FSANZ - Food Standards Australia New Zealand Code. *Application A546: Tara Gum as a Food Additive*. p. 1-15, 2005.

- Gamini, A., & Mandell, M. (1994). Physiochemical properties of aqueous xanthan solutions: static light scattering. *Biopolymers*, v. 34, p. 783–797.
- Haynes, W. C., Wickerham, L. J., Hesseltine, C. W. (1955). Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. *Applied Microbiology*, v. 3, p.361-368.
- Hofer, M. Basic concepts in static and dynamic light scattering: Application to colloids and polymers. In: Lindner, P., & Zemb, T. (1991). *Neutron, X-Ray and Light Scattering: Introduction to an investigative tool for colloidal and polymeric systems*, Amsterdam: Elsevier.
- Holzwarth, G. (1978). Molecular weight of xanthan polysaccharide. *Carbohydrate Research*, v. 66, p. 173-186.
- Holzwarth, G., & Prestidge, E. B. (1977). Multistranded helix in xanthan polysaccharide. *Science*, v. 197, p. 757-759.
- International Standard ISO13321. (1996). *Methods for determination of particle size distribution part 8: photon correlation spectroscopy*. International Organization for Standardization (ISO).
- INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, sob o nº PI 0406309-0, de 05 de novembro de 2004. (2006). Processo de produção de biopolímero tipo xantana, biopolímero obtido, seus usos; meio de cultura para crescimento de *Xanthomonas* e uso da mesma para produção de biopolímero. *Revista da Propriedade Industrial*, n. 1849, p. 186.
- Jansson, P. E., Kenne, L., Lindberg, B. (1975). Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydrate Research*, v. 45, p.275-285.
- Kang K. S., & McNeely W. H. (1977). PS-7 a new bacterial hetero-polysaccharide. In: Sandford, P. A; Laskin A. (Eds.). *Extracellular microbial polysaccharides*. Washington, DC: American Chemical Society.
- Laguna, M. T. R., Tarazona, M. P., Saiz, E. (2003). The use of molecular dynamics for the study of solution properties of guar gum. *Journal of Chemical Physics*, v. 119 n. 2, p. 1148-1156.
- Lapasin, R.; Pricl, S. (1995). Rheology of polysaccharide systems. In: LAPASIN, R; PRICL, S (Eds.), *Rheology of industrial polysaccharides. Theory and applications*. London: Blackie Academic and Professional.

- Lapasin, R., Prich, S., Paoletti, S., Zanetti, F. (1990). Novel rheological model for the gelation kinetics of ionic polysaccharides. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 41, n. 7-8, p. 1395 – 1410.
- Launay, B., Cuvelier, G., Martinez-Reyes, S. (1997). Viscosity of locust bean, guar and xanthan gum solutions in the Newtonian domain: a critical examination of the $\log(\eta_{sp})_0 - \log C[\eta]_0$ master curves. *Carbohydrate Polymers*, v. 34, p. 385-395.
- Liu, W., Sato, T., Norisuye, T., Fujita, H. (1987). Thermally induced conformational change of xanthan in 0,01M aqueous sodium chloride. *Carbohydrate Research*, v. 160, p. 267-281.
- Liu, W., & Norisuye, T. (1988). Order-desorder conformation change of xanthan in 0.01M aqueous sodium chloride: Dimensional Behavior. *Biopolymers*, v. 27, p. 1641-1654.
- Melton, L. D., Mindt, L., Rees, D. A., Sandersen, G. R. (1976). Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: evidence from partial hydrolysis studies. *Carbohydrate Research*, v. 46, p. 245-257.
- Meyer, E. L., Fuler, G. G., Clark, R. C., Kulicke, W-M. (1993). Investigation of Xanthan Gum Solution Behavior under Shear Flow Using Rheoptical Techniques. *Macromolecules*, v. 26, p. 504-511.
- Milas, M., Rinaudo, M., Knipper, M., Schuppiser, J. L. (1990). Flow and Viscoelastic Properties of Xanthan Gum Solutions. *Macromolecules*, v. 23, n 9, p. 2506-2511.
- Moreira, A. N., Moreira, A. S., Diaz, P. S., Vendruscolo, C. T., Del Pino, F. A. B. (2005). Rheological behaviour and chemical composition of the *Beijerinckia* sp. 7070 bacterial biopolymer produced by an enzymatic pathway. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 8, n. 2, p. 135-142.
- Moreira, A. N., Del Pino, F. A. B., Vendruscolo, C. T. (2003). Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através de inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 300-305.
- Moreira, A. da S. (2002). *Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de Xanthomonas campestris pv pruni*. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Moreira, A. da S., Vendruscolo, J. L. S., Gil-Turnes, C., Vendruscolo, C. T. (2001). Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni. *Food Hydrocolloids*, v. 15, p. 469-474.

- Moreira, A. da S., Souza, A. da S., Vendruscolo, C. T. (1998). Determinação da Composição de Biopolímero por Cromatografia em Camada Delgada: Metodologia. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 4, n. 3, p. 222-224.
- Morris, E. R. (1995). Polysaccharide rheology and in-mouth perception. In: Alastair M. Stephen. *Food polysaccharides and their applications*, New York: Marcel Dekker.
- Morris, V. J., Franklin, D., Lanson, K. (1983). Rheology and microstructure of dispersions of the microbial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* (xanthan gum), *Carbohydrate Research*, p. 13-30, v. 121.
- Muro, M. A; Luchi, M. R. (1989). *Preservação de Microrganismos*. Campinas: Editora da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”.
- Nash, W., Pinder, D. N., Hemar, Y., Singh, H. B. (2002). Dynamic light scattering investigation of sodium caseinate and xanthan mixtures. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 30, p. 269-271.
- Padilha, F. F., Dellagostin, O. A., Vendruscolo, C. T. (1998). Composição Química do Biopolímero de *Beijerinckia* sp. 7070 por Cromatografia em Camada Delgada. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 4, n. 3, 231-233.
- Pan, A., Moreira, A. S., Vendruscolo, C.T. (2000). Efeito da concentração inicial do inóculo no crescimento celular e qualidade de biopolímeros de *Xantomonas campestris* pv. pruni cepa 06. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 6, n. 3, p. 273-277.
- Paradossi, G., Brant, D. A. Light-scattering study of a series of xanthan fractions in aqueous solution. *Macromolecules*, v. 15, p. 874-879, 1982.
- Picout, D. R., Ross-Murphy, S. B., Errington, N., Harding, S. E. (2001). Pressure Cell Assisted Solution Characterization of Polysaccharides. 1. Guar Gum. *Biomacromolecules*, v. 2, p. 1301-1309.
- Pinto, E. P. (2005). *Desacetilação de xantana: influência no comportamento reológico*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Pinto, E. P., Moreira, A. S., Vendruscolo, C. T. (2002). Influência do pH, Adição de Sais e Temperatura na Viscosidade dos Biopolímeros Produzidos por *Beijerinckia* sp. cepas 7070 e UR4. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 8, n. 3, p. 247-251.

- Rochefort, W. E., & Middleman, S. (1987). Rheology of Xanthan Gum: Salt, Temperature and Strain Effects in Oscillatory and Steady Shear Experiments. *Journal of Rheology*, v. 31, n. 4, p. 337-369.
- Rodd, A. B., Dunstan, D. E., Boger, D. V., Schmidt, J., Burchard, W. (2001). Heterodyne and Nonergodic Approach to Dynamic Light Scattering of Polymer Gels: Aqueous Xanthan in the Presence of Metal Ions. (Aluminum(III)) *Macromolecules*, v. 34, p. 3339-3352.
- Rodd, A. B., Dunstan, D. E., Boger, D. V. (2000). Characterisation of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. *Carbohydrate Polymers*, v. 42, p. 159-174.
- Ross-Murphy, S. B., Morris, V. J., Morris, E. R. (1983). Molecular viscoelasticity of xanthan polysaccharide. *Faraday Symposium Chemical Society*, v. 18, p. 115.
- Ruiz-Angel, M. J., Simo-Alfonso, E. F., Mongay-Fernandez, C., Ramis-Ramos, G. (2002). Identification of leguminosae gums and evaluation of carob-guar mixtures by capillary zone electrophoresis of protein extracts. *Electrophoresis*, v. 23, p. 1709-1715.
- Sato, T., Norisuye, T., Fujita, H. (1984). Double-stranded helix of xanthan: dimensional and hydrodynamic properties in 0,1M aqueous sodium chloride. *Macromolecules*, v. 14, p. 2696-2700.
- Scamparini, A. R. P., Mariuzzo, D., Fujihara, H., Jacobusi, R., Vendruscolo, C. T. (1997). Structural studies of CV-70 polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 21, p. 115-121.
- Sittikijyothin, W., Torres, D., Gonçalves, M. P. (2005). Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, v. 59, p. 339-350.
- Southwick, J. G., Jamieson, A. M., Blackwell, J. (1982). Quasi-Elastic Light Scattering Studies of Semidilute Xanthan Solutions. *Macromolecules*, v 14, p. 1728-1732.
- Southwick, J. G., Lee, H., Jamieson, A. M., Blackwell, J. (1980). Self-association of xanthan in aqueous solvent-systems. *Carbohydrate Research*, v. 84, p. 287-295.
- Tinland, B., Maret, G., Rinaudo, M. (1990). Reptation in Semidilute Solutions of Wormlike Polymers. *Macromolecules*, v. 23, n. 2, p. 596-602.
- Vendruscolo, C.T. (1995). *Produção e caracterização do biopolímero produzido por Beijerinckia sp. isolada do solo da região de Ribeirão Preto-SP Brasil*. Campinas. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Ying, Q., & Chu, B. (1987). Overlap Concentration of Macromolecules in Solution. *Macromolecules*, v. 20, p. 362-366.
- Wandrey, C. (1999). Concentration Regimes in Polyelectrolyte Solutions. *Langmuir*, v. 15, p. 4069-4075.

5 Artigo 3

Medidas do Raio Hidrodinâmico, Polidispersão e Distribuição de Tamanho de Xantana, Clairana e Tara por Espalhamento de Luz Dinâmico

Este artigo será submetido à revista International Journal of Biological Macromolecules.

MEDIDAS DO RAIO HIDRODINÂMICO, POLIDISPERSÃO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE XANTANA, CLAIRANA E TARA POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

P. S. Diaz^{a,*}, R. C. Michel^b, R. F. T. Lomba^c, C. T. Vendruscolo^a

^aCentro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil. Caixa postal 354, CEP 96010 900.

^bInstituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. Caixa postal 68525, CEP 21945 970.

^cTecnologia de Engenharia de Poço, Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello, Petrobras, Rio de Janeiro, Brasil. CEP 21949 900.

Resumo

O comportamento das propriedades dinâmicas dos biopolímeros xantana, clairana e tara, em função da concentração das soluções, foi analisado utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico. Através das curvas do coeficiente de correlação *versus* tempo foram obtidas as distribuições de tamanho por intensidade, os raios hidrodinâmicos e o índice de polidispersão. Os parâmetros analisados apresentaram dependência com relação à concentração das soluções. Conforme a concentração das soluções aquosas aumentou, a distribuição de tamanhos por intensidade passou de um comportamento monomodal para bi e trimodal. Este comportamento foi atribuído a presença de modos lentos de difusão translacional ocasionados pela formação de aglomerados de partículas. O valor do raio hidrodinâmico apresentou variação, pois, os aglomerados formados com o aumento da concentração apresentaram raio hidrodinâmico superior ao raio das partículas em soluções diluídas. O índice de polidispersão aumentou com o aumento da concentração das soluções, devido ao surgimento de novos picos, enquanto a largura dos picos de distribuição de tamanho diminuiu.

Palavras-chave: polissacarídeos, raio hidrodinâmico, distribuição de tamanhos, concentração, espalhamento de luz dinâmico.

1. Introdução

No Brasil, as pesquisas na área de polímeros naturais objetivam a descoberta, produção, caracterização e aplicação destes. Exemplos destes trabalhos são os estudos realizados com as galactomananas extraídas das sementes *Caesalpinia pulcherrima* e *Cassia*

javanica (Andrade *et al.*, 1999), o polissacarídeo *Chicha* (Brito *et al.*, 2005), a goma de cajueiro (Silva *et al.*, 2006), a xantana sintetizada pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* (Moreira *et al.*, 2001) e a clairana, oriunda da bactéria *Beijerinckia* sp. (Moreira *et al.*, 2005).

As aplicações desses polissacarídeos ocorrem em variados tipos de segmentos industriais, os quais exploram a capacidade que estes apresentam de alterar as propriedades reológicas do solvente em que são dissolvidos. É desejado também que as suas propriedades hidrodinâmicas sejam estáveis em ampla faixa de pH, salinidade e temperatura, como ocorre com as soluções de xantana. Porém, sabe-se que estas propriedades são dependentes da concentração da solução.

Em aplicações onde, durante o processo, ocorra a variação de concentração da solução, como no caso dos fluidos utilizados na perfuração de poços de petróleo, torna-se necessário conhecer as variações nas propriedades hidrodinâmicas com a concentração de biopolímero na solução.

A dinâmica de dispersões coloidais tem sido objeto de intensas pesquisas, principalmente por espalhamento de luz, nas últimas duas décadas (Southwick *et al.*, 1979; Coviello *et al.*, 1987; Milas, Reed & Printz, 1996; Norwood, Benmouna & Reed, 1996; Huang, Kakuda & Cui, 2001; Kaszuba *et al.*, 2007).

Segundo Lucas, Soares e Monteiro (2001), a característica mais importante para os polímeros é o seu tamanho molecular. Este tamanho pode ser expresso pelas propriedades hidrodinâmicas que apresentam em solução. Um dos parâmetros utilizados para tal finalidade é a viscosidade intrínseca, a qual não é um parâmetro molecular novo, pois Einstein (1906, apud Salinas, 2005) já havia considerado esta para uma suspensão de partículas esféricas. Multiplicando a viscosidade intrínseca pela concentração da solução ($c[\eta]$) obtemos outro parâmetro, o qual se refere ao volume total ocupado pelos novelos poliméricos, isto é, a medida da fração, em volume, do polímero presente na solução. Atualmente, tem-se utilizado o parâmetro raio hidrodinâmico para se expressar este volume (Rodd *et al.*, 2001; Esquenet & Buhler, 2002; Goh *et al.*, 2006). Este parâmetro é obtido pela análise da dinâmica de difusão das partículas em uma solução utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico.

Além do raio hidrodinâmico, utilizando esta técnica, obtêm-se a distribuição de tamanho das partículas na solução em termos de intensidade da luz espalhada e em volume ocupado (Huang; Kakuda; Cui, 2001; Kaszuba *et al.*, 2007). Estas distribuições de tamanho

têm sido analisadas também através da taxa de decaimento do coeficiente de correlação da intensidade de luz espalhada pelas partículas presentes na solução (Narayanan *et al.*, 2002; Nash *et al.*, 2002; Goh *et al.*, 2006).

Esta técnica tem sido empregada na área de biopolímeros com diversas finalidades, tais como: avaliação do processo de gelatinização (Narayanan *et al.*, 2002), investigação em misturas (Nash *et al.*, 2002), verificação da estabilidade de emulsões (Huang, Kakuda & Cui, 2001), comportamento dos processos de agregação (Esquenet & Buhler, 2002), conhecimento das propriedades de novos biopolímeros (Goh *et al.*, 2006) bem como na caracterização das propriedades dinâmicas de biopolímeros utilizados industrialmente (Rodd, Dunstan & Boger, 2000; Rodd *et al.*, 2001).

Já está estabelecido que a concentração de polímero desempenha um importante papel no comportamento do fluxo da solução. Em soluções diluídas, as moléculas individuais de polímero estão na forma de novelos isolados enquanto, nas soluções concentradas o volume hidrodinâmico total das cadeias individuais pode exceder o volume da solução (Chamberlain & Rao, 2000), isto é, as interações intermoleculares diferem umas das outras, resultando em modificações no comportamento do fluxo da solução. Deste modo, o estudo do efeito da concentração das soluções dos biopolímeros xantana (Xc 06), clairana e tara sobre o raio hidrodinâmico, o índice de polidispersão e a distribuição de tamanhos foi realizado e é apresentado no presente trabalho.

Teoria sobre espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico é uma técnica para a caracterização do tamanho de dispersões coloidais que utiliza a iluminação de uma suspensão de partículas ou moléculas que estão sob movimento Browniano por um feixe de laser (Pecora, 1985; ISSO 13321, 1996; Peters, 2000). As flutuações tempo-dependentes na intensidade da luz espalhada são analisadas usando um correlacionador ('*autocorrelator*'), o qual determina a função de autocorrelação do sinal. A função de correlação do sinal (G) decai com uma taxa exponencial que é dependente da difusão das partículas que estão sendo medidas (Pecora, 1985; ISO 13321, 1996), de acordo com a Equação 1:

$$G = \int_0^{\infty} I(t)I(t + \tau)dt = B + A^{-2q^2 D \tau} \quad \text{Equação 1}$$

onde B é a linha de base, A é a amplitude e D é o coeficiente de difusão translacional. O vetor de espalhamento de luz (q) é definido pela Equação 2, abaixo, onde $\tilde{n}$ é o índice de refração do solvente, λ_0 é o comprimento do laser no vácuo e θ é o ângulo de espalhamento.

$$q = \frac{4\pi\tilde{n}}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad \text{Equação 2}$$

A velocidade do movimento Browniano das partículas é medida em termos do coeficiente de difusão translacional. Este coeficiente de difusão pode ser convertido em raio hidrodinâmico (R_H) usando a equação de Stokes-Einstein, apresentada na Equação 3.

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad \text{Equação 3}$$

onde k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura e η é a viscosidade do solvente.

A média Z do raio hidrodinâmico (Z average R_H) é obtida a partir da média ponderada da intensidade da luz espalhada (Malvern Instruments LDT, 2005). Por definição, o raio obtido a partir do coeficiente de difusão translacional é o de uma esfera sólida hipotética, a qual possui a mesma velocidade de difusão que a partícula analisada. Na prática, as macromoléculas em solução não se apresentam na forma de esferas sólidas (*non-draining conditions*), e sim de novos aleatórios em contínuo movimento, contendo solvente em seu interior (*free draining conditions*). Deste modo, o raio hidrodinâmico calculado a partir do coeficiente de difusão é indicativo do tamanho aparente da partícula analisada.

O limite inferior de tamanho de partícula medido pela técnica de espalhamento de luz depende da quantidade de excesso de luz espalhada produzido. Este excesso é a diferença em espalhamento entre a molécula ou partícula que está sendo estudada e do dispersante no qual foi preparada a solução. Isto depende de vários fatores tais como o índice de refração da molécula e do dispersante, a concentração da amostra, a potência e comprimento de onda do laser utilizado, a sensibilidade do detector e a configuração óptica do instrumento. Inevitavelmente, quanto menor for o tamanho da partícula menor será a quantidade de luz espalhada em excesso (Kaszuba, 2007).

Os equipamentos convencionais de espalhamento de luz dinâmico utilizam detecção em ângulo de 90° e esta configuração óptica não é sensível o suficiente para medidas de partículas pequenas, mesmo com a utilização de laser potente em menor comprimento de onda. Uma configuração que permite a medida de amostras em baixas concentrações de partículas de tamanho pequeno é a detecção de retro-espalhamento. No retro-espalhamento

em 173° o volume de espalhamento observado no detector é aumentado em oito vezes em comparação ao volume de espalhamento da configuração óptica clássica de 90° . Este resultado é um aumento em oito vezes na detecção da taxa de contagem ('count rate'), o qual é diretamente correlacionado com a sensibilidade do instrumento ou a habilidade de medir partículas de pequeno tamanho em baixas concentrações. Esta configuração óptica, apresentada na Fig. 1, fornece uma sensibilidade excepcional que é necessária para a medida de nanopartículas e moléculas em baixas concentrações (Kaszuba *et al.*, 2007).

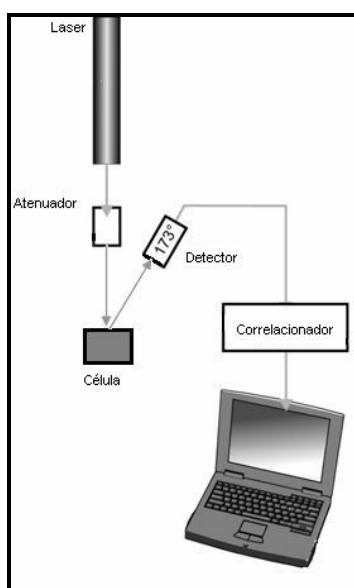


Fig. 1 – Configuração óptica do equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Ltd., UK) para medidas de espalhamento de luz dinâmico por retro-espalhamento (173°). Fonte: Malvern Instruments Ltd, 2005.

2. Materiais e Métodos

2.1 Biopolímeros

A amostra de xantana foi sintetizada pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv pruni cepa 06, fornecida pelo Centro de Pesquisa Agropecuária Clima Temperado (CPACT-EMBRAPA), localizado na cidade de Pelotas (Rio Grande do Sul, Brasil). Neste trabalho, a xantana obtidas pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv pruni cepas 06 será denominada de Xc 06. A amostra de clairana foi sintetizada com a bactéria *Beijerinckia* sp. cepa 7070 a qual foi isolada do solo canavieiro do município de Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil) por Vendruscolo (1995).

A bactéria *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* foi mantida por repiques mensais em meio YM (Haynes *et al.*, 1955) e armazenada a 4°C, de acordo com Muro e Luchi (1989). A bactéria *Beijerinckia* sp. foi mantida liofilizada em ampolas. Nesse processo, a suspensão bacteriana, com 1×10^{10} UFC/mL, acrescida de crioprotetor, foi conservada através da dessecação a pressões sub-atmosféricas. Após a abertura da ampola, a bactéria foi mantida por repiques mensais em meio YM (Haynes *et al.*, 1955) e armazenada a 4°C, de acordo com Muro e Luchi (1989).

A produção de células foi realizada em meio YM e os frascos foram incubados em agitador orbital (New Brunswick, Scientific, modelo Innova 4230). A concentração microbiana após este período foi estimada através do plaqueamento de diluições em série. Os inóculos continham aproximadamente 2×10^9 UFC.mL⁻¹, conforme recomendado por Pan, Moreira e Vendruscolo (2000). A produção dos biopolímeros foi realizada em biorreator de bancada (B. Braun Biotech. Inc., modelo Biostat B) utilizando vaso de 10L.

No processo pós-fermentativo foi realizada a centrifugação (Sorvall Instruments RC-5C) a 16.000g durante 45 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado etanol 96°GL na proporção de 1:4. Após, foram secos em estufa a 56°C e triturados em moinho de disco (Fritsch, Pulverisette).

A goma tara foi fabricada pela empresa Exportadora El Sol (Perú) e distribuída no Brasil pela empresa Metachem Industrial e Comercial Ltda, a qual forneceu a amostra para este trabalho.

2.2 Preparo das soluções

As três amostras de biopolímeros para a análise de espalhamento de luz dinâmico foram preparadas por solubilização em água destilada e deionizada em concentração de 5g.L⁻¹ com 1×10^{-3} g.L⁻¹ de azida sódica, em agitador magnético por 16 horas a 50°C. A clarificação das amostras foi realizada por filtração em membranas de ésteres mistos de nitrato e acetato de celulose (Millipore – Millipore Corporation) com tamanho de poro variando de 3,0µm a 0,45µm, sob pressão controlada. A concentração final das soluções foi verificada por gravimetria. A partir da solução estoque, foram preparadas diluições, utilizando o mesmo solvente sob agitação magnética por uma hora e armazenas por 16 horas sob refrigeração.

2.3 Espalhamento de Luz Dinâmico

Espalhamento de luz dinâmico (DLS) é uma técnica não perturbativa usada para medir o coeficiente de difusão de moléculas em solução. O coeficiente de difusão, o qual tem dimensões de $(\text{comprimento})^2/\text{tempo}$, é uma medida média da trajetória difusional de uma molécula individual.

As medidas de espalhamento de luz foram realizadas utilizando o analisador de tamanho de partículas Malvern Nanosizer ZS (Malvern Instruments Ltd., UK). As amostras foram analisadas em cubeta de vidro com, pelo menos, cinco repetições para verificar a repetibilidade. Todas as análises foram realizadas a 25°C. O ângulo de detecção da luz espalhada foi de 173°, denominado de retro-espalhamento. O Nanosizer ZS utiliza um laser He-Ne de 4mW, operando em um comprimento de onda (λ_0) de 633nm.

A viscosidade do solvente (água destilada e deionizada) é 0,8872mPa.s e o índice de refração (RI) é 1,330. A viscosidade das amostras foi assumida como 0,8872mPa.s, o índice de refração (RI) como 1,330 e a absorção (luz absorvida pelas partículas na dispersão) com o valor de 0,001.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o *Dispersion Technology Software 5.00* (Malvern Instruments Ltd., UK). Os valores de raio hidrodinâmico (R_H) médio das partículas (*Z-average*) e do índice de polidispersão (PDI) foram calculados a partir da análise por cumulantes, conforme definido na ISO13321 (1996). A distribuição de intensidade das partículas por tamanho foi obtida pela análise da função de correlação de tempo utilizando o método CONTIN (Provencher, 1979; Provencher, 1982), o qual utiliza a transformada inversa de Laplace da função de correlação. Este método foi considerado como padrão para análises de espalhamento de luz dinâmico (Berne & Pecora, 2000) e atualmente tem sido utilizado por diversos pesquisadores (Rodd, Dunstan & Boger, 2000; Nash *et al.*, 2002; Esquenet & Buhler, 2002). A conversão da 'distribuição de tamanho das partículas por intensidade' para 'distribuição de tamanho das partículas por volume' foi realizada utilizando o método de Rayleigh-Gans-Debye, disponibilizado no programa de análise utilizado.

3. Resultados e Discussões

A análise do correlograma de uma medida fornece muitas informações sobre a amostra analisada. O tempo em que o sinal de correlação inicia e o seu decaimento é um indicativo do tamanho médio das partículas. Uma curva de decaimento com inclinação acentuada é

característica de amostras monodispersas, inversamente, uma inclinação menos acentuada refere-se a amostras polidispersas (Malvern Instruments Ltd, 2005). O valor do coeficiente de correlação é indicativo de como os sinais de intensidade obtidos em um tempo t e em um tempo $t+\tau$ estão correlacionados. Assim, se o sinal de intensidade é comparado consigo mesmo haverá uma perfeita correlação, a qual é indicada pela unidade (1,0). A não correlação é indicada por zero (0,0), porém, valores menores que 0,1 são indicativos de baixa qualidade dos resultados (Kaszuba *et al.*, 2007).

A Fig. 2 apresenta as funções de correlação obtidas a partir das medidas realizadas nas soluções aquosas dos biopolímeros em diferentes concentrações, no Zetasizer Nano ZS, utilizando retro-espalhamento. Foi observado que, as soluções de menor concentração apresentadas para os biopolímeros clairana e tara apresentarem valor menor que 0,1 para o coeficiente de correlação, conforme Fig. 2, (B e C). Por esse motivo, não foram utilizadas para obter os valores do raio hidrodinâmico e do índice de polidispersão. Isto ocorreu devido a baixa concentração das amostras, o que faz aumentar o tempo de análise e conseqüentemente diminuir o coeficiente de correlação.

Observamos, na Fig. 2, que os valores dos coeficientes de correlação e os tempos de relaxação diminuíram com o decréscimo da concentração das soluções dos biopolímeros, portanto, mostraram-se dependentes da concentração. Por outro lado, com o decréscimo da concentração das soluções, ocorreu um aumento no tempo em que o sinal de correlação manteve seu valor em um platô, isto é, antes do início do decaimento do sinal. Segundo Berne e Pecora (1976), altos tempos de relaxação da função de correlação são indicativos de menor mobilidade das partículas. Assim, podemos concluir que as partículas presentes nas soluções de menor concentração apresentam maior volume hidrodinâmico. O fato do decaimento do coeficiente de correlação não ser acentuado, isto é, o tempo entre o início do decaimento e o final ser grande, mostra que as amostras apresentam alta polidispersão (Malvern Instruments Ltd, 2005).

Utilizando as curvas do coeficiente de correlação obtido para as menores concentrações dos biopolímeros, determinou-se o tempo de relaxação de $4 \times 10^2 \mu\text{s}$ para a Xc 06 e $1 \times 10^3 \mu\text{s}$ para a clairana e tara.

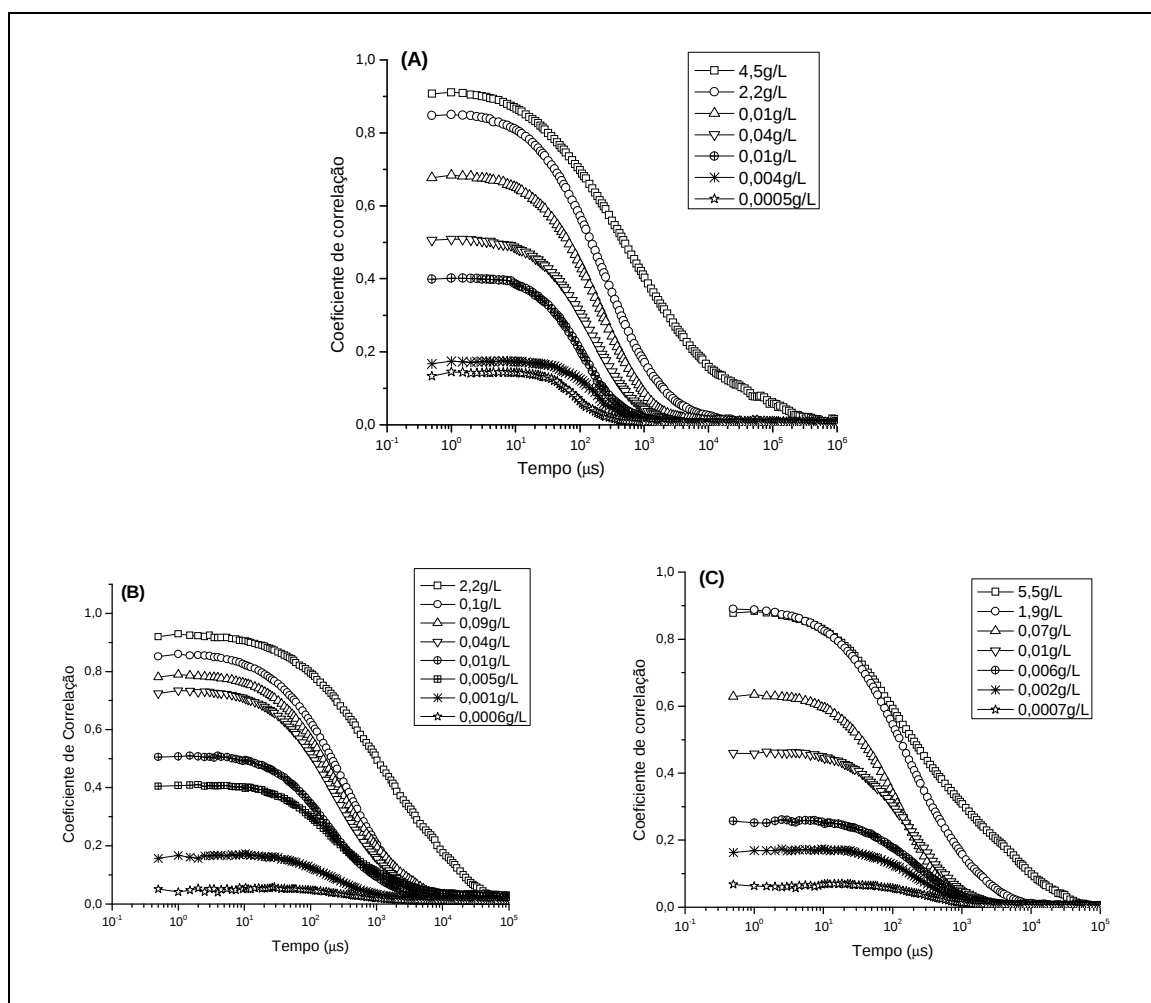


Fig. 2 – Correlogramas obtidos para as soluções aquosas dos biopolímeros (A) Xc 06, (B) clairana e (C) tara, em variadas concentrações.

É relatado na literatura que o movimento difusional das partículas de uma amostra pode apresentar dois modos, denominados de modo de difusão lenta e rápida. Partindo desses dados, obtêm-se curvas do coeficiente de correlação apresentando dois tempos característicos de decaimento, relativos aos dois modos de difusão. Kaszuba *et al.*, (2007) verificaram tal comportamento em soluções de sacarose com concentração de 50g.L^{-1} , 100g.L^{-1} e 150g.L^{-1} , e atentaram para o fato de que a taxa de decaimento lenta destas soluções ocorreram muito próximas a linha de base da função de correlação e que foram ocasionadas devido a difusão coletiva de moléculas de sacarose. Tal hipótese foi originária do aumento na amplitude da taxa de decaimento lento com o acréscimo da concentração de sacarose na solução. Este comportamento também foi relatado por Esquenet e Buhler (2002) para soluções, em excesso de sal, de xantana e ácido hialurônico em regime de concentração semidiluído. Este

comportamento não foi verificado para as soluções em regime diluído. Os autores atribuíram a presença do modo lento à concentração das soluções, por serem maiores que c^* . Nash *et al.* (2002) obtiveram resultados similares e atribuíram a presença do modo lento, nas soluções de xantana com concentração de $0,6\text{g.L}^{-1}$ e acima, a aplicação do método CONTIN aos resultados das análises, o qual provoca uma suavização da polidispersão das amostras. Rodd, Dunstan e Boger (2000) observaram a presença do modo lento para uma faixa de concentrações de soluções de xantana, incluindo soluções em regime diluído. Porém, no trabalho posterior, (Rodd *et al.*, 2001) apresentaram um único modo de decaimento para uma solução de xantana de $1,0\text{g.L}^{-1}$. Oposto aos resultados e argumentos apresentados, Norwood, Benmouna e Reed (1996) e Milas, Reed e Printz (1996) relataram que o modo lento de difusão não foi observado em soluções de xantana preparadas sem adição de sal e em baixa força iônica, com concentração no regime diluído. Para uma solução de xantana $0,03\text{g.L}^{-1}$ sem sal, os pesquisadores verificaram a presença do modo lento de difusão, característico nas soluções de polieletrólitos que não passaram por um processo adequado de filtração e, por isso, mantêm uma população residual de agregados insolubilizados e/ou outras partículas. Devido a isto, para a mesma solução, utilizaram filtração em membrana com poro de $0,22\mu\text{m}$. O modo lento de difusão não foi detectado na análise de DLS. Assim, os autores interpretaram que este modo ocorreu devido à presença de agregados insolubilizados e/ou outras partículas, os quais foram removidos com sucesso da solução por filtração.

Michel e Reed (2000) apresentaram a origem do modo lento de difusão através do estudo da dissolução de polieletrólitos em soluções aquosas de força iônica reduzida e de força iônica moderada. A amostra utilizada foi o poli(estireno sulfonato de sódio) (NaPSS). As curvas de espalhamento de luz estático multi-ângulo (SLS) apresentadas pelos autores mostraram que, para a solução aquosa do polieletrólito após filtração em poro de $0,45\mu\text{m}$, um pico intenso foi detectado, o qual foi interpretado como sendo referente a presença de agregados. Com a diminuição do tamanho de poro do filtro para $0,22\mu\text{m}$ e $0,10\mu\text{m}$, observaram que a intensidade do pico diminuiu. Porém, para a solução salina do polieletrólito, após filtração em poro de $0,45\mu\text{m}$, o pico não foi observado, sendo este resultado interpretado como referente a ausência de agregados. Os agregados que geram os picos observados nas curvas de TDSLS são os responsáveis por apresentar o modo lento de difusão na técnica de espalhamento de luz dinâmico. Utilizando DLS, para o polieletrólito em solução aquosa, foi relatado que quanto menor o tamanho de poro do filtro utilizado menor o raio hidrodinâmico e

que, com o passar do tempo o raio hidrodinâmico diminuiu. Estes resultados em conjunto com os das demais análises permitiram aos pesquisadores concluir que a presença de modo lento de difusão está relacionada a solubilização do polieletrólito e a filtração da amostra.

Os regimes dinâmicos de concentração para os biopolímeros Xc 06, clairana e tara foram determinados no trabalho anterior, e no presente estudo serão relacionados com os resultados obtidos.

Para os biopolímeros estudados no presente trabalho, os coeficientes de correlação, apresentados na Fig. 2, exibiram um único modo de decaimento exponencial para as soluções com concentração em regime diluído ($c < c^*$), isto é, as soluções diluídas não apresentaram modo lento de difusão. O modo lento de difusão foi observado para as soluções com concentração superior a c^* . De acordo com o exposto acima, consideramos que a metodologia utilizada para a solubilização e clarificação das amostras foi adequada para as análises de DLS.

As distribuições de intensidade por tamanho das partículas, obtidas a partir das funções de correlação, foram divididas de acordo com o regime de concentração das soluções. Estas distribuições consistem de um número de classes de tamanho espaçadas logaritmicamente no eixo X com a percentagem relativa de partículas, em cada classe de tamanho, baseada na intensidade da luz espalhada no eixo Y.

A Fig. 3 apresenta a distribuição de tamanhos por intensidade para as amostras de biopolímeros com concentrações no regime diluído. As amostras apresentaram distribuição monomodal. As partículas em regime diluído de concentração comportam-se dinamicamente como se fossem únicas e não houvesse outras partículas, isto é, encontram-se separadas umas das outras de tal modo que não ocorre nenhum tipo de interação intermolecular.

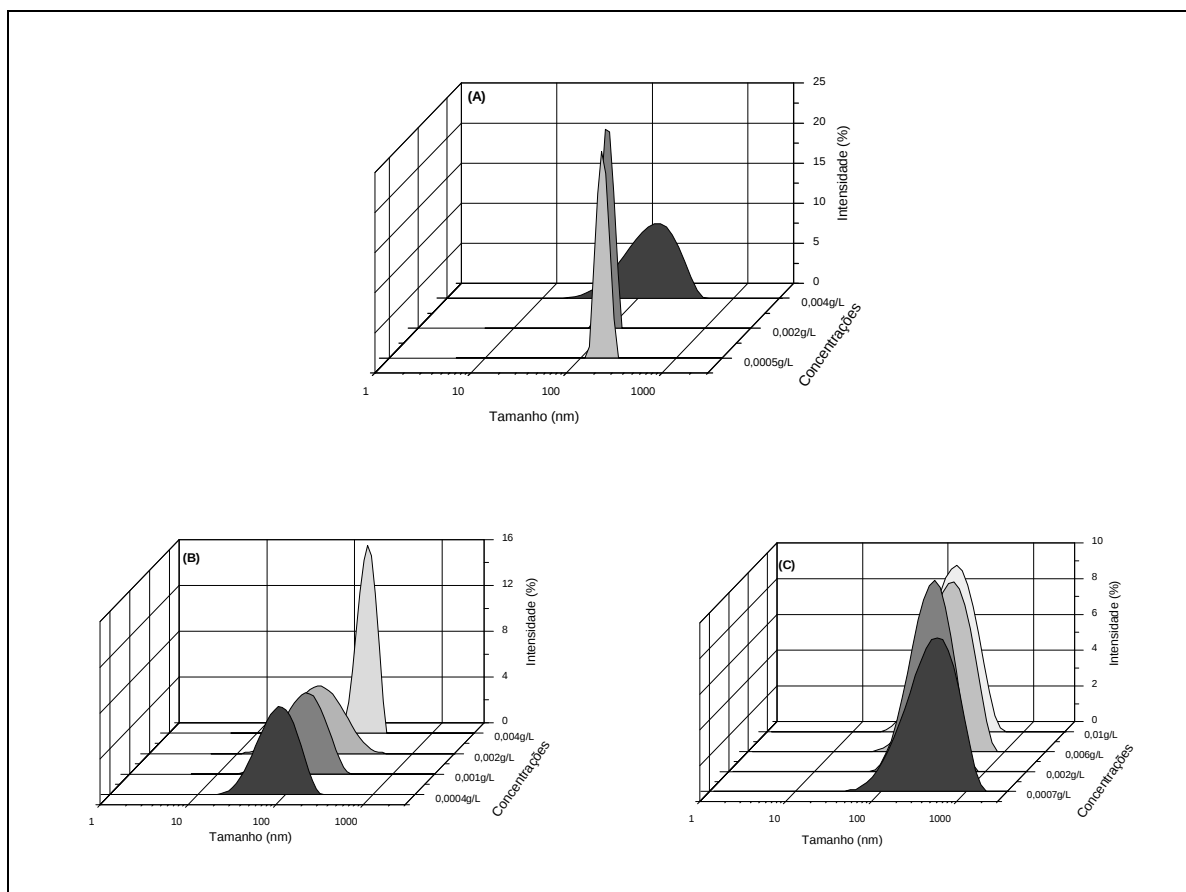


Fig. 3 – Distribuição de intensidade por tamanho das partículas para as soluções aquosas dos biopolímeros (A) Xc 06, (B) clairana e (C) tara, em regime diluído.

A Fig. 4 apresenta a distribuição de tamanhos por intensidade para as amostras de biopolímeros com concentrações no regime semidiluído. Foi observado que as amostras apresentaram distribuição bimodal, ou seja, as partículas em solução apresentaram dois coeficientes de difusão translacional distintos. Devido ao aumento de concentração das soluções não há espaço livre entre as partículas e estas acomodam-se através de interações intermoleculares e contração molecular. Assim, está se observado o comportamento de um conjunto de partículas e não o comportamento de partículas isoladas como no regime diluído.

O comportamento dinâmico para essas soluções pode ser explicado através do modelo de *blobs*. Um *blob* é um conjunto de segmentos de cadeia que se move de maneira coletiva, porém o movimento de um *blob* não é correlacionado ao movimento de outro *blob*. O tamanho de um *blob* depende do alcance das interações entre as cadeias e é expresso pelo raio hidrodinâmico, ξ_h (De Gennes, 1976). Deste modo, observamos a presença de dois *blobs* com tamanhos distintos, os quais originaram o comportamento bimodal.

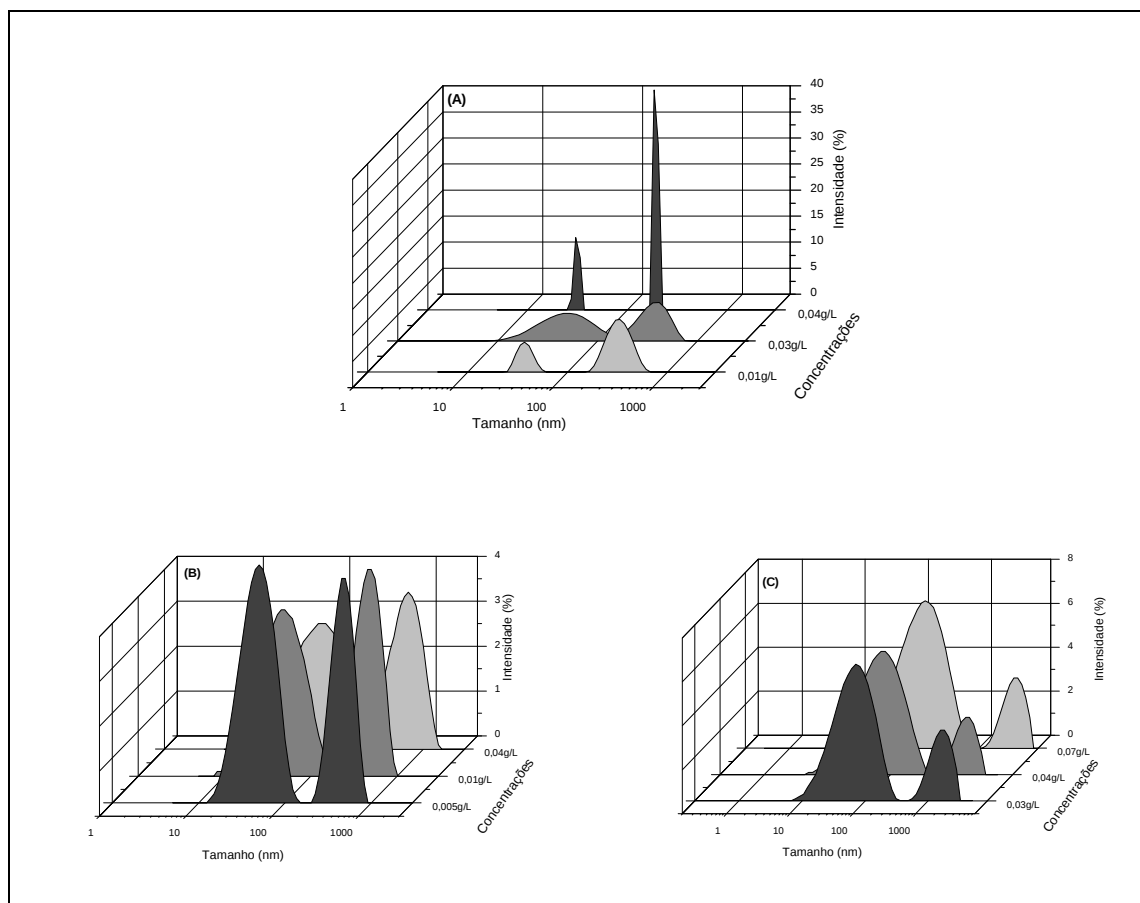


Fig. 4 – Distribuição de intensidade por tamanho das partículas para as soluções aquosas dos biopolímeros (A) Xc 06, (B) clairana e (C) tara, em regime semidiluído.

Para o regime concentrado os resultados são apresentados na Fig. 5. Foi observada distribuição de tamanhos por intensidade trimodal. Ocorreu a inclusão de um segundo modo lento de difusão, isto é, são observados três coeficientes de difusão translacional diferentes. No regime concentrado somente ocorre maior interpenetração entre as partículas, não ocorrendo contração molecular. Para compreender o comportamento dinâmico dessas soluções também pode-se aplicar o modelo de *blobs*. Nestas soluções os segmentos de cadeia apresentam curto, médio e longo alcance, os quais originaram os três picos na distribuição por tamanhos.

Resultado semelhante ao obtido neste trabalho foi apresentado por Huang, Kakuda e Cui (2001) no estudo da estabilidade de emulsões de hidrocolóides, em dispersões com concentração de $5,0\text{g.L}^{-1}$, analisando a distribuição de tamanho. Entre as amostras estudadas, foram analisadas xantana e goma guar. Os autores verificaram que os hidrocolóides apresentaram distribuição de tamanhos trimodal.

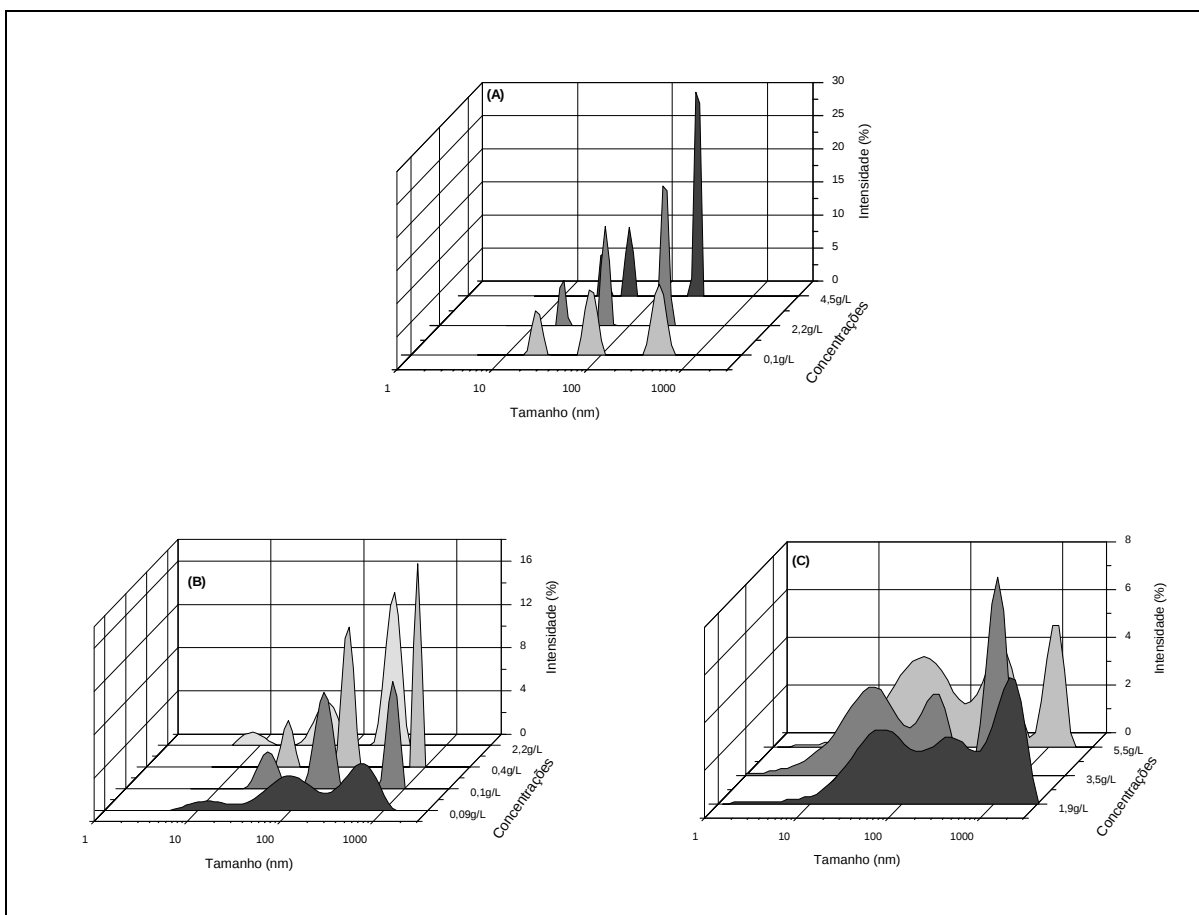


Fig. 5 – Distribuição de intensidade por tamanho das partículas para as soluções aquosas dos biopolímeros (A) Xc 06, (B) clairana e (C) tara, em regime concentrado.

A partir das curvas das funções de correlação foram determinados o índice de polidispersão (PDI) e os raios hidrodinâmicos (R_H) dos picos da distribuição de tamanhos, de acordo com a concentração das soluções dos biopolímeros, conforme é apresentado na Tab. 1. Referente aos raios hidrodinâmicos, são apresentadas a intensidade e a largura de cada pico da distribuição.

Analisando o comportamento do raio hidrodinâmico para cada um dos picos das curvas de distribuição de tamanhos foi verificado que este diminuiu com o aumento de concentração. Observou-se que esta diminuição está relacionada a formação de partículas com tamanhos superiores ao inicial, isto é, o R_H do pico um diminuiu quando ocorreu a formação do segundo modo de distribuição (R_H do pico 2 > R_H do pico 1). Para os biopolímeros xantana e clairana, o raio hidrodinâmico das soluções concentradas foi maior que o raio das soluções semidiluídas (R_H do pico 3 > R_H do pico 2). Para a tara foi observado que o raio hidrodinâmico das soluções concentradas também causou decréscimo no valor do raio

hidrodinâmico das soluções semidiluídas, entretanto, estas últimas ainda mantiveram valor superior (R_H do pico 2 > R_H do pico 3). Esta variação no raio hidrodinâmico foi explicada por De Gennes (1979) aplicando o modelo de *blobs*. Segundo o autor, o aumento da concentração da solução ocasiona redução no tamanho do *blob* devido ao maior número de interações intermoleculares entre as cadeias.

A intensidade dos picos diminuiu com o aumento da concentração devido a formação dos modos de distribuição bi e trimodal. A largura das curvas de distribuição diminuiu com o aumento da concentração das soluções.

O valor do raio hidrodinâmico em solução diluída das amostras de polieletrólitos, isto é, da xantana Xc 06 e da clairana apresentaram valor similar e a amostra de biopolímero neutro (goma tara) apresentou valor superior. A menor largura do pico, em solução diluída, foi apresentada pela Xc 06. A clairana e a goma tara apresentaram largura do pico em solução diluída similar.

Os valores obtidos para o índice de polidispersão (PDI), apresentados na Tab. 1, diminuíram com o decréscimo da concentração das soluções. Estes resultados estão de acordo com as curvas apresentadas na Fig. 2, pois o decaimento do coeficiente de correlação ocorreu de modo suave.

Tabela 1

Polidispersão, raio hidrodinâmico, intensidade e largura dos picos de distribuição de tamanho obtidos para as soluções aquosas dos biopolímeros.

Xc 06		Pico 1			Pico 2			Pico3		
Concentração (g.L ⁻¹)	PDI	R _H (nm)	% I	Largura (nm)	R _H (nm)	% I	Largura (nm)	R _H (nm)	% I	Largura (nm)
4,5	0,744	26,64	14,4	1,8	50,22	23,0	3,7	259,2	62,7	14,75
2,2	0,578	19,69	13,7	1,2	55,57	34,1	4,22	235,1	52,2	4,227
0,1	0,777	21,11	20,3	2,2	78,61	37,2	10,43	413,3	42,5	59,43
0,04	0,624	31,31	25,9	1,897	192,0	74,1	9,5			
0,03	0,425	48,15	40,5	26,51	345,5	59,5	127,5			
0,01	0,451	37,78	26,4	6,355	336,2	73,6	89,67			
0,004	0,478	153,3	100	84,31						
0,002	0,426	96,03	100	13,35						
0,0005	0,452	171,4	100	23,92						

Clairana		Pico 1			Pico 2			Pico3		
Concentração (g.L ⁻¹)	PDI	R _H (nm)	% I	Largura (nm)	R _H (nm)	% I	Largura (nm)	R _H (nm)	% I	Largura (nm)
2,2	1,0	8,60	7,8	2,03	51,73	27,3	12,77	267,6	64,9	44,53
0,4	0,777	33,18	14,6	4,11	146,8	45,3	18,26	824,1	40,2	60,23
0,1	0,824	34,0	18,8	6,79	136,5	45,7	25,36	748,0	35,5	93,63
0,09	1,00	27,29	13,9	10,90	155,3	45,2	63,2	1413	40,9	555,8
0,04	0,771	68,25	55,3	41,65	413,4	44,7	139,7			
0,01	0,519	51,59	57,9	29,75	471,5	42,1	155,1			
0,005	0,469	51,55	62,3	21,98	474,8	37,7	127,8			
0,004	0,453	168,1	100	20,01						
0,002	0,404	97,67	100	63,9						
0,001	0,317	104,7	100	52,98						

Tara		Pico 1			Pico 2			Pico3		
Concentração (g.L ⁻¹)	PDI	R _H (nm)	% I	Largura (nm)	R _H (nm)	% I	Largura (nm)	R _H (nm)	% I	Largura (nm)
5,5	0,807	22,28	49,3	15,05	575,0	20,2	122,4	143,0	30,5	56,34
3,5	0,855	23,7	46,2	15,47	538,1	32,3	111,5	111,0	21,6	35,44
1,9	0,827	32,12	41,0	20,93	1232	12,1	338,6	277,5	46,9	154,1
0,07	0,470	76,39	87,9	61,38	1470	12,1	515,4			
0,04	0,514	85,2	81,9	65,78	1598	18,1	555,9			
0,03	0,570	77,98	77,4	51,7	1618	22,6	565,9			
0,01	0,466	82,13	100	45,76						
0,006	0,351	122,2	100	66,94						
0,002	0,347	128,3	100	63,39						

O parâmetro de polidispersão utilizado para polímeros é a razão entre a massa molar ponderal média e a massa molar numérica média ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$) (Lucas, Soares & Monteiro, 2001). Este parâmetro está relacionado com o índice de polidispersão (PDI), calculado pelo DLS, de acordo com a Equação 4 (Malvern Instruments Ltd., 2005).

$$PDI \approx \left(\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} - 1 \right)^2 \quad \text{Equação 4}$$

Utilizando a equação acima, foi verificado, para as soluções de menor concentração dos biopolímeros, que o valor de $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ calculado varia entre 1,4 e 1,6. A polidispersão de

amostras de xantana apresentam valores típicos de $M_w/M_n = 2,8$ (Holzwarth, 1978). Porém, valores menores de $M_w/M_n = 2,0$ (Coviello *et al.*, 1987), $M_w/M_n = 1,4$ (Lecourtier & Chauventeau, 1984; Esquenet & Buhler, 2002), $M_w/M_n = 1,2$ e $M_w/M_n = 1,1$ (Lee & Brant, 2002) são encontrados na literatura.

Os valores do raio hidrodinâmico, nas diferentes concentrações das soluções dos biopolímeros (Tab. 1), foram comparados com os valores presentes na literatura, sumarizados na Tab. 2. Como os valores apresentados na literatura são valores médios de raio hidrodinâmico, para poder comparar os resultados, os valores de raios hidrodinâmico médio ponderados pela intensidade foram calculados, os quais não foram apresentados. O raio hidrodinâmico médio calculado para a Xc 06 apresentou valor compatível aos apresentados por Southwick *et al.* (1980) para amostra de xantana comercial Kelzan (Kelco – Estados Unidos da América) após aquecimento e Coviello *et al.* (1986) para a amostra nativa.

Tabela 2

Valores de raio hidrodinâmico para soluções de xantana citados na literatura.

Referência	Técnica	Solvente/Concentração	Tratamento	R_H (nm)	
Southwick <i>et al.</i> (1979)	DLS	aquosa / $0,125\text{g.L}^{-1}$		146	
Southwick <i>et al.</i> (1980)	DLS	aquosa / 1g.L^{-1}	sem aquecimento	90,5	
			após aquecimento	110	
		4M uréia / 1g.L^{-1}		80	
			nativa	137,2	
Coviello <i>et al.</i> (1986)	SLS e DLS	0,1M NaCl / 1g.L^{-1}	desacetilada	81,5	
			despiruvatada	81,5	
Kojima & Berryt (1988)	Reologia e DLS	0,62N NaCl		$\theta=30^\circ$	$\theta=90^\circ$
		$2,2\text{g.L}^{-1}$		42,3	-----
		$1,3\text{g.L}^{-1}$		94	70,4
		$0,61\text{g.L}^{-1}$		157	37,4
		$0,19\text{g.L}^{-1}$		165	17,6
Rodd, Dunstan & Boger (2001)	DLS	0,085M NaCl / 5g.L^{-1}		909nm	

A diferença no valor do R_H apresentada por Southwick *et al.* (1980), comparando as amostras sem aquecimento e após o aquecimento, foi atribuída a mudança de conformação (ordenada-desordenada) que ocorre na molécula de xantana e a desagregação entre as cadeias. Os autores relataram que, após o aquecimento e resfriamento da solução, as moléculas retornaram a conformação ordenada de maneira menos organizada e isso gerou o raio

hidrodinâmico maior. Em comparação com a solução de uréia, os autores atribuíram o menor raio hidrodinâmico a eliminação das ligações hidrogênio. Os resultados apresentados por Kojima e Berry (1988) mostraram que, de acordo com o decréscimo de concentração das soluções, em ângulo de detecção de 30°, o R_H aumentou, porém, em ângulo de detecção de 90° o R_H diminuiu. Comparando, para a mesma faixa de concentrações, os resultados obtidos através de análise por retro-espalhamento (173°), observou-se comportamento semelhante ao apresentado para o ângulo de 90°. Rodd *et al.* (2001) constataram que o alto valor do raio hidrodinâmico ocorreu devido à presença de agregados na amostra. Utilizando cromatografia de exclusão por tamanho acoplada ao espalhamento de luz multi-ângulo verificaram que o agregado era formado por aproximadamente 600 moléculas. A variação nos valores apresentados na literatura pode ser atribuída as diferentes conformações estruturais que a molécula de xantana apresenta de acordo com o solvente utilizado.

4. Conclusão

A partir dos resultados apresentados, foi possível confirmar que o raio hidrodinâmico, a polidispersão e a distribuição de tamanhos dos biopolímeros variaram de acordo com a concentração das soluções aquosas. O aumento da concentração das soluções ocasionou a formação de agregados intermoleculares, os quais ocasionaram diferentes modos de distribuição de tamanhos por intensidade. Estes agregados foram formados nos regimes semidiluído e concentrado e apresentaram raio hidrodinâmico superior ao raio das partículas em regime diluído. O índice de polidispersão aumentou de acordo com o aumento da concentração das soluções, uma vez que surgiram novas distribuições em tamanhos maiores. A largura dos picos de distribuição de tamanhos diminuiu com o aumento de concentração.

5. Referências Bibliográficas

- Andrade, C. T., Azero, E. G., Luciano, L., Gonçalves, M. P. (1999). Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 26, p. 181–185.
- Berne, B. J., & Pecora, R. (2000). *Dynamic Light Scattering With Applications to Chemistry, Biology and Physics*. Ed. Dover Publications. New York, USA.

- Berne, B. J., & Pecora, R. (1976). *Dynamic Light Scattering*. Ed. John Wiley & Sons Inc. New York, USA.
- Brito, A. C. F; Sierakowski, M. R; Reicher, F; Feitosa, J. P. A; De Paula, R. C. M. (2005). Dynamic rheological study of *Sterculia striata* and karaya polysaccharides in aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 861–867.
- Chamberlain, E. K; Rao, M. A. (2000). Effect of concentration on rheological properties of acidic-hydrolyzed amylopectin solutions. *Food Hydrocolloids*, v. 14, p. 163–171.
- Coviello, T., Burchard, T. W., Dentini, M., Crescenzi, V. (1987). Solution Properties of Xanthan. 2. Dynamic and Static Light Scattering from Semidilute Solution. *Macromolecules*, v. 20, p. 1102-1107.
- Coviello, T., Kajiwar, K., Burchard, T. W., Dentini, M., Crescenzi, V. (1986). Solution Properties of Xanthan. 1. Dynamic and Static Light Scattering from Native and Modified Xanthans in Dilute Solutions. *Macromolecules*, v. 19, p. 2826-2831.
- De Gennes, P. G. (1979). *Scaling concepts in polymer solutions*, London: Cornell University Press.
- De Gennes, P. G. (1976). Dynamics of Entangled Polymer Solutions. II. Inclusion of hydrodynamic interactions. *Macromolecules*, v. 9 p. 594-598.
- Esquenet, C., & Buhler, E. (2002). Aggregation Behavior in Semidilute Rigid and Semirigid Polysaccharide Solutions. *Macromolecules*, v. 35, p. 3708-3716.
- Goh, K. K. T; Pinder, D. N; Hall, C. E; Hemar, Y. (2006). Rheological and Light Scattering Properties of Flaxseed Polysaccharide Aqueous Solutions. *Biomacromolecules*, p. 3098-3103, v. 7.
- Haynes, W. C., Wickerham, L. J., Hesseltine, C. W. (1955). Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. *Applied Microbiology*, v. 3, p.361-368.
- Holzwarth, G. (1978). Molecular weight of xanthan polysaccharide. *Carbohydrate Research*, v. 66, p. 173-186.
- Huang, X; Kakuda, Y; Cui, W. (2001). Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, p. 533-542, v. 15.
- International Standard ISO13321. (1996). *Methods for determination of particle size distribution part 8: photon correlation spectroscopy*. International Organization for Standardization (ISO).

- Kaszuba, M; McKnight, D; Connah, M. T; McNeil-Watson, F. K; Nobbmann, U. (2007). Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research*, Springer Science+Business Media B.V. 7p.
- Kojima, T; Berry, G. C. (1988). Solution properties of xanthan. Light scattering and viscometry on dilute and moderately concentrated solutions. *Polymer*, v. 29, p. 2249-2260.
- Lecourtier, J; Chauveteau, G. (1984). Xanthan Fractionation by Surface Exclusion Chromatography. *Macromolecules*, v. 17, p. 1340-1343.
- Lee, H-C; Brant, D. A. (2002). Rheology of Concentrated Isotropic and Anisotropic Xanthan Solutions. 1. A Rodlike Low Molecular Weight Sample. *Macromolecules*, v. 35, p. 2212-2222.
- Lucas, E. F; Soares, B. G; Monteiro, E. (2001). *Caracterização de Polímeros*. Ed. E-papers Serviços Editoriais Ltda. Rio de Janeiro, Brasil.
- Malvern Instruments LTD. (2005). *Zetasizer Nano Series User Manual*. 2ed. Worcestershire. United Kingdom: Malvern.
- MicheL, R. C; Reed, W. F. (2000). New evidence of the nonequilibrium nature of the “slow modes” of diffusion in polyelectrolyte solutions. *Biopolymers*, v. 53, p. 19-39.
- Milas, M; Reed, W. F; Printz, S. (1996). Conformations and flexibility of native and re-natured xanthan in aqueous solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 18, p. 211-221.
- Moreira, A. N; Moreira, A. S; Diaz, P. S; Vendruscolo, C. T, Del Pino, F. A. B. (2005). Rheological behaviour and chemical composition of the *Beijerinckia* sp. 7070 bacterial biopolymer produced by an enzymatic pathway. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 8, n. 2, p. 135-142.
- Moreira, A. da S., Vendruscolo, J. L. S., Gil-Turnes, C., Vendruscolo, C. T. (2001). Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. *Food Hydrocolloids*, v. 15, p. 469-474.
- Muro, M. A; Luchi, M. R. (1989). *Preservação de Microrganismos*. Campinas: Editora da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”.
- Narayanan, J; Deotare, V. W; Bandyopadhyay, R; Soody, A. K. (2002). Gelation of Aqueous Pectin Solutions: A Dynamic Light Scattering Study. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 245, p. 267–273.

- Nash, W., Pinder, D. N., Hemar, Y., Singh, H. B. (2002). Dynamic light scattering investigation of sodium caseinate and xanthan mixtures. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 30, p. 269-271.
- Norwood, D. P; Benmouna, M; Reed, W. F. (1996). Static Light Scattering from Mixtures of Polyelectrolytes in Low Ionic Strength Solutions. *Macromolecules*, v. 29, p. 4293-4304.
- Pan, A., Moreira, A. S., Vendruscolo, C.T. (2000). Efeito da concentração inicial do inóculo no crescimento celular e qualidade de biopolímeros de *Xantomonas campestris* pv. pruni cepa 06. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 6, n. 3, p. 273-277.
- Pecora, R. (1985). *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*. Plenum Press, New York.
- Peters, R. (2000). Fibre optic device for detecting the scattered light of fluorescent light from a suspension. US Patent 6,016,195.
- Provencher, S. W. (1982). CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer Physics Communications*, v. 27, p. 229-242.
- Provencher, S. W. (1979). Inverse problems in polymer characterization: direct analysis of polydispersity with photon correlation spectroscopy. *Makromolecule Chemistry*, v. 180, p. 201-209.
- Rodd, A. B., Dunstan, D. E., Boger, D. V., Schmidt, J., Burchard, W. (2001). Heterodyne and Nonergodic Approach to Dynamic Light Scattering of Polymer Gels: Aqueous Xanthan in the Presence of Metal Ions. (Aluminum(III)) *Macromolecules*, v. 34, p. 3339-3352.
- Rodd, A. B., Dunstan, D. E., Boger, D. V. (2000). Characterisation of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. *Carbohydrate Polymers*, v. 42, p. 159-174.
- Salinas; S. R. A. (2005). História da Física - Einstein e a teoria do movimento browniano. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 27, n. 2, p. 263 - 269.
- Silva, D. A; Feitosa, J. P. A; Maciel, J. S; Paula, H. C. B; De Paula, R. C. M. (2006). Characterization of crosslinked cashew gum derivatives. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 16-26.
- Southwick, J. G; Lee, H; Jamieson, A. M; Blackwell, J. (1980). Self-association of xanthan in aqueous solvent-systems. *Carbohydrate Research*, v. 84, p. 287-295.

- Southwick, J. G; McDonnell, M. E; Jamieson, A. M; Blackwell, M. (1979). Solution Studies of Xanthan Gum Employing Quasielastic Light Scattering. *Macromolecules*, v. 12, n. 2, p. 305-311.
- Vendruscolo, C.T. (1995). *Produção e caracterização do biopolímero produzido por Beijerinckia sp. isolada do solo da região de Ribeirão Preto-SP Brasil*. Campinas. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

6 Conclusão Geral

As propriedades dinâmicas e químicas dos biopolímeros mostraram ser dependentes das cepas bacterianas utilizadas na síntese dos biopolímeros e dos processos fermentativos e pós-fermentativos. Esta dependência foi a causa das diferenças nos resultados obtidos entre os biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* e *Beijerinckia* sp. As modificações no comportamento das propriedades hidrodinâmicas dos biopolímeros, de acordo com a variação das concentrações das soluções, foram estabelecidas através da determinação das concentrações críticas de sobreposição, c^* , e de agregação, c^{**} . Para as soluções dos biopolímeros xantana e tara, as concentrações críticas foram determinadas utilizando uma curva teórica proposta para descrever o comportamento do coeficiente de difusão translacional em função da concentração, quando analisado por retro-espalhamento. Para a clairana, as modificações no comportamento das propriedades hidrodinâmicas foram estabelecidas utilizando-se as curvas de Distribuição dos Tempos de Relaxação. As duas metodologias empregadas na determinação dos regimes dinâmicos de concentração mostraram-se adequadas, fornecendo valores concordantes com os resultados apresentados na literatura. As alterações no raio hidrodinâmico foram verificadas nos regimes semidiluído e concentrado, devido à formação de agregados intermoleculares. Estes agregados apresentaram modo lento de difusão, conseqüentemente, raio hidrodinâmico maior que o apresentado pelas partículas em regime diluído de concentração. A formação destes agregados ocasionou aumento do índice de polidispersão e diferentes modos de distribuição de tamanhos.

7 Referências Bibliográficas

ANTUNES, A. E. C; MOREIRA, A. S; VENDRUSCOLO, J. L. S; VENDRUSCOLO, C. T. Screening of *Xanthomonas campestris* pv pruni strains according to their production of xanthan and its viscosity and chemical composition. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 317-322, 2003.

ANTUNES, A. E. C; MOREIRA, A. S; VENDRUSCOLO, J. L. S; VENDRUSCOLO, C. T. Síntese de biopolímero xantana em meios convencionais e alternativos: viscosidade x composição. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, n. 2, p. 83-87, 2000.

ASPINALL, G. O. Structural chemistry of the hemicelluloses. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 14, p. 429-468, 1959.

BARBOSA, H. R; STRUCKEL, Y. F. Slime production by *Beijerinckia derxii*: effects of cultural conditions. **Soil Biol. Biochem**, v. 17, n. 5, p. 731-732, 1985.

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

BORGES, C. D; VENDRUSCOLO, C. T. Xanthan Synthesized by Strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni: Production, Viscosity and Chemical Composition. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 4, p. 67-73, 2007.

BORGES, C. D; MOREIRA, A. N; MOREIRA, A. S; DEL PINO, F. A. B; VENDRUSCOLO, C. T. Caracterização de Biopolímeros Produzidos por *Beijerinckia* sp. 7070 em Diferentes Tempos de Fermentação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 327-332, 2004.

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

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

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

CARRINGTON, E; ODELL, J; FISHER, L; MITCHELL, J; HARTLEY, L. Polyelectrolyte behaviour of dilute xanthan solutions: salt effects on extensional rheology. **Polymer**, v. 37, n. 13, p. 2871-2875, 1996.

CHEN, C. S. H; SHEPPARD, E. W. Conformation and Shear Stability of Xanthan Gum in Solution. **Polymer Engineering and Science**, v. 20, n. 7, p. 512-516, 1980.

CIVEROLO, E. L; HATTINGH, M.J. *Xanthomonas campestris* pv *pruni*: Cause of Prunus Bacterial Spot. In: SWINGS, J. G; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993. p.60-64.

CPKELCO. **Xanthan gum book**. 8^o edição. p.27, 2007. Disponível em: <http://w.w.w.cpkelco.com>. Acessado em julho de 2007.

DEA, I. C. M; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Advanced Carbohydrate Chemistry Biochemistry**, v. 31, p. 241-312, 1975.

DEA, I. C. M; MORRIS, E. R; REES, D. A; WELSH, E. J; BARNES, H. A; PRICE, J. Associations of like and unlike polysaccharides: mechanism and specificity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides and related systems. **Carbohydrate Research**, v. 57, p. 249–272, 1977.

DOI, M; EDWARDS, S. F. **The Theory of Polymer Dynamics**. New York: Oxford University Press, 1986, p. 391.

DOBEREINER, J. Sobre a ocorrência de *Beijerinckia* em alguns Estados do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 2, n.19, p. 151-160. 1959.

ERNANDES, F. M. P. G; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, p. 71-82, 2005.

FERNANDES, P. B; GONÇALVES, M. P; DOUBLIER, J. L. A Rheological Characterization of Kappa-Carrageenan/Galactomannan Mixed Gels: A Comparison of Locust Bean Gum Samples. **Carbohydrate Polymers**, v. 16, p. 253-274, 1991.

FSANZ - FOOD STANDARDS AUSTRALIA NEW ZEALAND CODE. **APPLICATION A546: TARA GUM AS A FOOD ADDITIVE**. p. 1-15, 2005.

GARCIA-OCHOA, F; SANTOS, V. E; CASA, A; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549-579, 2000.

GUNASEKARAN, S; AK, M. M. **Cheese rheology and textury**. New York, Ed. CRC Press, 2003, p. 437.

HOEFLER, A. C. **Hydrocolloids**. 1ed. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 2004, 111p.

HOLZWARTH, G; OGLETREE, J. Pyruvate-Free Xanthan. **Carbohydrate Research**, v. 76, p. 277-80, 1979.

HOLZWARTH, G. Molecular weight of xanthan polysaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 66, p. 173-186, 1978.

HOLZWARTH, G., PRESTRIDGE, E. B. Multistranded Helix in Xanthan Polysaccharide. *Science*, v. 197, p. 757-759, 1977.

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, sob o nº PI 0406309-0, de 05 de novembro de 2004. (2006). **Processo de produção de biopolímero tipo xantana, biopolímero obtido, seus usos; meio de cultura para crescimento de *Xanthomonas* e uso da mesma para produção de biopolímero.** *Revista da Propriedade Industrial*, n. 1849, p. 186.

JAMIESON, A. M; SOUTHWICK, J. G; BLACKWELL, J. Dynamical Behavior of Xanthan Polysaccharide in Solution. **Journal of Polymer Science**, v. 20, p. 1513-1524, 1982.

JANSSON, P. E; KENNE, L; LINDBERG, B. Structure of the exocellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v. 45, p. 275-285, 1975.

JEANES, A.; PITTSLEY, J. E; SENTI, F. R. Polysaccharide B-1459: a new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. **Journal Applied Polymer**, v.5, p.519-526, 1961.

KANG K. S; MCNEELY W. H. PS-7 a new bacterial hetero-polysaccharide. In: SANDFORD P. A; LASKIN A. **Extracellular microbial polysaccharides**. Washington: American Chemical Society; 1977, p. 220–230.

LAGUNA, M. T. R; TARAZONA, M. P; SAIZ, E. The use of molecular dynamics for the study of solution properties of guar gum. **Journal of Chemical Physics**, p. 1148-1156, v. 119, n. 2, 2003.

LAMBERT, F; MILAS, M; RINAUDO, M. Sodium and calcium counterion activity in the presence of xanthan polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 7, p. 49-52, 1985.

LAPASIN, R.; PRICL, S. Rheology of polysaccharide systems. In: LAPASIN, R; PRICL, S. **Rheology of industrial polysaccharides. Theory and applications**. London: Blackie Academic and Professional, 1995. p. 250–494.

LAPASIN, R; PRICL, S; PAOLETTI, S; ZANETTI, F. Novel rheological model for the gelation kinetics of ionic polysaccharides. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 41, n7-8, p. 1395 – 1410, 1990.

LILLY, V. G; WILSON, H. A; LEARCH, J. G. Bacterial polysaccharides II. Laboratory Scale production of polysaccharides by species *X. campestris*. **Applied Microbiology**, v. 6, 105-109, 1958.

LIU, W; NORISUYE, T. Thermally induced conformation change of xanthan: interpretation of viscosity behaviour in 0.01M aqueous sodium chloride. **Journal of Biological Macromolecules**, v.10, p. 44-50, 1988.

MACHADO, M. I; VENDRUSCOLO, C.T; MATTOS, M.L.T. Isolamento e caracterização de *Azotobacter* e *Beijerinckia* de solo do Rio Grande do Sul – Brasil. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE LA CIENCIA DEL SOLO, Tucon. **Resumo...** Tucon: 1999. v.1, p. 123-127, 1999.

MARCOTTE, M; HOSHAHILIA, A. R. T; RAMASWAMY, H. S. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. **Food Research International**, v. 34, p. 695–703, 2001.

MARTÍNEZ-PADILLA, L. P; CABADA-CELIS, N. Rheological and functional characterization of a biopolymer obtained from *Beijerinckia* sp. **Food Science and Technology International**, v. 2, n. 6, p. 405-411, 1996.

MAUGERI, F. Produção de Polissacarídeos. In: LIMA, U. A; AQUARONE, E; BORZANI, W; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. v. 3, São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001, p. 125-154.

MEYER, E. L; FULLER, G. G; CLARK, R. C; KULICKE, W.-M. Investigation of Xanthan Gum Solution Behavior under Shear Flow Using Rheoptical Techniques. **Macromolecules**, v. 26, p. 504-511, 1993.

MILAS, M; RINAUDO, M; KNIPPER, M; SCHUPPISER, J. L. Flow and Viscoelastic Properties of Xanthan Gum Solutions. **Macromolecules**, v. 23, n 9, p. 2506-2511, 1990.

MOHAMMED, Z.H; HAQUE, A; RICHARDSON, R. K; MORRIS, E. R. Promotion and inhibition of xanthan 'weak-gel' rheology by calcium ions. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 38–45, 2007.

MOORHOUSE, R; WILKINSHAW, M. D; ARNOTT, S. **Extracellular Microbial Polysaccharides**. ACS Symposium Series 45; American Chemical Society: Washington, 1977. p. 90-100.

MOREIRA, A. N; MOREIRA, A. S; DIAZ, P. S; VENDRUSCOLO, C. T, DEL PINO, F. A. B. Rheological behaviour and chemical composition of the *Beijerinckia* sp. 7070 bacterial biopolymer produced by an enzymatic pathway. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 2, p. 135-142, 2005.

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

MOREIRA, A. da S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni***. 2002, 75f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MOREIRA, A. da 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.

MOREIRA, A. da S; SOUZA, A. da S; VENDRUSCOLO, C. T. Determinação da Composição de Biopolímero por Cromatografia em Camada Delgada: Metodologia. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 4, n. 3, p. 222-224, 1998.

MORRIS, E.R; REES, D. A; YOUNG, G; WALKINSHAW, M. D; DARKE, A. Order-disorder transition for a bacterial polysaccharide in solution. A role for polysaccharide conformation in recognition between *Xanthomonas* pathogen and its plant host. **Journal of Molecular Biology**, v. 110, p. 1-16, 1977.

MORRIS, E. R. Polysaccharide rheology and in-mouth perception. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 517-546.

MULLER, G; ANHOURRACHE, M; LECOURTIER, J; CHAUVETEAU, G. Salt Dependence of the Conformation of a Single Stranded Xanthan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 8, p. 167-172, 1986.

MULLER, G; LECOURTIER, J; CHAUVETEAU, G; ALLAIN, C. Conformation of the Xanthan Molecule in an Ordered Structure. **Makromolecular Chemistry Rapid Communications**, v. 5, p. 203-208, 1984.

NASH, W; PINDER, D. N; HEMAR, Y; SINGH, H. B. Dynamic light scattering investigation of sodium caseinate and xanthan mixtures. **International Journal of Biological Macromolecules**, n 30, p. 269-271, 2002.

NOLTE, H; JOHN, S; SMIDSROD, O; STOKKE, B. T. Gelation of xanthan with trivalent metal ions. **Carbohydrate Polymers**, v. 18, p. 243- 251, 1992.

NORTON, I. T; GOODALL, D. M; FRANGOU, S. A; MORRIS, E. R; REES, D. A. Mechanism and dynamics of conformational ordering in xanthan polysaccharide. **Journal of Molecular Biology**, v. 175, p. 371-394, 1984.

OHTANI, K; YASUDA, S; HIRUTA, O; UOTANI, K; TATSUTA, K; MISAKI, A. Characterization of an Extracellular Polysaccharide Elaborated by TX-1, a New Strain of *Beijerinckia indica*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 9, p. 1628-1631, 1995.

PADILHA, F. F; VENDRUSCOLO, J. L; DELLAGOSTIN, O. A; SCAMPARINI, A. R. P; VENDRUSCOLO, C. T. Studies on production and rheology of a polysaccharide synthesized by *Beijerinckia* sp strain 7070. In: K. Nishinari, **Hydrocolloids. Part 1. Physical Chemistry and Industrial Application of Gels Polysaccharides and Proteins**. Osaka University: Osaka, Japan; 2000, p. 179-185.

PADILHA, F. F; DELLAGOSTIN, O. A; VENDRUSCOLO, C. T. Composição Química do Biopolímero de *Beijerinckia* sp. cepa 7070 por Cromatografia em Camada Delgada. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 4, n. 3, 231-233, 1998.

PADILHA, F. F. **Síntese e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. cepa 7070**. Pelotas, 1997. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

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.

PETTITT, D. Xathan gum. In: GLICKSMAN, M. **Food Hydrocolloids**. CRC Press: New York, 1982. p. 127-149.

PICOUT, D. R; ROSS-MURPHY, S. B; JUMEL, K; HARDIN, S. E. Pressure Cell Assisted Solution Characterization of Polysaccharides. 2. Locust Bean Gum and Tara Gum. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 761-767, 2003.

PINTO, E. P; MOREIRA, A. S; VENDRUSCOLO, C. T. Influência do pH, Adição de Sais e Temperatura na Viscosidade dos Biopolímeros Produzidos por *Beijerinckia* sp. cepas 7070 e UR4. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 8, n. 3, p. 247-251, 2002.

RINAUDO, M. Role of Substituents on the Properties of Some Polysaccharides. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1155-1165, 2004.

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

ROCKS, J. K. Xanthan gum. **Food Technology**, v. 25, p. 22-31, 1971.

RODD, A. B; COOPER-WHITE, J; DUNSTAN, D. E; BOGER, D. G. Gel point studies for chemically modified biopolymer networks using small amplitude oscillatory rheometry. **Polymer**, v. 42, p. 185–198, 2001.

RODD, A. B; DUNSTAN, D. E; BOGER, D. V. Characterisation of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 159–174, 2000.

ROSS-MURPHY, S. B; MORRIS, V. J; MORRIS, E. R. Molecular viscoelasticity of xanthan polysaccharide. **Faraday Symposium Chemical Society**, v. 18, p. 115, 1983.

RUIZ-ANGEL, M. J; SIMO-ALFONSO, E. F; MONGAY-FERNANDEZ, C; RAMIS-RAMOS, G. Identification of leguminosae gums and evaluation of carob–guar

mixtures by capillary zone electrophoresis of protein extracts. **Electrophoresis**, v. 23, p. 1709–1715, 2002.

SATO, T; NORISUYE, T; FUJITA, H. Double-stranded helix of xanthan: dimensional and hydrodynamic properties in 0,1M aqueous sodium chloride. **Macromolecules**, v. 14, p. 2696-2700, 1984.

SCAMPARINI, A. R. P; VENDRUSCOLO, C. T; MALDONE, I; DRUZIAN, J; MARIUZZO, D. New biopolymers produced by nitrogen fixing microorganisms for use in foods. In: K. Nishinari, **Hydrocolloids. Part 1. Physical Chemistry and Industrial Application of Gels Polysaccharides and Proteins**. Osaka, Japan: Osaka University; 2000, p. 169-178.

SCAMPARINI, A. R. P; MARIUZZO, D; FUJIHARA, H; JACOBUSI, R; VENDRUSCOLO, C. T. Structural studies of CV-70 polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, p. 115-121, 1997.

SHATWELL, K. P; SUTHERLAND, I. W; DEA, I. C. M; ROSS-MURPHY, S. B; The influence of acetyl and pyruvate substituents on the helix-coil transition behaviour of xanthan. **Carbohydrate Research**, v.206, p. 87-103. 1990.

SITTIKIYOTHIN, W; TORRES, D; GONÇALVES, M. P. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 339–350, 2005.

SLONEKER, J. H; JEANES, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Part III: Structure. **Canadian Journal of Chemistry**, v.40, p.2066-2071, 1962.

SMITH, I. H; SYMES, K. C; LAWSON, C. J; MORRIS, E. R. Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 3, p. 129-134, 1981.

SOUTHWICK, J. G., JAMIESON, A. M., BLACKWELL, J. Quasi-Elastic Light Scattering Studies of Semidilute Xanthan Solutions. **Macromolecules**, v 14, p. 1728-1732, 1982.

SOUTHWICK, J. G; LEE, H; JAMIESON, A. M; BLACKWELL, J. Self-association of xanthan in aqueous solvent-systems. **Carbohydrate Research**, 84, p. 287-295, 1980.

SOUZA, A. S; VENDRUSCOLO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepas 24 e 58. **Ciência e Engenharia**, v. 8, n. 2, p. 115-123, 1999.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 663–674, 2001.

STEINBUCHER, A; DOI, Y. **Biotechnology of Biopolymers - Synthesis to Patents**. Weinheim: Hardcover, 2005. p. 535-574.

STOKKE, B; CHRISTENSEN, B; SMIDSRØD, O. Macromolecular properties of xanthan. In: DUMITRIU, S. **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 433.

STOKKE, B. T; ELGSAETER, A; SMIDSRØD, O. Electron microscopic study of single- and double-stranded xanthan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 8, p. 217-225, 1986.

SWORN, G. Xanthan gum. In: PHILLIPS, G. O; WILLIAMS, P. A. **Handbook of Hydrocolloids**, New York: CRC Press, 2000. p. 103-116.

TAKO, M. Synergistic interaction between xanthan and tara-bean gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 10, p. 619-633, 1991.

TAKO, M; NAKAMURA, S. Synergistic Interaction Between Xanthan and Guar Gum. **Carbohydrate Research**, v. 138, p. 207-213, 1985.

TEIXEIRA, A. M. **Tempo de fermentação na produção e qualidade de xantana e no perfil eletroforético de *X. campestris* pv *pruni***. 2005, 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

TINLAND, B; MARET, G; RINAUDO, M. Reptation in Semidilute Solutions of Wormlike Polymers. **Macromolecules**, v. 23, nº 2, p. 596-602, 1990.

TINLAND, B; RINAUDO, M. Dependence of the Stiffness of the Xanthan Chain on the External Salt Concentration. **Macromolecules**, v. 22, n. 4, p. 1863-1865, 1990.

VENDRUSCOLO, C.T. **Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. isolada do solo da região de Ribeirão Preto-SP Brasil**. Campinas, 1995. 143f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

YING, Q; CHU, B. Overlap Concentration of Macromolecules in Solution. **Macromolecules**, v. 20, p. 362-366, 1987.

YOO, D. S; HARCUM, S. W. Xanthan gum production from waste sugar beet pulp. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 105-109, 1999.

WHITCOMB, P. J. Rheology of Xanthan Gum. **Journal of Rheology**, v. 22, n. 5, p. 493-505, 1978.