

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



Dissertação

Caracterização hidrodinâmica de xantanas sintetizadas por diferentes cepas de
***Xanthomonas arboricola* pv pruni e meios de produção**

Bianca de Oliveira Molon

Pelotas, 2020

Bianca de Oliveira Molon

**Caracterização hidrodinâmica de xantanas sintetizadas por diferentes cepas de
Xanthomonas arboricola pv pruni e meios de produção**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (área do conhecimento: Microbiologia de Alimentos).

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Silva Diaz

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M728c Molon, Bianca de Oliveira

Caracterização hidrodinâmica de xantanas sintetizadas por diferentes cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni e meios de produção / Bianca de Oliveira Molon ; Patrícia Silva Diaz, orientadora. — Pelotas, 2020.

49 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Espalhamento de luz. 2. Xantana. 3. Massa molar. 4. Raio hidrodinâmico. I. Diaz, Patrícia Silva, orient. II. Título.

CDD : 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Patrícia Diaz de Oliveira (Orientadora, UFPel, Biotecnologia e PPGCTA)

Profa. Dra. Luciana Bicca Dode (UFPel, Biotecnologia)

Dra. Karine Laste Macagnan (UFPel, Biotecnologia)

Dra. Janaína Oliveira Gonçalves (UFSM, Departamento de Engenharia Química)

Para minha família e amigos, com carinho.

Dedico.

Agradecimentos

A Deus, que está sempre junto comigo, me guiando e colocando pessoas e oportunidades no meu caminho.

Aos meus pais Gabriel e Marcia Molon, por toda dedicação, carinho, amor. A minha gêmea, Bruna Molon, por toda ajuda e dedicação. Aos meus irmãos Fabrício e Felipe Molon, pela paciência e carinho que tiveram comigo, por todo amor e ensinamento. A toda minha família, obrigada pelas orações e incentivos.

A minha orientadora Patrícia Silva Diaz, por todo carinho e atenção, por todo ensinamento e disponibilidade. Obrigada por nunca desistir das manas.

A Doutoranda Bruna Silva de Farias, por todo trabalho, empenho e ensinamento no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu grande amigo e colega Adriel Penha Munhoz, por toda dedicação, paciência e oração.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos - TecBio e Laboratório de Biopolímeros, por toda ajuda, paciência, ensinamentos e por todos os momentos que compartilhamos um pouquinho de cada um. Obrigada a todos.

Aos meus amigos, amigos da infância, da graduação, da Igreja, aos amigos irmãos que estão sempre comigo fisicamente ou em oração, que torcem pelo meu bem e que me ajudam a superar minhas dificuldades. Obrigada por tudo.

A Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realizar o mestrado.

A todos os laboratórios da UFPel e FURG que de alguma forma ajudaram a realização das análises deste trabalho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade, atenção e conhecimento depositados neste trabalho. Aos professores, técnicos e funcionários do núcleo de Biotecnologia, por toda atenção.

A CAPES e CNPQ pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ninguém de nós é tão bom quanto todos nós juntos.

Resumo

MOLON, Bianca de Oliveira. **Caracterização hidrodinâmica de xantanas sintetizadas por diferentes cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni e meios de produção**. 2020. XXf. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A goma xantana é um biopolímero microbiano produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas*, amplamente utilizada na indústria de alimentos, farmacêutica e petrolífera. As propriedades da goma estão diretamente relacionadas com a sua composição química, massa molar e estrutura morfológica. A xantana comercial apresenta uma estrutura química primária composta por repetidas unidades pentassacarídicas, formadas por duas unidades de glicose, duas unidades de manose e uma unidade de ácido glicurônico. A xantana pruni apresenta em sua estrutura, além da estrutura característica da xantana, uma molécula de ramnose. A escolha da cepa de *Xanthomonas*, a composição do meio e as condições operacionais de produção afetam a massa molar, viscosidade, a quantidade de substituinte acetila e piruvato, e além disso influencia na solubilidade da goma xantana produzida. Neste trabalho foram estudados o comportamento das propriedades hidrodinâmicas de 10 cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni e uma cepa padrão comercial para comparação. Cada xantana foi produzida em 2 meios de produção diferentes, o meio de cultura MPI+II (meio A) composto por: sacarose; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; K_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; MgSO_4 ; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$; H_3BO_3 ; FeCl_3 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; ZnSO_4 , e o meio de cultura MP II (meio B) composto por: sacarose; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; K_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; MgSO_4 . Na caracterização das gomas, utilizou-se o espalhamento de luz para determinar o raio hidrodinâmico, o índice de polidispersão, a distribuição do tamanho de partícula e a massa molar das xantanas sintetizadas. Um caracterizador de partículas em dispersões líquidas, Litesizer™ 500, foi utilizado para análises. As xantanas produzidas pelas 11 cepas apresentaram raio hidrodinâmico e massa molar diferentes entre elas e uma polidispersão aceitável indicando uma população homogênea. A distribuição de tamanho por intensidade das xantanas indicaram que as soluções de xantanas estão no regime diluído de concentração. O meio de produção teve influência nas propriedades hidrodinâmicas das xantanas estudadas. A caracterização hidrodinâmica por espalhamento de luz, foi essencial para conhecer o tamanho e a massa molar das xantanas sintetizadas e corroborando com novas pesquisas em diferentes áreas.

Palavras-chave: espalhamento de luz; xantana; massa molar; raio hidrodinâmico

Abstract

MOLON, Bianca de Oliveira. **Caracterização hidrodinâmica de xantanas sintetizadas por diferentes cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* e meios de produção**. 2020. 49f. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Xanthan gum is a microbial biopolymer produced by bacteria of the genus *Xanthomonas*, widely used in the food, pharmaceutical and oil industry. The properties of gum are directly related to its chemical composition, molar mass and morphological structure. Commercial xanthan has a primary chemical structure composed of repeated pentasaccharide units, formed by two units of glucose, two units of mannose and one unit of glucuronic acid. In addition to the characteristic structure of xanthan, xanthan *pruni* has a rhamnose molecule. The choice of the *Xanthomonas* strain, the composition of the medium and the operational production conditions affect the molar mass, viscosity, the amount of acetyl and pyruvate, and furthermore influences the solubility of the produced xanthan gum. In this work, the behavior of the hydrodynamic properties of 10 strains of *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* and a standard commercial strain for comparison were studied. Each xanthan was produced in 2 different production medium, the MPI + II culture medium (medium A) composed of: sucrose; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; K_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; MgSO_4 ; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$; H_3BO_3 ; FeCl_3 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; ZnSO_4 , and the MPII culture medium (medium B) composed of: sucrose; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; K_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; MgSO_4 . In the characterization of the gums, light scattering was used to determine the hydrodynamic radius, the polydispersity index, the particle size distribution and the molar mass of the synthesized xanthans. A particle characterizer in liquid dispersions, Litesizer™ 500, was used for analysis. The xanthans produced by the 11 strains showed different hydrodynamic radius and molar mass and an acceptable polydispersion indicating a homogeneous population. The size distribution by intensity of the xanthans indicated that the xanthan solutions are in the diluted concentration regime. The production medium had an influence on the hydrodynamic properties of the studied xanthans. Hydrodynamic characterization by light scattering was essential to know the size and molar mass of the synthesized xanthans and corroborating with new research in different areas.

Keywords: light scattering; xanthan; molar mass; hydrodynamic radius

Lista de Figuras

- Figura 1.** Estrutura química da xantana. Fonte: Adaptado de Xu et al., (2015).....15
- Figura 2.** Determinação de c^* e c^{**} por medidas do coeficiente de difusão em função da concentração para a xantana (Diaz, 2009).....22

Lista de Tabelas

Tabela 1. Caracterização hidrodinâmica, microrganismo e condições operacionais encontrado na literatura.....	19
---	----

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	Xantana	14
2.2	Meio de Produção da goma xantana	15
2.3	Caracterização hidrodinâmica	18
2.3.1	Massa molar de xantana	18
2.3.2	Teoria sobre espalhamento estático de luz (SLS).....	22
2.3.3	Raio Hidrodinâmico e Polidispersão de Xantana	24
2.3.4	Teoria sobre espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	25
3	HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	26
3.1	Hipótese.....	26
3.2	Objetivo Geral.....	26
3.3	Objetivos Específicos.....	27
4	CAPÍTULO 1	28
1	Introdução.....	29
2	Material e Métodos	31
2.1	Microrganismo.....	31
2.2	Meio de cultura.....	31
2.3	Produção de xantana	31
2.4	Recuperação de xantana	31
2.5	Preparação das soluções.....	32
2.6	Determinação do tamanho das partículas.....	32
2.7	Determinação da massa molar.....	33
2.8	Processamento de dados.....	33
3	Resultados e discussão.....	33
3.1	Raio hidrodinâmico e polidispersão.....	33

3.2 Distribuição do tamanho de partículas por intensidade.....	35
3.2 Massa Molar de xantana.....	40
4 Conclusão.....	41
5 Referência.....	42
5 CONCLUSÃO GERAL.....	44
6 REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

A goma xantana é um importante biopolímero produzido a partir bactérias gram-negativas do gênero *Xanthomonas*, através do processo fermentativo. É um polissacarídeo de elevada massa molar com cadeias ramificadas (GARCIA-OCHOA et al., 2000; DUMITRIU, 2005). A xantana é amplamente utilizada em diferentes áreas, tais como na indústria de alimentos e derivados, na indústria farmacêutica e de cosméticos como estabilizante, espessante e emulsificante. Estudos recentes apresentam a xantana misturadas a outros polissacarídeos como materiais proeminentes para embalagens de alimentos (MOHSIN et al., 2020; NEJADMANSOURI et al., 2020). Alguns pesquisadores afirmam que o sinergismo entre xantanas puras e xantanas modificadas podem estabilizar emulsões de óleo em água, ao contrário de agente espessantes clássicos e estabilizadores interfaciais (ROY et al., 2014; FANTOU et al., 2019; FANTOU et al., 2020).

A goma apresenta muitas vantagens em relação a outros polissacarídeos, sendo um polímero biodegradável e solúvel em água. Além disso apresenta propriedades reológicas característica e exibem alto fluxo pseudoplástico mesmo em baixas concentrações (GARCIA-OCHOA et al. 2000; JAMPALA et al., 2005; KENNEDY et al., 2015). As propriedades da goma xantana são influenciadas diretamente em função da sua composição química, ligação molecular e massa molar média (PAPAGIANNI et al., 2001).

A estrutura química apresentada na literatura é da xantana sintetizada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, a qual é composta de repetidas unidades pentassacarídicas, sendo a cadeia principal formada por várias unidades de β -D-glicose ligadas na posição um e quatro, semelhante à 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 et al.1975; GARCIA-OCHOA et al. 2000).

Desde o final do século XX, pesquisadores do Núcleo de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas (Pelotas/RS – Brasil), vêm desenvolvendo pesquisas na produção, caracterização e aplicação de biopolímeros obtidos por fermentação (SOUZA e VENDRUSCOLO, 1999; ANTUNES et al., 2000; ANTUNES et al., 2003; BORGES et al. 2009; DIAZ, 2002; MOREIRA et al., 2001; MOREIRA, 2002; BORGES e VENDRUSCULO, 2007; PINTO, 2005; VENDRUSCOLO et al., 2000; BOROWSKI, 2011; KLAIC, 2010; KLAIC,

2016; PREICHARDT, 2009; RODRIGUES, 2010; MOLON, 2019). Esses pesquisadores estudaram uma seleção de cepas das bactérias *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*, a produtividade e parâmetros de otimização de fermentação em escala de bancada, caracterizando a estrutura química e reologia das soluções aquosas de xantanas e suas possíveis aplicações e modificações químicas.

O emprego dos biopolímeros naturais está relacionado muitas vezes as suas características hidrodinâmicas, como a massa molar, tamanho de partícula e forma. A temperatura e a composição do solvente também são fatores relacionado a funcionalidade dos biopolímeros em solução, pois muitos desses polímeros se auto-associam e agregam quando em solução, como por exemplo, a goma xantana, carragenina e gelatina. A determinação desses parâmetros é fundamental para entender as propriedades e, conseqüentemente, a utilização em inúmeras aplicações (VIEBKE e WILLIAMS, 2000; LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

Na literatura encontram-se alguns métodos físico-químico para caracterização de polímeros, como cromatografia HPLC (SUH et al., 1990; PAPAGIANNI et al., 2001; Kalogiannis et al., 2003), HPSEC-MALLS/RI (FARIAS et al., 2011) e GPC / MALS (VIEBKE e WILLIAMS, 2000), e espalhamento de luz Nanosizer ZS (OLIVEIRA et al., 2013). A escolha do método depende da natureza, tamanho e forma do polímero.

O espalhamento de luz, método não-espectroscópicos, baseado nas interações entre as radiações eletromagnéticas e a matéria que resultam em alguma mudança na direção ou na propriedade física da radiação. Este método, fornece informações sobre a massa molar ponderal médio (M_w), raio de giração (R_g), raio hidrodinâmico (R_h) e magnitude das interações polímero-solvente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Xantana

A goma xantana é um polissacarídeo extracelular microbiano, natural sendo um biopolímero proeminente industrialmente. A goma é sintetizado a partir de bactéria fitopatogênica do gênero *Xanthomonas* através de processo fermentativo. O polissacarídeo foi descoberto na década de 1950 por pesquisadores da Northern Regional Research Laboratory (NRRL) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (JANSSON et al., 1975; GARCÍA-OCHOA et al., 2000). A produção em escala

industrial teve início em 1964, produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 (BORN et al., 2002; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; SUTHERLAND, 2001).

A xantana é um heteropolissacarídeo, que apresenta uma estrutura química primária composta de repetidas unidades pentassacarídicas, formadas por duas unidades de glicose, duas unidades de manose e uma unidade de ácido glicurônico (Figura 1) (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; MELTON et al., 1976, ROCHEFORT e MIDDLEMAN, 1987).

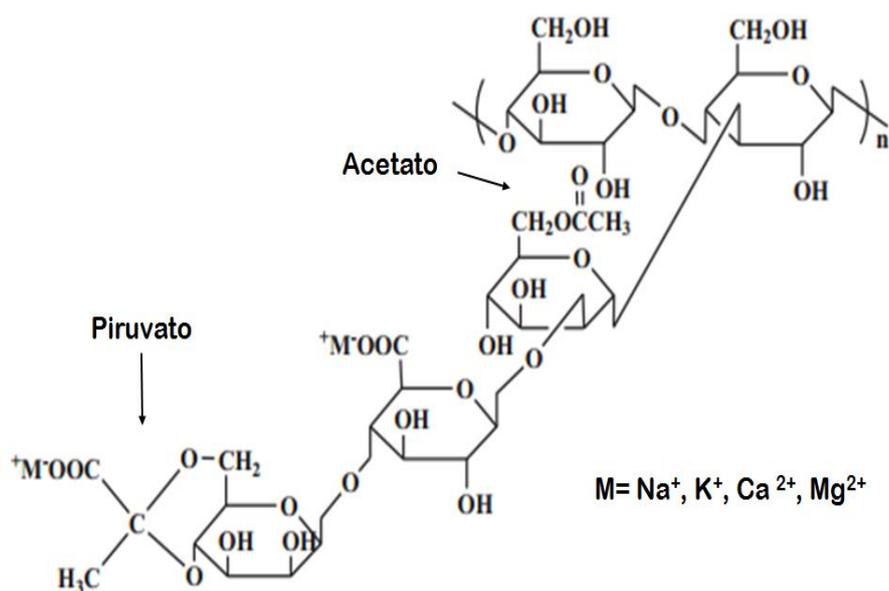


Figura 1. Estrutura química da xantana. Fonte: Adaptado de Xu et al., (2015).

A goma xantana tem sido largamente aplicada industrialmente, principalmente nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de petróleo. A goma possui propriedades físico-químicas de grande interesse, capacidade de promover alta viscosidade em baixa concentração de polímero em um ambiente aquoso (KOOL et al., 2013; VIEBKE, 2004; GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Apresenta comportamento pseudoplástico que auxilia industrialmente na mistura, bombeamento, enchimento e vazão; possui alta estabilidade em uma ampla faixa de pH, temperatura e força iônica; é estável sob cisalhamento durante o processamento e embalagem, tornando a xantana muito adequada como espessante e estabilizante para a indústria alimentícia, (KOOL et al., 2014; MORRIS et al., 2006; PETRI, 2015).

2.2 Meio de Produção da goma xantana

Diversos estudos são encontrados na literatura com uma variedade de espécies de *Xanthomonas* produtoras da goma xantana. A escolha da cepa de

Xanthomonas, a composição do meio e as condições operacionais de produção diferenciam a massa molar, a estrutura, a quantidade de acetil e piruvato, a viscosidade e a solubilidade da goma xantana produzida (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

Papagianni et al., (2001), estudaram os efeitos dos níveis de agitação na cinética da fermentação em culturas descontínuas e também na composição química em termos de conteúdo de piruvato e massa molar do produto formado. Utilizaram a *Xanthomonas campestris* ATCC 1395 e o meio de cultura foi composto por triptona, extrato de levedura, cloreto de sódio e glicose. A fermentação foi conduzida em um biorreator LSL Biolite de 2 L por 72 h em pH livre. Os autores ressaltaram, que o aumento da agitação resultou em níveis de produção mais altos, a glicose do substrato foi totalmente consumida pelo microrganismo e o pH aumentou com o tempo de produção de 7 para em torno de 9. A massa molar da xantana produzida em 100 e 600 rpm, avaliada através da HPLC, foi cerca de 5×10^5 Da em ambas agitações, o que levou a conclusão de que a massa molar não foi influenciada pelo aumento da agitação (PAPAGIANNI et al., 2001).

Faria et al., (2011), caracterizaram a goma xantana produzida a partir de caldo de cana-de-açúcar. Os autores utilizaram *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459, o meio de cultura e o meio de produção eram compostos por sacarose, extrato de levedura, NH_4NO_3 , Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 . As fermentações foram realizadas em um fermentador Biostat B de 6 L por 24 h, a temperatura de 28 °C, com agitação de 750 rpm, aeração de 0,35 vvm e pH controlado em 7,5. Os autores determinaram a massa molar das xantanas produzidas através da cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) com detectores de índice de refração (IR) e espalhamento de luz (MALLS). Encontraram goma xantana com massa molar de $4,2 \times 10^6$ Da altamente viscosas com caráter pseudoplástico (FARIA et al., 2011)

Suh et al., (1990), analisaram a massa molar do polissacarídeo xantana produzido sob limitação de oxigênio. A bactéria *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 S4L-II, foi cultivada em um fermentador de coluna de bolha de 50 L com um diâmetro de 0,15 m, taxa de aeração variando de 1,3 vvm a 9,6 vvm. Utilizaram um meio sintético composto por glicose e cloreto de amônio, como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente. A temperatura do processo foi de 28 °C e o pH foi controlado em 7. Os autores afirmaram que a produtividade específica da xantana diminui sob limitação de oxigênio e a massa molar inicial não foi uniforme, a qual

aumentou de $8,8 \times 10^6$ para $9,4 \times 10^6$ Da no final da fase de crescimento (30h), com uma concentração de xantana de $6,7 \text{ g L}^{-1}$. Após essa fase, a massa molar média diminuiu a uma taxa estritamente dependente da velocidade do gás. Encontraram a maior produção de xantana nesta fase e o grau de limitação de oxigênio determinou a qualidade do produto final (SUH et al., 1990).

Brandão et al., (2008), estudaram a produção de goma xantana obtida a partir do caldo de cana. Utilizaram cepas nativas *Xanthomonas campestris* pv manihotis 1182, *Xanthomonas campestris* pv campestris 1866 e *Xanthomonas campestris* pv campestris 2149. O inóculo foi preparado utilizando o meio YM padrão (*Yeast-Malt*) líquido, contendo glicose, peptona bacteriológica, extrato de levedura e extrato de malte. A produção de goma xantana foi realizada utilizando um meio fermentativo convencional contendo sacarose acrescido de uréia e K_2HPO_4 e um meio fermentativo alternativo contendo caldo de cana integral acrescido de uréia e K_2HPO_4 . O pH dos meios foram ajustados para 7. O cultivo em batelada foi realizado em incubadora rotatória Tecnal com agitação de 250 rpm a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ por 120 h. A goma xantana foi recuperada utilizando álcool etílico numa proporção de 3 partes de álcool para 1 parte do meio fermentado, após foram secas em estufa por 72 h. Os autores encontraram o melhor resultado de produção com o microrganismo *Xanthomonas campestris* pv manihotis 1182, usando o meio de cultivo alternativo, com uma produção de $33,54 \text{ g L}^{-1}$ e produtividade média de $0,28 \text{ g/L h}$. A viscosidade da goma xantana obtida com o caldo de cana apresentou valores inferiores à obtida com a sacarose. Os autores sugerem que a goma produzida com sacarose apresenta melhor propriedade reológica (BRANDÃO et al., 2008).

Moreira et al., (2001), caracterizaram 18 cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni quanto à produção, viscosidade e composição química. O inóculo foi preparado utilizando YM e o meio de produção foi o MP II composto por sacarose, MgSO_4 , K_2HPO_4 e NH_4HPO_4 . A fermentação ocorreu em um agitador orbital por 72 h, temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e agitação de 200 rpm. Os autores encontraram valores de produção de xantana entre $2,3$ a $8,3 \text{ g L}^{-1}$.

2.3 Caracterização hidrodinâmica

2.3.1 Massa molar de xantana

Estudos são encontrados na literatura sobre caracterização hidrodinâmica de biopolímeros. Diferentes métodos são utilizados para determinação da massa molar de polímeros, métodos relativos como a cromatografia de exclusão por tamanho e viscosidade, e métodos absolutos como espalhamento de luz, ultracentrifugação e pressão osmótica (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001; CANEVAROLO, 2004). A seguir são apresentados alguns trabalhos com diferentes técnicas de caracterização da massa molar de xantana (Tabela 1).

Viebke e Williams, (2000), determinaram a distribuição de massa molar de k-carragenina e xantana usando fracionamento de campo-fluxo assimétrico. A amostra de xantana (comercial Jungbunzlauer) foi preparada dissolvendo aproximadamente $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ em água por agitação seguida de diluição até a concentração desejada, a solução de xantana foi aquecida a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Os autores afirmaram que as soluções de xantana possuem alta viscosidade mesmo em concentrações muito baixas do polímero.

Estes autores analisaram duas concentrações de xantana no fracionamento de campo-fluxo assimétrico, e concluíram que o cromatograma na concentração de 1 mg mL^{-1} apresentou vários picos e tempo de eluição muito longo. Já na concentração de xantana de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ o cromatograma apresentou um pico. Encontraram massa molar média de $3,16 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ (VIEBKE e WILLIAMS, 2000).

Tabela 1. Caracterização hidrodinâmica, microrganismo e condições operacionais encontrado na literatura

Microorganismo	Massa Molar Mw (Da)	Meio de cultivo utilizado inóculo/produção	Condições operacionais	Método de determinação da massa molar	Referências
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459	4,2x10 ⁶	caldo de cana, sacarose, extrato de levedura, Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , NH ₄ NO ₃	Fermentador Biostat B de 6,0 L, 24h, 28 °C, 750 rpm, 0,35 vvm e pH 7,5	HPSEC-MALLS/RI	Farias et al.,2011
<i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 1395	5x10 ⁵	caldo Luria-Bertani com glicose adicional de 0,2% (meio LGB)	Biorreator LSL Biolite de 2 L 100, 200, 300, 400, 600 rpm. 72h, pH livre.	HPLC	Papagianni et al., 2001
<i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 1395	0,8 a 1,4 x10 ⁶	extrato de levedura, triptona, NaCl, sacarose	Erlenmeyer de 500 ml, 72h, 28 °C, 200 rpm	HPLC	Kalogiannis et al., 2003
<i>Xanthomonas campestris</i> NRRL B-1459 S4L-II	8,8x10 ⁶ a 9,4x10 ⁶	glicose e cloreto de amônio	Fermentador de coluna de bolha de 50 L, 28 °C, pH 7 1,3 vvm a 9,6 vvm, 30h	HPLC	Suh et al., 1990
<i>Xanthomonas campestris</i>	3,16x10 ⁶	-	-	fracionamento de campo-fluxo assimétrico	Viebke e Williams, 2000

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência; HPSECMALLS-RI - cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho acoplada com espalhamento de luz a laser multi-ângulo e detecção de índice de refração.

Eren et al., (2015), estudaram o comportamento reológico e a polidispersividade da goma xantana modificada mecanicamente. A goma xantana estudada foi a de qualidade alimentar (Keltrol, CP Kelco, Atlanta GA, USA). Foi preparado uma solução de xantana com concentração de 1 % (p p⁻¹) com água deionizada sob agitação, e seguida adição de 0,02 % (p p⁻¹) de azida sódica (NaN₃) para evitar deterioração microbiana. Foi utilizada uma centrífuga para remover as bolhas de ar formadas na solução durante a mistura. As soluções permaneceram por 24 h a 4 °C para completa hidratação, logo após, as soluções foram tratadas em um homogeneizador de alto cisalhamento equipado com um bico de 130µm, sob duas pressões diferentes 69 e 276 Mpa. As amostras tratadas com baixa e alta pressão e a amostra de goma xantana não tratada (controle) foram armazenadas em duas temperaturas (4 e 25 °C) por 11 semanas.

Esses autores utilizaram cromatografia de exclusão por tamanho acoplada à detecção de dispersão de luz em múltiplos ângulos (14,4 – 163,3°) para determinar as propriedades moleculares do polímero. A massa molar (M_w) foi determinada através do método de *Debye*. A massa molar para a xantana sem tratamento (controle), xantana tratada com baixa e alta pressão foi de 17x10⁶, 13x10⁶ e 12,6x10⁶ Da, respectivamente. Concluíram, que a redução da massa molar foi de 23 % para amostras tratadas sob pressão de 69 MPa e 30 % para amostras tratadas sob pressão de 276 MPa. O índice de polidispersividade (M_w/M_n) do controle, amostra tratada com baixa e alta pressão foi de 1,10, 1,55 e 2,54, respectivamente (EREN et al., 2015).

Faria et al., (2011), caracterizaram a goma xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 a partir de caldo de cana-de-açúcar. A determinação da massa molar foi realizada através da cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC). A amostra de xantana foi solubilizada em uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂) 0,1 M contendo azida sódica (NaN₃) na concentração de 1 - 3 mg mL⁻¹, essa solução foi filtrada em uma membrana de acetato celulose (Millipore) com porosidade 0,2 µm. O perfil de eluição da amostra de xantana por HPSEC-MALLS/RI mostrou uma distribuição de massa unimodal, uma massa molar média de 4,2x10⁶ Da e polidispersão (M_w/M_n) de 1,014, apresentando uma homogeneidade no material analisado (FARIA et al., 2011).

Papagianni et al., (2001), determinaram a massa molar da xantana usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em uma coluna de exclusão de

tamanho ZORBAX BIO SERIES GF-450. Encontraram a massa molar cerca de 5×10^5 Da, e afirmaram que a velocidade de agitação, em torno de 100-600 rpm, durante a fermentação não influencia a massa molar.

Oliveira et al., (2013), estudaram os regimes dinâmicos de concentração de biopolímeros xantana, tara e clairana por espalhamento de luz dinâmico. Utilizaram a *Xanthomonas arboricola* pv pruni cepa 06 para produzir a goma xantana. A goma xantana foi solubilizada em água destilada e deionizada em concentração 5 g L^{-1} com adição de $1 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ de azida sódica, em agitador magnético por 16 h a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Foram realizadas filtrações das amostras, para remover partículas de poeira e agregados, através de membranas com tamanho de poros variando de 3,0 a $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore, Merck Millipore). A partir da solução estoque, foram realizadas as diluições usando o mesmo solvente, com agitação. A concentração final das soluções foi verificada por gravimetria.

Estes autores utilizaram um analisador de tamanho de partículas Malvern Nanosizer ZS (Malvern Instruments Ltd., UK) para medidas de espalhamento de luz. As amostras foram analisadas em uma cubeta de vidro, a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, com um ângulo de detecção da luz dispersa de 173° . O Nanosizer ZS utiliza um laser He-Ne de 4Mw, com comprimento de onda (λ) de 633nm. Consideraram a viscosidade do solvente e da amostra de $0,8872 \text{ mPa.s}$ e o índice de refração e absorção foram de 1,330 e 0,001, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2013),.

Ainda neste mesmo trabalho, os autores determinaram a concentração crítica através de uma metodologia observacional. A mesma foi determinada nos pontos em que ocorreram alterações na inclinação do coeficiente de difusão versus a curva de concentração do biopolímero. Para a goma xantana, a concentração crítica de sobreposição (c^*) foi de $1,3 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ e a concentração de agregação (c^{**}) foi de $1,1 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$. Assim, consideram 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 regime concentrado $c > 1,1 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$, conforme a Figura 2.

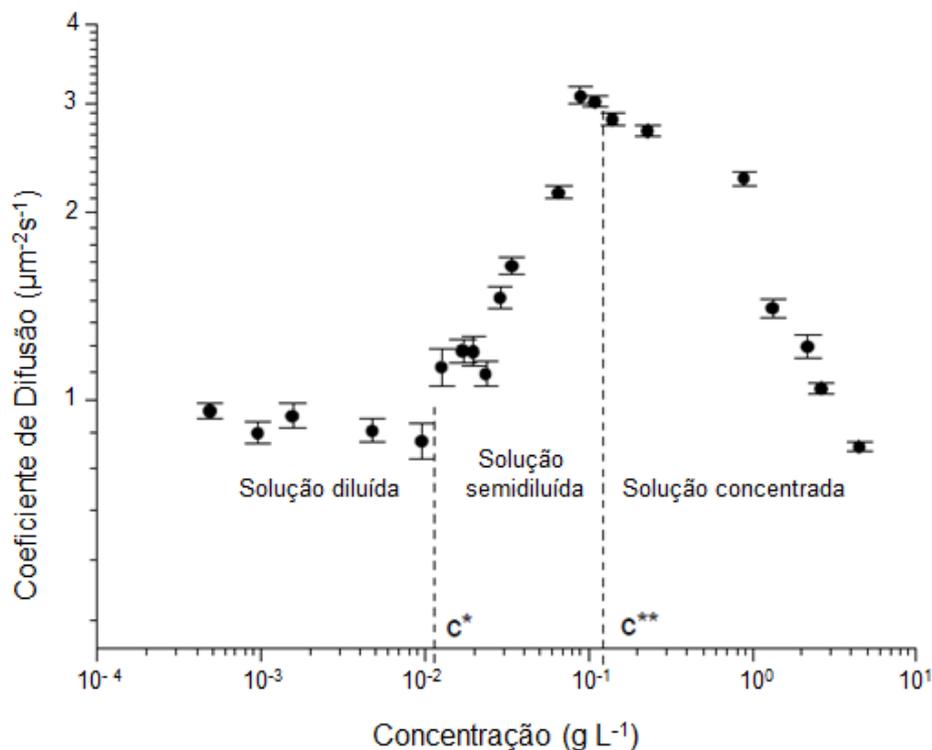


Figura 2. Determinação de c^* e c^{**} por medidas do coeficiente de difusão em função da concentração para a xantana (Diaz, 2009)

2.3.2 Teoria sobre espalhamento estático de luz (SLS)

O espalhamento de luz, método muito utilizado na caracterização de polímeros, cuja aplicação implica em uma interação da radiação com partículas suspensas em um meio através do qual a radiação é transmitida. Ao incidir na partícula, parte da radiação é espalhada e a intensidade do espalhamento depende basicamente do tamanho da partícula. Essa técnica fornece informações sobre a massa molar ponderal média, a relação entre a interação polímero-solvente e o tamanho médio das cadeias (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001; CANEVAROLO, 2004).

Um meio perfeitamente homogêneo não é capaz de espalhar a luz, num meio não-homogêneo, a luz é espalhada em todas as direções. Soluções de macromoléculas são consideradas como não-homogêneo. A mobilidade aleatória e difusa das macromoléculas provoca a formação de áreas de diferentes concentrações. Essas áreas possuem diferentes constantes dielétricas e agem como centros de espalhamento de luz (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

Em 1871, foi proposta a teoria do espalhamento de luz por Lord Rayleigh. A qual demonstra que quando uma onda eletromagnética incide sobre uma partícula,

esta atua como fonte de luz, ou seja, como fonte secundária para a emissão de radiação no mesmo comprimento de onda que a luz incidente (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001; CANEVAROLO, 2004).

O processo consiste na medida da intensidade da luz espalhada (I_θ) ao passar por uma solução diluída de polímero. A razão de Rayleigh, expressa a razão entre a luz incidente e a luz espalhada, conforme a Equação 1.

$$R_\theta = \frac{I_\theta}{I_0} \cdot r^2 \quad (1)$$

onde R_θ é razão de Rayleigh, I_θ é a luz espalhada, I_0 é a luz incidente, r é a distância entre a amostra e o observador e θ é o ângulo entre a direção da luz incidente e da luz espalhada.

A equação que relaciona a razão de Rayleigh com a massa molar da molécula em solução, é demonstrada pela Equação 2.

$$\frac{Kc}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M} \quad (2)$$

onde ΔR_θ é a diferença entre as razões de Rayleigh da solução e do solvente puro, M é a massa molar da partícula, c é a concentração da partícula (g L^{-1}).

Essa equação só é válida quando não existirem interações intermoleculares, ou seja, ela só é válida para concentrações infinitamente diluídas. Em concentrações finitas, existem interações intermoleculares, ocorrendo flutuações na polarizabilidade das moléculas, as quais dependem do potencial químico (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

Logo, a variação da razão de Rayleigh da solução com relação ao solvente puro pode ser apresentada pela expansão virial, pela Equação 3,

$$\frac{Kc}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M} + 2A_2c \quad (3)$$

onde A_2 é o segundo coeficiente virial, e descreve as mudanças na propriedade de espalhamento causadas pelas interações intermoleculares e concentrações finitas.

O sinal positivo de A_2 indica boa interação polímero-solvente, ou seja as interações polímero-solvente são mais fortes que as interações polímero-polímero, mostrando uma solução estável. Enquanto que, A_2 negativo indica que as interações polímero-polímero são maiores do que as interações polímero-solvente, de modo que

as partículas tenderão a se agregar, ou seja, o solvente utilizado não é um bom solvente para a macromolécula (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001; ANTON PAAR, 2016).

Na análise de diversas concentrações de soluto, os valores obtidos podem ser tratados conforme o proposto por Debye, através do gráfico de Kc/R_θ . A partir do coeficiente linear da reta, obtém-se o inverso da massa molar e a partir do coeficiente angular obtém-se o segundo coeficiente virial (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001; CANEVAROLO, 2004).

2.3.3 Raio Hidrodinâmico e Polidispersão de Xantana

Na caracterização de soluções de goma xantana utilizando espalhamento dinâmico de luz e reologia, Rodd et al., (2000), utilizaram a cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) para medir a massa molar e a polidispersividade, $3,4 \times 10^6$ Da e 1,12, respectivamente. Em diluições infinitas, o raio hidrodinâmico para soluções de xantanas, foi calculado usando a equação de Stokes-Einstein, o qual resultou em uma superestimação do tamanho de uma molécula semi-flexível, como a goma xantana girando em movimento Browniano.

Southwick et al, (1980), utilizaram a equação de Stokes-Einstein para determinar o raio hidrodinâmico (R_h) de xantanas em solução aquosas e de ureia. A massa molar da xantana dissolvida em água deionizada foi estimado em $2,16 \times 10^6$ Da. Afirmam que a desnaturação térmica de xantana envolve tanto a ruptura de agregados quanto uma mudança conformacional. Os autores detectaram três formas estruturais diferentes de xantana, uma estrutura desordenada, uma estrutura não agregada e nativa, e uma estrutura agregada, com respectivos raios hidrodinâmicos 80, 100 e 222 nm, respectivamente.

Diaz, (2009), determinou a medida de raio hidrodinâmico, polidispersão e distribuição de tamanho de biopolímeros, como a xantana, clairana e tara por espalhamento de luz. O estudo utilizou um analisador de tamanho de partículas Malvern Nanosizer ZS. O raio hidrodinâmico foi calculado a partir do coeficiente de difusão, segundo a equação de Stokes-Einstein, indicando o tamanho aparente da partícula analisada. Para a goma xantana em concentrações no regime diluído, 0,004, 0,002 e 0,0005 (g L^{-1}), obteve-se raio hidrodinâmico de 153,3, 96,03 e 171,4 nm e índice de polidispersão de 0,478, 0,426 e 0,452 respectivamente.

A dispersão da luz de soluções de xantana é um pouco complexa devido à natureza semi-flexível das moléculas de xantana e a presença de microagregados em baixas concentrações causada pela auto-associação da goma xantana (MEYER et al., 1993; RODD et al., 2000).

Peters et al., (1989), estudaram a influência da taxa de agitação na produção de xantana por *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 S4-LII. Determinaram a massa molar e o índice de polidispersividade nas diferentes velocidades de agitação, por cromatografia de exclusão por tamanho. Os autores afirmam que, com o aumento da velocidade de agitação (200 a 800 rpm) foi observado um aumento no massa molar média ponderada (6,9 a $8,6 \times 10^6$ Da) e no índice de polidispersividade (2,0 a 2,4).

Em seu trabalho de revisão, Danaei et al. (2018), informam que o termo polidispersão (ou dispersão) é usado para descrever o grau de não uniformidade de uma distribuição de tamanho de partículas. Na área da ciência dos polímeros, o índice de polidispersão (PDI) é empregado para medir a amplitude da distribuição de massa molar do polímero.

O PDI utilizado para polímeros é a razão entre massa molar ponderal média e a massa molar numérica média (M_w/M_n) (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001; DANAIE et al., 2018). O índice de polidispersão é uma representação da distribuição das populações de tamanho dentro de uma determinada amostra, o valor numérico do PDI varia de 0 a 1 (uma amostra perfeitamente uniforme a uma amostra altamente polidispersa com várias populações de tamanho de partícula) (DANAIE et al., 2018).

2.3.4 Teoria sobre espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Na técnica de espalhamento de luz dinâmico medem-se flutuações no tempo da intensidade da luz espalhada a um determinado ângulo, causadas pelos movimentos das partículas em solução (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001; CANEVAROLO, 2004). A técnica é aplicada na caracterização de partículas, emulsões e moléculas que foram dispersas ou dissolvidas em um líquido.

O espalhamento dinâmico da luz permite a rápida obtenção do coeficiente de difusão de macromoléculas em solução, a partir da análise da distribuição de frequência das flutuações na intensidade de luz espalhada em uma dada direção. Essas flutuações têm origem na variação no índice de refração dentro do volume de espalhamento, devido ao movimento browniano das partículas (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001; CANEVAROLO, 2004).

O experimento de DLS consiste em obter a flutuação do sinal de intensidade de luz espalhada com o tempo, realizar o cálculo da correlação desses valores e obter, por transformada de Fourier, o espectro de frequência de flutuação. Esse espectro é ajustado por uma curva lorentziana, na qual é obtida o valor da constante de correlação $G(\tau)$ (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001; CANEVAROLO, 2004), de acordo com a Equação 4.

$$G(\tau) = A + B^{-2Dq^2\tau} \quad (4)$$

onde A é o valor da linha base e B é o fator pré-exponencial contendo constantes ópticas do equipamento e da amostra. O vetor de onda de espalhamento de luz (q) é definido pela Equação 5, onde n é o índice de refração da solução e θ é o ângulo de observação do espalhamento.

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \text{sen} \frac{\theta}{2} \quad (5)$$

O raio hidrodinâmico das partículas em solução, R_H , pode ser calculado utilizando o valor de D_0 , utilizando a Equação 6, de Stokes-Einstein.

$$R_H = \frac{KT}{6\pi\eta D_0} \quad (6)$$

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

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A produção de xantanas em meios de cultivo diferentes afetam as propriedades hidrodinâmicas das xantanas sintetizadas.

3.2 Objetivo Geral

Caracterizar as propriedades hidrodinâmicas de xantanas sintetizadas por diferentes cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* produzidas nos meios de produção MPI+II e MPII.

3.3 Objetivos Específicos

- ✓ Sintetizar dez amostras de xantana utilizando diferentes cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni, em dois meios de produção diferentes (MPI+II e MPII).
- ✓ Caracterizar o raio hidrodinâmico das xantanas sintetizadas
- ✓ Caracterizar a massa molar das xantanas sintetizadas
- ✓ Determinar o índice de polidispersão e o tamanho de partícula das xantanas sintetizadas

4 CAPÍTULO 1

Caracterização hidrodinâmica de xantanas sintetizadas por diferentes cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni e meios de produção

Bianca de Oliveira Molon^a, Bruna de Oliveira Molon^b, Adriel Penha Munhoz^a, Bruna Silva de Farias^c, Gabriela de Quadros da Luz^a, Patrícia Silva Diaz^{ab}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos; Universidade Federal de Pelotas; Pelotas; Rio Grande do Sul; Brasil;

^bPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia; Universidade Federal de Pelotas; Pelotas; Rio Grande do Sul; Brasil;

^cPrograma de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos; Universidade Federal do Rio Grande

* Autor correspondente: Patrícia Diaz de Oliveira - Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil, Cep: 96010-900. RS, Brazil; Phone number: +555332757350; E-mail: bilicadiaz@yahoo.com.br

RESUMO

A caracterização hidrodinâmica das xantanas produzidas pela *Xanthomonas arboricola* pv pruni e *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 foi realizada por espalhamento de luz, através de um caracterizador de partículas em dispersões líquidas, Litesizer™ 500. Foram estudadas dez cepas de xantana pruni e uma cepa xantana comercial para comparação, em dois meios de produção diferentes (meio A e o meio B). O raio hidrodinâmico, o índice de polidispersão e a distribuição de tamanho de partícula por intensidade das xantanas foram analisados por espalhamento de luz dinâmico (DLS). A massa molar das xantanas foi verificada por espalhamento de luz estático (SLS). Todas as xantanas produzidas apresentaram raio hidrodinâmico diferentes e o meio de produção influenciou esta característica para as xantanas produzidas pelas cepas 24, 31, 66 e 73. O índice de polidispersão das amostras de xantanas apresentaram valores considerados aceitáveis e indicaram uma população homogênea. Através da distribuição de tamanho por intensidade das xantanas foi possível afirmar que as soluções de xantanas em estudo estão dentro do regime diluído de concentração. O meio de produção também influenciou na massa molar das xantanas analisadas, as xantanas pruni variaram de 0,4 a 361 10⁶ Da e a massa molar da xantana comercial NRRLB-1459 foi de 3,85x10⁷ Da para o meio A e 8,07x10⁷ Da para o meio B.

Palavras-chave: espalhamento de luz; xantana; massa molar; raio hidrodinâmico

1 Introdução

A aplicabilidade dos biopolímeros naturais em diferentes produtos requer a caracterização de algumas propriedades, como a massa molar, tamanho e sua forma. A funcionalidade dos polissacarídeos pode depender da temperatura e composição do solvente, uma vez que muitos dos biopolímeros se auto-associam e agregam em solução. A caracterização desses parâmetros para um polímero em solução é importante para entender as propriedades de um produto (VIEBKE e WILLIAMS, 2000).

No mercado de gomas microbianas, a goma xantana ocupa um lugar de destaque por ter diferentes e incomuns propriedades reológicas, como alta viscosidade mesmo em baixas concentrações, solubilidade e estabilidade em uma ampla faixa de pH, temperatura e força iônica (FARIAS et al., 2011; PETRI, 2015). Essas propriedades são determinadas por sua composição química, arranjo e ligação molecular, massa molar média e distribuição (PAPAGIANNI et al., 2001).

A goma xantana é um importante polissacarídeo extracelular produzido pela fermentação de bactérias gram-negativas pertencentes ao gênero *Xanthomonas*. Polímero composto por uma estrutura química primária formada por unidades pentassacarídicas repetidas com duas unidades de glicose, duas unidades de manose e uma unidade de ácido glicurônico (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; SANDFORD et al., 1977, ROCHEFORT e MIDDLEMAN, 1987).

Soluções de xantana são muito estudadas, tanto em termos de propriedades reológicas quanto físico-química (RODD et al., 2000). Algumas técnicas, como espalhamento de luz e reologia, são empregadas para caracterizar o comportamento hidrodinâmico e determinar o regime de concentração do polímero em solução (RODD et al., 2000, OLIVEIRA et al., 2013).

Segundo Doi e Edwards (1986), existem três regimes dinâmicos de concentração para uma solução de polímero em um bom solvente, o regime diluído, o regime semidiluído e o regime concentrado. A interação entre as macromoléculas em solução é o que diferencia os regimes (DOI e EDWARDS, 1986)

Alguns polissacarídeos, quando em solução, adotam uma conformação de novo aleatório que flutua devido ao movimento browniano. Identificar a fração de espaço ocupado pelo polímero, é essencial para entender as propriedades das soluções. Em baixas concentrações, as cadeias individuais de um biopolímero adotam

uma conformação de novelo aleatório afastadas uma das outras e livres para se movimentarem de forma independente. Ao passo que a concentração da solução aumenta, as moléculas começam a interagir umas com as outras e acomodam-se através da sobreposição e interpenetração de ambas. Desse modo, as cadeias individuais movem-se com maior dificuldade devido às interações com as cadeias vizinhas (OLIVEIRA et al., 2013).

A concentração na qual as moléculas dos polímeros individuais começam a interagir fisicamente é definida como concentração crítica de sobreposição (c^*) (DOI e EDWARDS, 1986; RODD et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2013). O conceito c^* baseia-se na teoria de que os novelos poliméricos em solução, em seu estado estacionário, ocupam um volume hidrodinâmico onde acima de uma concentração crítica, ocorre o empacotamento entre as moléculas (RODD et al., 2000). A mudança de um regime semidiluído para concentrado é chamada de concentração crítica de agregação (c^{**}), ocorrendo o aumento da concentração e formação de agregados moleculares (OLIVEIRA et al., 2013; NASH et al., 2002).

As condições de produção de *Xanthomonas campestris* como o meio de cultura, velocidade de agitação e limitação de oxigênio, podem variar o nível de produtividade e a quantidade de substrato consumido, e produzir xantana com diferentes teores de piruvato (SUH et al., 1990; PAPAGIANNI et al., 2001). Modificações físicas como, degradação mecânica e alta taxas de cisalhamento aplicadas na goma xantana causam alterações na estrutura molecular e nas propriedades reológicas do biopolímero. Polímeros com distribuições mais amplas de massa molar formam soluções que inibem viscosidades mais baixas (EREN et al., 2015).

Dentre as mudanças encontradas no processo fermentativo de *Xanthomonas* utilizando diferentes meios de culturas, agitação cinética e quantidade de oxigênio e nitrogênio, é necessário um estudo detalhado nas propriedades molecular e hidrodinâmicas desse biopolímero. Portanto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar as propriedades hidrodinâmicas de diferentes xantanas sintetizadas por diferentes cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* produzidas em dois meios de produção.

2 Material e Métodos

2.1 Microrganismo

Neste trabalho 10 cepas da bactérias *Xanthomonas arboricola* pv pruni, identificadas como 03, 15, 24, 31, 33, 46, 49, 66, 73 e 76 foram estudadas, e uma cepa padrão comercial *Xanthomonas campestris* NRRLB-1459 foi utilizada para comparação. As bactérias foram fornecidas pelo Centro de Pesquisa Agropecuária Clima Temperado (CPACT-EMBRAPA), localizado na cidade de Pelotas (Rio Grande do Sul, Brasil).

2.2 Meio de cultura

O preparo do inóculo foi realizado em meio *YM (Yeast Malt)* (g L^{-1}) contendo: 3,0 extrato de levedura; 3,0 extrato de malte; 5,0 peptona; 10,0 glicose (HAYNES et al., 1955). As xantanas foram produzidas em dois meios de produção diferentes. O meio de produção MPI+II (meio A) composto por (g L^{-1}): 50,0 sacarose; 1,5 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 2,5 K_2HPO_4 ; 5,0 KH_2PO_4 ; 2,0 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,3 MgSO_4 ; 2,0 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$; 0,006 H_3BO_3 ; 0,0024 FeCl_3 ; 0,002 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,012 ZnSO_4 , e o meio de produção MPIO (meio B) composto por (g L^{-1}): 50,0 sacarose; 1,5 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 2,5 K_2HPO_4 ; 5,0 KH_2PO_4 ; 2,0 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,3 MgSO_4 (SOUW e DEMAIN, 1979; CADMUS et al., 1978 modificado por VENDRUSCOLO et al., 2000). Para ambos os meios o pH inicial foi ajustado para 7.

2.3 Produção de xantana

A xantana foi produzida em frascos Erlenmeyers de 1 L, com 400 mL de meio de produção (MPI+II e MPIO) e 100 mL de inóculo. Os frascos foram mantidos em incubadora agitadora orbital (New Brunswick, Scientific, modelo Innova 4230) na temperatura de 28°C e 200 rpm de agitação durante 72 h (SOUZA e VENDRUSCOLO, 1999).

2.4 Recuperação de xantana

A recuperação da xantana foi realizada através da centrifugação (Sorvall Instruments RC-5C) do caldo fermentativo para remoção das células (VENDRUSCOLO et al., 2000). Em seguida, foi adicionado etanol 96% (razão etanol:caldo de 4:1 (v v^{-1})) para precipitação do biopolímero (GARCÍA-OCHOA et al.

2000). A xantana obtida foi seca em estufa (FANEM LTDA) a 56 °C até peso constante, triturada e peneirada a granulometria de 150 mesh.

2.5 Preparação das soluções

O preparo das soluções para análise de espalhamento de luz foram preparadas de acordo com Oliveira et al., (2013) com algumas adaptações. As amostras de xantana foram solubilizadas em água destilada e deionizada em concentração de 1 g L⁻¹ seguida de adição de 1x10⁻³ g L⁻¹ de azida sódica, para evitar a contaminação microbiana das soluções, em agitador magnético por 16h em uma temperatura de 50 °C. Para remover partículas de poeira e agregados, as soluções foram filtradas através de membranas estéreis de Nitrato de Celulose com porosidade variando de 0,45 µm e 0,22 µm (UNIFIL), sob pressão controlada. A concentração final das soluções foi verificada por gravimetria. A partir da solução estoque, foram preparadas diluições, utilizando o mesmo solvente com agitação. As diluições passaram por um processo de banho ultrassônico por 10 min, para remoção de bolhas de ar. As concentrações das soluções variaram dentro de uma faixa do regime diluído, $c < 1,3 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$.

2.6 Determinação do tamanho das partículas

O tamanho das partículas foi medido por espalhamento de luz dinâmico (DLS), através de um caracterizador de partículas em dispersões líquidas, Litesizer™ 500 (Anton Paar, Áustria). As amostras foram analisadas em uma cubeta descartável de poliestireno com no mínimo 3 repetições. Todas as análises foram realizadas a 25 °C. O ângulo de medição foi selecionado no modo automático, neste modo o ângulo ideal é encontrado automaticamente para a amostra, com base na transmitância, que é medida continuamente. O Litesizer™ 500 utiliza um laser de comprimento de onda 658 nm a partir de um diodo laser de frequência única, fornecendo 40 mW. O índice de refração e a viscosidade do solvente (água destilada e deionizada) não foram avaliados, e foram considerados 1,3302 e 0,0008903 Pa.s, respectivamente, segundo o banco de dados do software. Os resultados das análises foram obtidos através do software Kalliope™ do Litesizer™.

2.7 Determinação da massa molar

A massa molar foi medida por espalhamento de luz estático (SLS), através de um caracterizador de partículas em dispersões líquidas, Litesizer™ 500 (Anton Paar, Áustria).

As amostras foram analisadas em uma cubeta de quartzo a 25 °C. Para cada xantana analisada foram necessárias três concentrações diferentes de amostra para gerar o gráfico de Debye, uma amostra de solvente (água destilada e deionizada) e uma amostra de referência (tolueno). Foi adotada uma correção de forma (*Shape correction*), caso as partículas não se espalhassem isotropicamente, espiral (*coil*). O raio hidrodinâmico foi medido anteriormente para cada amostra. O incremento do índice de refração (dn/dc) foi considerado $0,105 \text{ mL g}^{-1}$, segundo Diaz, (2009). Os resultados das análises foram obtidos através do software Kalliope™ do Litesizer™.

2.8 Processamento de dados

Os resultados obtidos do software *Kalliope*™ do *Litesizer*™, foram plotados gráficos através do OriginPro 8 SR0 (OriginLab) para o tamanho da partícula e os dados da massa molar foram plotados no programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc. (2004)).

3 Resultados e discussão

3.1 Raio hidrodinâmico e polidispersão

A partir da análise de tamanho de partículas foram determinados o índice de polidispersão (PDI) e os raios hidrodinâmicos (R_H) das amostras de xantana com concentração de aproximadamente $0,001 \text{ g L}^{-1}$, conforme é apresentado na Tabela 1.

As amostras de xantanas apresentaram raio hidrodinâmico diferentes entre eles. O meio de produção utilizado causou diferenças no raio hidrodinâmico das xantanas produzidas pelas cepas 24, 31, 66 e 73. Os outros isolados não apresentaram diferença estatísticas entre os meios estudados.

Os resultados do raio hidrodinâmico para o meio B apresentaram valores superiores ao encontrados por Diaz, (2009), que utilizou o meio B na produção de *Xanthomonas arboricola* pv pruni cepa 06, encontraram um R_H de $0,171 \mu\text{m}$.

Tabela 1. Raio hidrodinâmico (R_H) e índice de polidispersão (PDI) obtidos para soluções aquosas de xantana na concentração $0,001 \text{ g L}^{-1}$, produzidas em meios de produção diferentes.

Xantana	Meio A (MPI+II)		Meio B (MPII)	
	R_H (μm)	PDI	R_H (μm)	PDI
03	0,4070 \pm 0,14 ^{A,B,C,a}	0,2981	0,4499 \pm 0,02 ^{A,a}	0,2676
15	0,4148 \pm 0,01 ^{A,B,C,a}	0,4476	0,3697 \pm 0,07 ^{A,B,a}	0,2559
24	0,2771 \pm 0,05 ^{B,C,b}	0,6689	0,3943 \pm 0,01 ^{A,B,a}	0,3035
31	0,6966 \pm 0,08 ^{A,a}	0,4108	0,3050 \pm 0,03 ^{A,B,b}	0,2033
33	0,3544 \pm 0,17 ^{B,C,a}	0,3665	0,2024 \pm 0,05 ^{B,a}	0,2921
46	0,2425 \pm 0,18 ^{B,C,a}	0,4301	0,2504 \pm 0,03 ^{A,B,a}	0,6405
49	0,2297 \pm 0,09 ^{B,C,a}	0,2648	0,2891 \pm 0,04 ^{A,B,a}	0,2675
66	0,1381 \pm 0,03 ^{B,C,b}	0,3351	0,3752 \pm 0,02 ^{A,B,a}	0,4507
73	0,1060 \pm 0,03 ^{C,b}	0,3253	0,3731 \pm 0,06 ^{A,B,a}	0,3368
76	0,2740 \pm 0,14 ^{B,C,a}	0,4067	0,3036 \pm 0,04 ^{A,B,a}	0,3325
NRRLB-1459	0,4521 \pm 0,17 ^{A,B,a}	0,2349	0,4359 \pm 0,22 ^{A,a}	0,2924

Valores = médias \pm SD; n = 3. Coluna com letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa a partir do teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Linha com letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa a partir do teste de *Tukey* ($p < 0,05$).

Southwick et al., (1980), encontraram raio hidrodinâmico, para xantana comercial, com uma estrutura ordenada, nativa e não agregada, R_h de $0,100 \mu\text{m}$, resultado inferior ao encontrado no presente estudo para xantana comercial NRRLB-1459 em ambos os meios.

A distribuição da massa molar ou polidispersão, é determinada a partir da razão entre a massa molar ponderal média e a massa molar numérica média (M_w/M_n) (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001). Este parâmetro está relacionado com o índice de polidispersão calculado pelo Litesizer™ 500 (Anton Paar, Áustria).

O índice de polidispersão das 11 cepas analisadas variaram de 0,2 a 0,6. Valores considerados aceitáveis e que indicam uma população homogênea. PDI maiores que 0,7 indicam que a amostra possui uma distribuição de tamanho de partícula muito ampla, não sendo adequada para ser analisada pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DANAEI et al., 2018).

3.2 Distribuição do tamanho de partículas por intensidade

As distribuições do tamanho de partículas por intensidade estão dentro do regime diluído de concentração para a xantana, $c < 1,3 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$, segundo Oliveira et al., (2013). Essas distribuições consistem de um número de classes de tamanho (μm) no eixo X com a porcentagem relativa de partículas, em cada classe de tamanho, baseada na intensidade da luz espalhada no eixo Y.

As Figuras 1 e 2 apresentam a distribuição de tamanho por intensidade para as amostras de xantanas produzidas com o meio A, com concentração aproximadamente de $0,001 \text{ g L}^{-1}$. As amostras apresentaram distribuição monomodal, comportaram-se como se fossem únicas e não houvessem outras partículas, e encontraram-se distantes uma das outras de forma que não ocorreu nenhum tipo de interação intermolecular.

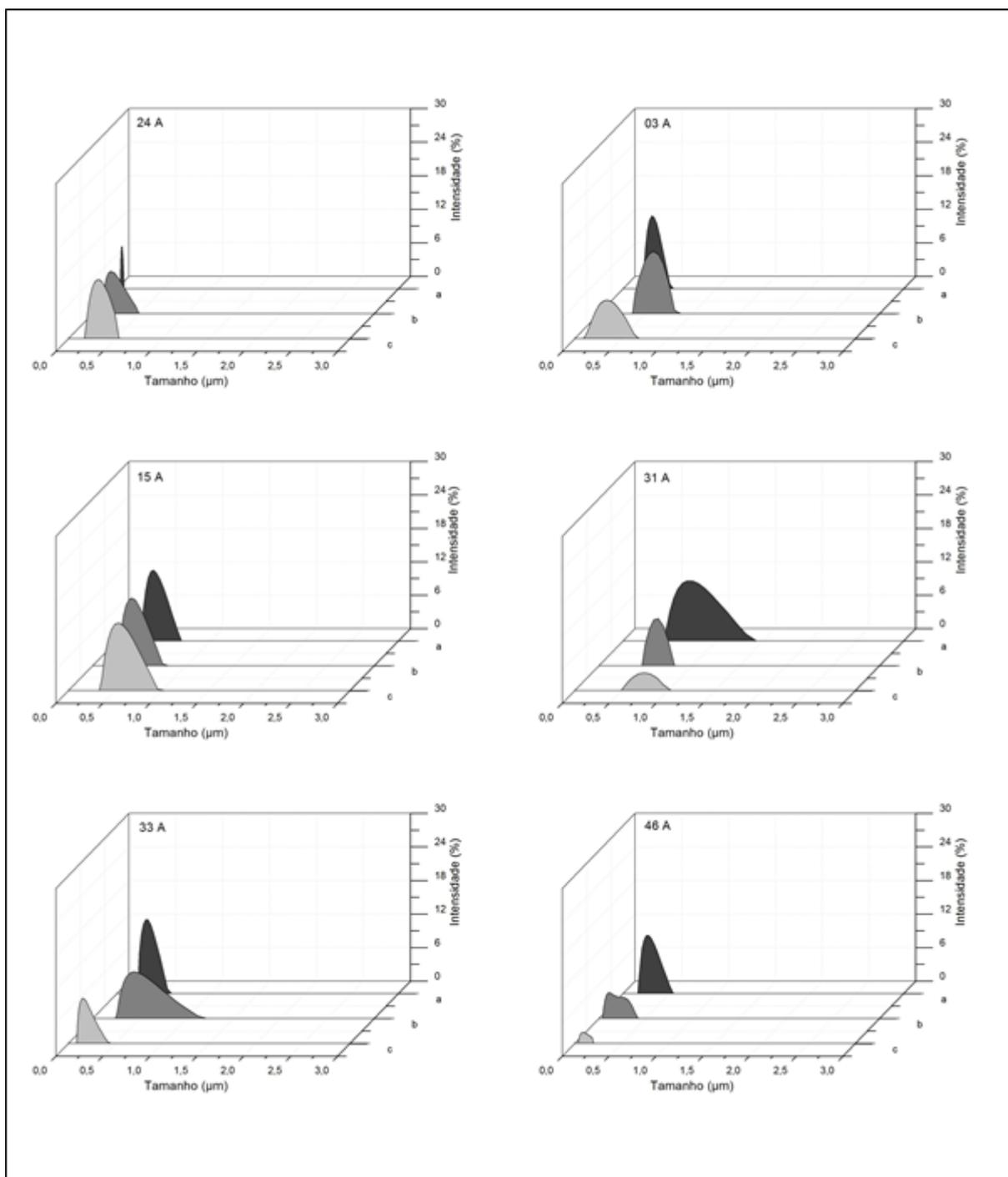


Figura 1. Distribuição de intensidade por tamanho das partículas para amostras 24, 03, 15, 31, 33 e 46 produzidas pelo meio A.

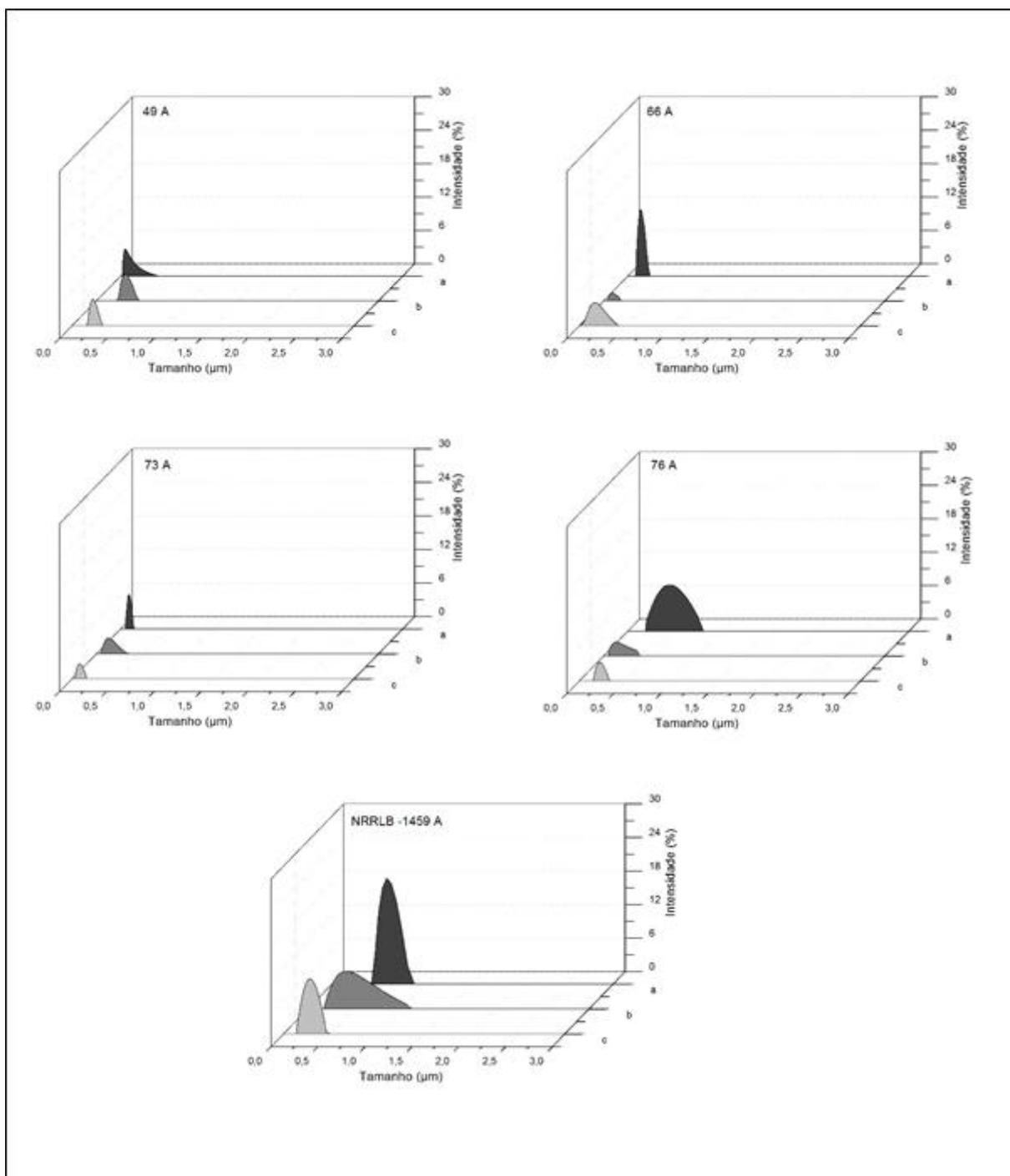


Figura 2. Distribuição de intensidade por tamanho das partículas para amostras 49, 66, 73, 76 e NRRLB -1459 produzidas pelo meio A.

As Figuras 3 e 4 apresentam a distribuição de tamanho por intensidade para as amostras de xantanas produzidas com o meio B, com concentração aproximadamente $0,001 \text{ g L}^{-1}$. As amostras apresentaram o mesmo comportamento que as amostras do meio A.

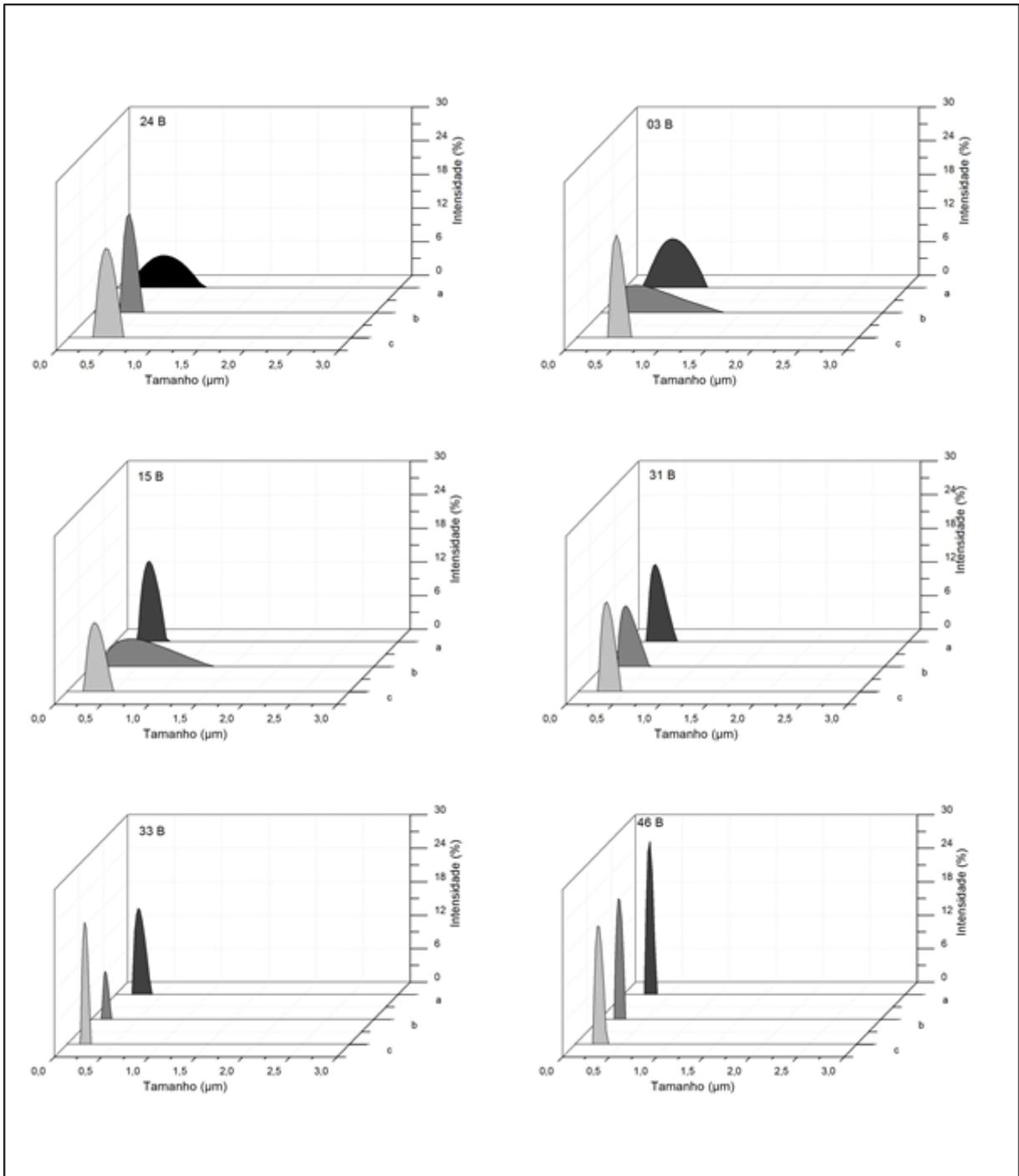


Figura 3. Distribuição de intensidade por tamanho das partículas para amostras 24, 03, 15, 31, 33 e 46 produzidas pelo meio B.

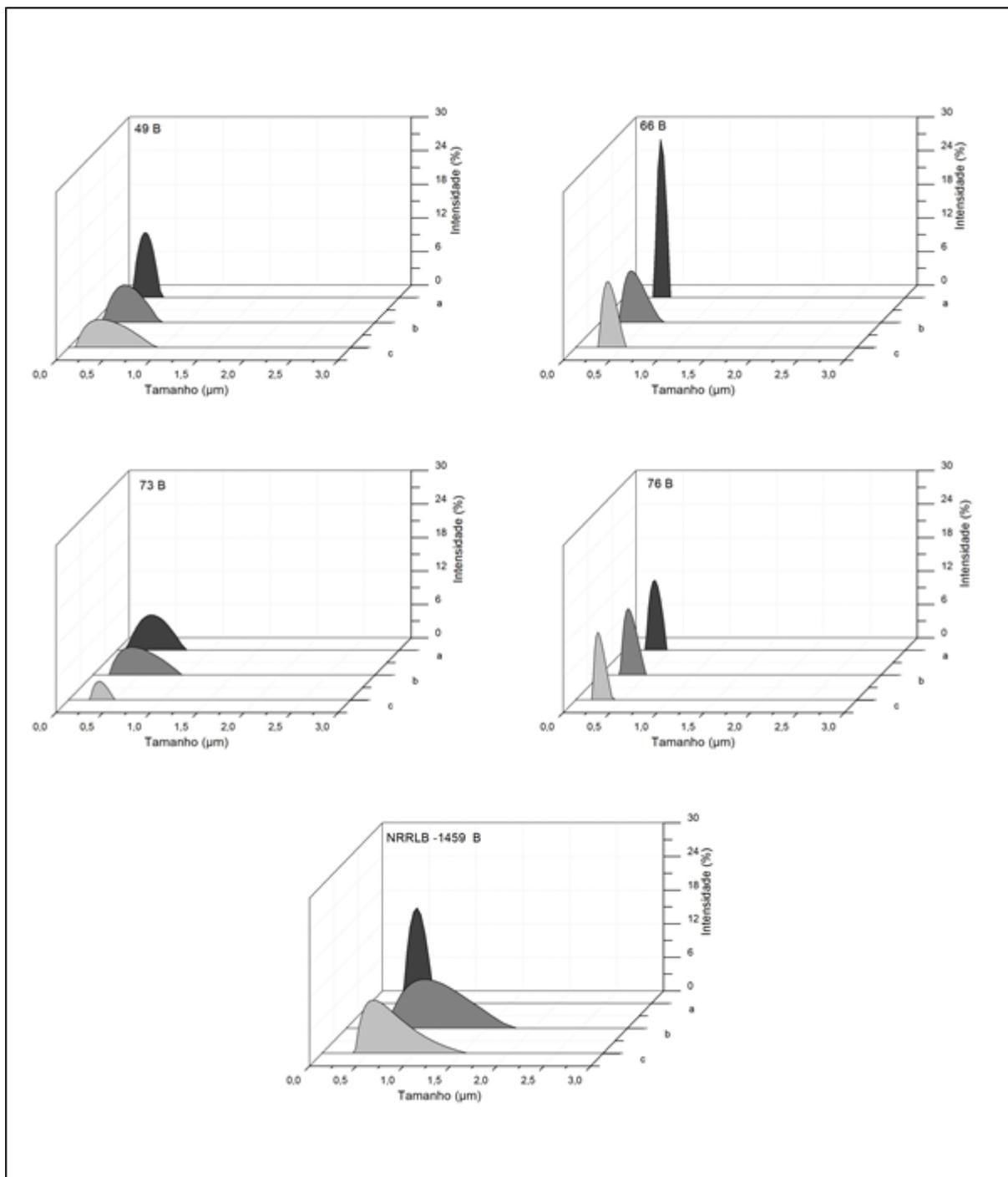


Figura 4. Distribuição de intensidade por tamanho das partículas para amostras 49, 66, 73, 76 e NRRLB-1459 produzidas pelo meio B.

As xantanas apresentaram comportamento monomodal, afirmando que a concentração (g L^{-1}) de xantana em solução encontram-se no regime diluído. Diaz, (2009), afirma que conforme a concentração de xantana na solução aumenta, a distribuição de intensidade por tamanho de partícula passa de um comportamento monomodal para bimodal e trimodal, ou seja, de um regime diluído em $c < 1,3 \times 10^{-2}$

g L⁻¹, para semidiluído em $1,3 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1} < c < 1,1 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$ e concentrado quando $c > 1,1 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$.

3.2 Massa Molar de xantana

A massa molar das xantanas estudadas foi medida por espalhamento de luz estático (SLS), através de um caracterizador de partículas Litesizer™ 500. Os resultados da massa molar, coeficiente de determinação e a segunda constante virial são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Massa molar (M_w), coeficiente de determinação (R^2) e segunda constante virial (A_2) das xantanas produzidas por diferentes cepas e meios de produção.

Cepa	Meio A			Meio B		
	M_w (Da)	R^2	A_2	M_w (Da)	R^2	A_2
03	$2,46 \times 10^7$	0,905	Positiva	$1,73 \times 10^7$	0,833	Positiva
15	$2,56 \times 10^7$	0,982	Positiva	$3,31 \times 10^7$	0,998	Positiva
24	$1,76 \times 10^7$	0,970	Positiva	$3,61 \times 10^8$	0,999	Positiva
31	$2,36 \times 10^7$	0,018	Positiva	$8,62 \times 10^6$	0,216	Negativa
33	$2,96 \times 10^7$	0,551	Positiva	$5,77 \times 10^6$	0,936	Positiva
46	$4,19 \times 10^7$	0,693	Negativa	$3,93 \times 10^7$	0,997	Positiva
49	$1,58 \times 10^7$	0,808	Positiva	$2,41 \times 10^7$	0,991	Positiva
66	$5,89 \times 10^7$	0,996	Positiva	$4,46 \times 10^5$	0,899	Positiva
73	$1,61 \times 10^7$	0,736	Positiva	$3,56 \times 10^7$	0,992	Positiva
76	$2,88 \times 10^7$	0,976	Positiva	$16,6 \times 10^7$	0,928	Positiva
NRRLB-1459	$3,85 \times 10^7$	0,762	Negativa	$8,07 \times 10^7$	0,685	Negativa

O meio de produção influencia na massa molar da xantana. As xantanas pruni apresentam diferentes massa molar, variando de 0,4 a 361 KDa. A xantana NRRLB-1459 apresentou massa molar diferente entre os meios, $3,85 \times 10^7$ Da para o meio A e $8,07 \times 10^7$ Da para o meio B, valores superiores ao encontrado na literatura.

Na literatura encontramos diferentes massa molar de goma xantana comercial por diferentes métodos, $3,16 \times 10^6$ Da (VIEBKE E WILLIAMS, 2000), $4,2 \times 10^6$ Da (FARIA et al., 2011), 17×10^6 Da (EREN et al., 2015). Papagianni et al., (2001), analisaram a *Xanthomonas campestris* ATCC 1395 com uma massa molar cerca de 5×10^5 Da.

Segundo Borges e Vendruscolo, (2008), a massa molar de xantana pode ser encontrada por algumas técnicas, encontrando valores que variam de 1,1 a 47×10^6 Da. Essa grande diferença de valor na massa molar de diferentes xantana, é devido a massa molar ser influenciada pela patovar de *Xanthomonas campestris* (SHATWELL et al., 1990), pela velocidade de agitação empregada na fermentação (PETERS et al., 1989), a temperatura durante a fermentação (CASAS et al., 2000), e pelo conteúdo dos substituintes acetil e piruvato (CALLET et al. 1987).

4 Conclusão

A partir dos resultados apresentados, foi possível estudar o comportamento hidrodinâmico das xantanas produzidas pelos diferentes meios de produção (meio A e o meio B). Um método não-espectroscópicos, o espalhamento de luz, foi utilizado para caracterizar o raio hidrodinâmico (R_h), o índice de polidispersão e a massa molar ponderal médio (M_w) das xantanas analisadas. Todas as xantanas produzidas apresentaram raio hidrodinâmico diferentes e o meio de produção provocou diferença no raio hidrodinâmico das xantana 24, 31, 66 e 73. O índice de polidispersão indicou que as soluções de xantanas apresentaram uma população homogênea. O meio de produção também influenciou na massa molar das xantanas analisadas, as xantanas pruni variaram de 0,4 a 361 10^6 Da e a massa molar da xantana comercial NRRLB-1459 foi de $3,85 \times 10^7$ Da para o meio A e $8,07 \times 10^7$ Da para o meio B. A caracterização hidrodinâmicas das xantanas, é necessária para conhecer seu tamanho e massa molar para futuras aplicações

5 Referência

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Goma Xantana: características e condições operacionais de produção. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 171-188, 2008.

CADMUS, M. C.; KNUTSON, C. A.; LAGODA, A. A.; PITTSLEY, J. E.; BURTON, K. A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 20, n. 7, p. 1003-1014, 1978.

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

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

DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v.10, n. 2, p. 57, 2018.

DIAZ, Patrícia Silva. **Avaliação Comparativa das Propriedades Hidrodinâmicas de Xantanas Produzidas pelo pv Pruni e Clairana**. 2009. 104f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

DOI, M.; EDWARDS, S. F. *The Theory of Polymer Dynamics*, Oxford University Press (Clarendon), London, New York, 1986.

EREN, N. M.; SANTOS, P. H. S.; CAMPANELLA, O. Mechanically modified xanthan gum: Rheology and polydispersity aspects. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 475–484, 2015.

FARIA, S.; PETKOWICZ, C. L. O.; MORAIS, S. A. L.; TERRONES, M. G. H.; RESENDE, M. M.; FRANÇA, F. P.; CARDOSO, V. L. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 469–476, 2011.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A; GÓMEZ E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 7, p. 549-579, 2000.

HAYNES, W.C.; WICKERHAM, L.J.; HESSELTINE, C.W. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. **Applied Microbiology**, v. 3, p. 361-368, 1955.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros**. Ed. E papers Serviços Editoriais Ltda. Rio de Janeiro, Brasil, 2001. 366 p.

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

OLIVEIRA, P. D.; MICHEL, R. C.; MCBRIDE, A. J. A.; MOREIRA, A. S.; LOMBA, R. F. T.; VENDRUSCOLO, C. T. Concentration Regimes of Biopolymers Xanthan, Tara, and Clairana, Comparing Dynamic Light Scattering and Distribution of Relaxation Time. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, e62713, 2013.

PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S. K.; BATSILAS, L.; PARAS, S. V.; KYRIAKIDIS, D. A.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 73–80, 2001.

PETERS, H.; HERBST, H.; HESSELINK, P.; LÜNSDORF, H.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W. The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 34, n. 11, p. 1393-1397, 1989.

PETRI, D. F. S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. **Journal Of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 23, 2015.

ROCHEFORT, W. E.; MIDDLEMAN, S. Rheology of xanthan gum: salt, temperature, and strain effects in oscillatory and steady shear experiments. **J. Rheol**, v. 31, p. 337, 1987.

RODD, A. B.; DUNSTAN, D. E.; BOGER, D. V. Characterisation of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 2, p. 159–174, 2000.

SANDFORD, P. A.; PITTSLEY, J. E.; KNUTSON, C. A.; WATSON, P. R.; CADMUS, M. C.; JEANES, A. Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B – 1459:

characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. **Extracellular Microbial Polysaccharides**, cap. 015, p. 192-210, 1977.

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**, Guildford, v. 12, n. 2, p. 71-78, 1990.

SOUW, P.; DEMAIN, A. L. Nutritional Studies on Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, p. 1186-1192, 1979.

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

SUH, I.-S.; HERBST, H.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W.-D. The molecular weight of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 3, p. 201–206, 1990.

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; ZAMBIAZI, R.; SCAMPARINI, A. R. P. Heteropolysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv. pruni C24. In: NISHINARI, K. **Hydrocolloids**. Amsterdam: Elsevier, 2000. p. 187-191.

VIEBKE, C.; WILLIAMS, P.A. Determination of molecular mass distribution of k-carrageenan and xanthan using asymmetrical flow field-flow fractionation. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 3, p. 265–270, 2000.

5 CONCLUSÃO GERAL

O comportamento das propriedades dinâmicas de 10 cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni e uma cepa comercial NRRLB-1459 foi estudado. Cada xantana foi produzida em 2 meios de produção diferentes (meio A e o meio B). A caracterização hidrodinâmica das xantanas foi obtida através de um caracterizador de partículas em dispersões líquidas. As amostras de xantanas apresentaram raio hidrodinâmico e massa molar distintas entre elas e um índice de polidispersão aceitável indicando uma

solução homogênea. As soluções analisadas estão dentro do regime diluído de concentração e o meio de produção influenciou as propriedades hidrodinâmicas.

6 REFERÊNCIAS

ANTON PAAR. **Instruction Manual Litesizer™ 500 Light-Scattering Instrument for Particle Analysis**. Published and printed by Anton Paar GmbH, Austria, 2016.

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.

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.

BORGES, C. D.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; VENDRUSCOLO, C. T. The influence of thermal treatment and operational conditions on xanthan produced by *X. arboricola* pv *pruni* strain 106. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 262-268, 2009.

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.

BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthan. In: STEINBÜCHEL, A.; VANDAMME, E.J.; BAETS, S. **Biopolymers**. Weinheim: Wiley-VCH. 2002. p. 261-269.

BOROWSKI, Joyce Moura. **Influência de métodos clássicos e alternativos de preservação de cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* na produção, viscosidade e composição química da xantana**. 2011. 103f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

BRANDÃO, L. V.; NERY, T. B. R.; MACHADO, B. A. S.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Produção de goma xantana obtida a partir do caldo de cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 217-222, 2008.

CANEVAROLO JÚNIOR, Sebastião V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2004. 448 p.

DANAEI, M.; DEGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v.10, n. 2, p. 57, 2018.

DIAZ, Patrícia Silva. **Avaliação Comparativa das Propriedades Hidrodinâmicas de Xantanas Produzidas pelo pv Pruni e Clairana**. 2009. 104f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

DIAZ, Patrícia Silva. **Influência de parâmetros físicos e químicos e da adição de íons no comportamento reológico de gomas xantana**. 2002. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2002.

DUMITRIU, S. (2005). **Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2005. 1219 p.

EREN, N. M.; SANTOS, P. H. S.; CAMPANELLA, O. Mechanically modified xanthan gum: Rheology and polydispersity aspects. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 475–484, 2015.

FARIA, S.; PETKOWICZ, C. L. O.; MORAIS, S. A. L.; TERRONES, M. G. H.; RESENDE, M. M.; FRANÇA, F. P.; CARDOSO, V. L. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 469–476, 2011.

FANTOU, C.; COMESSE, S.; RENO, F.; GRISEL, M. Hydrophobically modified xanthan: thickening and surface active agent for highly stable oil in water emulsions, **Carbohydr. Polym.**, v. 205, p. 362–370, 2019.

FANTOU, C.; YOO, J.; COMESSE, S.; GRISEL, M.; RENO, F. Synergy between pristine and hydrophobically modified xanthans for stabilizing oil-in-water emulsions. **Colloid and Interface Science Communications**, v. 37, p.100292, 2020.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A; GÓMEZ E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 7, p. 549-579, 2000.

JAMPALA, S. N.; MANOLACHE, S.; GUNASEKARAN, S.; DENES, F. S. Plasma-Enhanced Modification of Xanthan Gum and Its Effect on Rheological Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3618-3625, 2005.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v. 45, n. 1, p. 275-282, 1975.

KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D. A.; SKARACIS, G. N. Optimization of xanthan gum production by

Xanthomonas campestris grown in molasses. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 249–256, 2003.

KENNEDY, J. R. M.; KENT, K. E.; BROWN, J. R. Rheology of dispersions of xanthan gum, locust bean gum and mixed biopolymer gel with silicon dioxide nanoparticles. **Materials Science and Engineering**, v. 48, p. 347-353, 2015.

KLAIC, Paula Michele Abentroth. **Desenvolvimento de método de digestão ácida para determinação de sais em xantana e potencialização reológica de xantana de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* por troca iônica**. 2010. 111f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

KLAIC, Paula Michele Abentroth. **Parâmetros reológicos e resistência térmica de xantana de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*: potencialização por desacetilação, reticulação e troca iônica**. 2016. 163f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

KOOL, M. M.; GRUPPEN, H.; SWORN, G.; SCHOLS, H. A. The influence of the six constituent xanthan repeating units on the order–disorder transition of xanthan. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, p. 94-100, 2014.

LUCAS, E. F; SOARES, B. G; MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros**. Ed. E papers Serviços Editoriais Ltda. Rio de Janeiro, Brasil, 2001. 366 p.

MELTON, L. D.; MINDT, L.; REES, D. A.; SANDERSON, G. R. Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: evidence from partial hydrolysis studies. **Carbohydrate Research**, v. 46, p. 245-257, 1976.

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.

MOHSIN, A.; ZAMAN, W. Q.; GUO, M.; AHMED, W.; KHAN, I. M.; NIAZI, S.; ZHUANG, Y. Xanthan-Curdlan nexus for synthesizing edible food packaging films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.162, p. 43-49, 2020.

MOLON, Bruna de Oliveira. **Caracterização de xantana sintetizada por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* modificada quimicamente por desacetilação e reticulação durante armazenamento**. 2019. 91f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

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

MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni***. 2002. 73f. Tese

(Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2002.

MORRIS, V. J. Bacterial polysaccharides. In: STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Food polysaccharides and their applications**. London: Taylor & Francis, 2006. p. 413-454.

NEJADMANSOURI, M.; SHAD, E.; RAZMJOOEI, M.; SAFDARIANGHOMSHEH, R.; DELVIGNE, F.; KHALES, M. Production of xanthan gum using immobilized *Xanthomonas campestris* cells: Effects of support type. **Biochemical Engineering Journal**, v. 157, p. 107554, 2020.

OLIVEIRA, P. D.; MICHEL, R. C.; MCBRIDE, A. J. A.; MOREIRA, A. S.; LOMBA, R. F. T.; VENDRUSCOLO, C. T. Concentration Regimes of Biopolymers Xanthan, Tara, and Clairana, Comparing Dynamic Light Scattering and Distribution of Relaxation Time. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, e62713, 2013.

PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S. K.; BATSILAS, L.; PARAS, S. V.; KYRIAKIDIS, D. A.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 73–80, 2001.

PETERS, H.; HERBST, H.; HESSELINK, P.; LÜNSDORF, H.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W. The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 34, n. 11, p. 1393-1397, 1989.

PETRI, D. F. S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. **Journal Of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 23, 2015.

PINTO, Ellen Porto. **Desacetilação de xantana: influência no comportamento reológico**. 2005. 95f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

PREICHARDT, Leidi Daiana. **Aplicação de xantana comercial e xantana sintetizada por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* em bolos sem glúten**. 2009. 69f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

RENAUD, M.; BELGACEM, M.N.; RINAUDO, M. Rheological behaviour of polysaccharide aqueous solutions. **Polymer**, v. 46, n. 26, p.12348–12358, 2005.

ROCHFORD, W. E.; MIDDLEMAN, S. Rheology of xanthan gum: salt, temperature, and strain effects in oscillatory and steady shear experiments. **J. Rheol**, v. 31, p. 337, 1987.

RODD, A. B.; DUNSTAN, D. E.; BOGER, D. V. Characterisation of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 2, p. 159–174, 2000.

- RODRIGUES, Amanda Áila. (2010). **Avaliação da genotoxicidade e caracterização de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni**. 2010. 64f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.
- ROY, A.; COMESSE, S.; GRISEL, M.; HUCHER, N.; SOUGUIR, Z.; RENOU, F. Hydrophobically modified xanthan: an amphiphilic but not associative polymer, **Biomacromolecules**, v. 15, p. 1160–1170, 2014.
- SOUTHWICK, J. G.; LEE, H.; JAMIESON, A. M.; BLACKWELL, J. Self-association of xanthan in aqueous solvent-systems. **Carbohydrate Research**, v. 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.
- SUH, I.-S.; HERBST, H.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W.-D. The molecular weight of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 3, p. 201–206, 1990.
- SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 663-674, 2001.
- VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; ZAMBIAZI, R.; SCAMPARINI, A. R. P. Heteropolysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv. pruni C24. In: NISHINARI, K. **Hydrocolloids**. Amsterdam: Elsevier, 2000. p. 187-191.
- VIEBKE, C. Order–Disorder Conformational Transition of Xanthan Gum. In: DUMITRIU, S. Editors. **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**. Second Edition. CRC Press. New York, 2004. p. 459-474.
- VIEBKE, C.; WILLIAMS, P.A. Determination of molecular mass distribution of k-carrageenan and xanthan using asymmetrical flow field-flow fractionation. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 3, p. 265–270, 2000.
- XU, L.; DONG, M.; GONG, H.; SUN, M.; LI, Y. Effects of inorganic cations on the rheology of aqueous welan, xanthan, gellan solutions and their mixtures. **Carbohydrate Polymers**. V. 121. p. 147-154, 2015.