



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

RIVELI VIEIRA BRIGIDO

**PRODUÇÃO DE ALGINATO SINTETIZADO POR *Pseudomonas
mendocina* EM DIFERENTES SUBSTRATOS**

**Florianópolis/SC
2010**

Tabela B. 9 - ANOVA para a produtividade, etapa 2, utilizando sacarose como substrato.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	p-valor
A (L)	0,000876	1	0,000876	4,32870	0,05390
A (Q)	0,041032	1	0,041032	202,80190	0,00000
B (L)	0,006204	1	0,006204	30,66510	0,00004
B (Q)	0,044513	1	0,044513	220,00810	0,00000
A L x B L	0,017113	1	0,017113	84,57990	0,00000
Erro	0,003237	16	0,000202		
Total	0,093695	21			

Coefficiente de correlação: $R^2 = 0,96545$ MS Residual= 0,0002023

RIVELI VIEIRA BRIGIDO

PRODUÇÃO DE ALGINATO SINTETIZADO POR *Pseudomonas mendocina* EM DIFERENTES SUBSTRATOS

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Miguel Müller

**Florianópolis/SC
2010**

Tabela B. 6 - ANOVA para a produtividade, etapa 2, utilizando glicerol como substrato.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
A (L)	0,000734	1	0,000734	10,76110	0,00471
A (Q)	0,008913	1	0,008913	130,69540	0,00000
B (L)	0,001481	1	0,001481	21,70970	0,00026
B (Q)	0,013875	1	0,013875	203,45410	0,00000
A L x B L	0,000800	1	0,000800	11,73050	0,00347
Error	0,001091	16	0,000068		
Total SS	0,021926	21			

Coefficiente e correlação: $R^2=0,95023$ MS Residual= 0,0000682.

Tabela B. 7 - ANOVA para a produtividade, etapa 1, utilizando sacarose como substrato.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
A	0,018050	1	0,018050	18,51282	0,01262
B	0,057800	1	0,057800	59,28205	0,00153
A x B	0,002450	1	0,002450	2,51282	0,18810
Erro	0,003900	4	0,000975		
Total	0,082200	7			

Coefficiente de correlação: $R^2=0,95255$ MS Residual= 0,000975

Tabela B. 8 - ANOVA para o fator de bioconversão, etapa 1, utilizando sacarose como substrato.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
A	0,000239	1	0,000239	0,14950	0,71870
B	0,050863	1	0,050863	31,83780	0,00486
A x B	0,000199	1	0,000199	0,12460	0,74192
Erro	0,006390	4	0,001598		
Total	0,057691	7			

$R^2=0,88923$ MS Residual= 0,0015976

Tabela B. 3 - ANOVA para a produtividade, etapa 2, utilizando glicose como substrato.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
A(L)	0,000287	1	0,000287	2,54070	0,13050
A (Q)	0,000150	1	0,000150	1,32920	0,26587
B (L)	0,022977	1	0,022977	203,56140	0,00000
B (Q)	0,005507	1	0,005507	48,79070	0,00000
A L x B L	0,001250	1	0,001250	11,07420	0,00426
Erro	0,001806	16	0,000113		
Total	0,033081	21			

Coeficiente de correlação: $R^2=0,95007$ MS Residual= 0,0001032

Tabela B. 4 - ANOVA para a produtividade, etapa 1, utilizando glicerol como substrato.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
A	0,003613	1	0,003613	41,28571	0,00302
B	0,005513	1	0,005513	63,00000	0,00136
A x B	0,000012	1	0,000012	0,14286	0,72466
Erro	0,000350	4	0,000088		
Total	0,009488	7			

Coeficiente de correlação: $R^2=0,96311$ MS Residual= 0,0000875

Tabela B. 5 - ANOVA para o fator de bioconversão, etapa 1, utilizando glicerol como substrato.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
A	0,159613	1	0,159613	38,34535	0,00346
B	0,052813	1	0,052813	12,68769	0,02354
A x B	0,030012	1	0,030012	7,21021	0,05493
Erro	0,016650	4	0,004163		
Total	0,259088	7			

Coeficiente de correlação: $R^2=0,93574$ MS Residual= 0,0041625

PRODUÇÃO DE ALGINATO SINTETIZADO POR *Pseudomonas mendocina* EM DIFERENTES SUBSTRATOS

Por

RIVELI VIEIRA BRIGIDO

Dissertação julgada para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 24 de agosto de 2010.

Prof. Dr. José Miguel Müller
Orientador

Prof^a. Dr^a. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz
Coordenadora

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Miguel Müller

Prof. Dr. Márcio José Rossi

Prof^a. Dr^a. Regina Vasconcellos Antonio

Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto

ANEXO B - ANOVA

Tabela B. 1 - ANOVA para a produtividade, etapa 1, utilizando glicose como substrato.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	p-valor
A	0,005000	1	0,005000	40,00000	0,00320
B	0,006050	1	0,006050	48,40000	0,00224
A e B	0,000200	1	0,000200	1,60000	0,27458
Erro	0,000500	4	0,000125		
Total	0,011750	7			

Coefficiente de correlação: $R^2 = 0,95745$ MS Residual = 0,000125

Tabela B. 2 - ANOVA para o fator de bioconversão, etapa 1, utilizando glicose como substrato.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	p-valor
A	0,010513	1	0,010513	56,06667	0,00170
B	0,005513	1	0,005513	29,40000	0,00561
A e B	0,000113	1	0,000113	0,60000	0,48182
Erro	0,000750	4	0,000188		
Total	0,016888	7			

Coefficiente de correlação: $R^2 = 0,95559$ MS Residual = 0,0001875

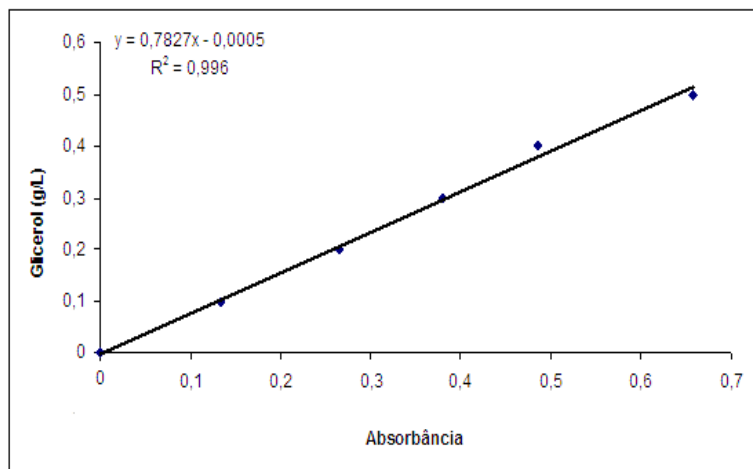


Figura A3 - Curva de calibração para a determinação da concentração de glicerol pelo Kit Analisa.

RESUMO

O alginato é um polissacarídeo existente na parede celular de algas marinhas marrons (Phaeophyceae) e que também pode ser sintetizado por *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas* spp. As aplicações do alginato microbiano podem ser as mesmas do alginato extraído de algas. Na indústria de alimentos, pode ser utilizado como gelificante, emulsificante, estabilizante e espessante. Ainda pode ser utilizado como agente de encapsulação e na formulação de curativos interativos, na indústria farmacêutica. Como ingrediente em pastas de impressão têxtil, detergentes e shampoos na indústria química. Na área médica, os alginatos têm sido empregados para imobilização de células vivas, no tratamento de doenças hormonais em cobaias e na manufatura de pele artificial com melhores propriedades cicatrizantes. O Alginato bacteriano pode ser produzido para fins específicos, com uma melhora nas suas propriedades qualitativas permitindo novas aplicações desse polímero no mercado. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de alginato por *Pseudomonas mendocina* em diferentes substratos. Foram realizadas culturas em frascos agitados, utilizando glicose, sacarose ou glicerol, como fonte de carbono. Os experimentos foram delineados a um planejamento experimental para cada fonte de carbono, avaliando as diferentes concentrações de substrato e nitrogênio e limitando-se o tempo de cultivo em 48 h. A condição maximizada para a produção de alginato, a partir de glicose, dentro das condições estudadas foi 100 g.L⁻¹ de glicose e 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de amônio. A produtividade obtida nessa condição foi 0,33 g.L⁻¹h⁻¹. Para meios utilizando glicerol como substrato, a condição maximizada foi 40 g.L⁻¹ de glicerol e 0,7 g.L⁻¹ de sulfato de amônio. A produtividade obtida nessa condição foi 0,23 g.L⁻¹h⁻¹. Utilizando sacarose como substrato, a condição maximizada para a produção de alginato dentro das condições estudadas foi 80 g.L⁻¹ de sacarose e 0,7 de sulfato de amônio. Nas condições otimizadas utilizadas neste trabalho, o meio com sacarose como fonte de carbono apresentou a maior produtividade, 0,42 g.L⁻¹h⁻¹, para a síntese de alginato por *Pseudomonas mendocina*. O biopolímero formado foi caracterizado através da técnica de espectroscopia de ressonância magnética (1HNMNR) e pode-se verificar que o alginato sintetizado por *Pseudomonas mendocina* possui apenas blocos M. Foram realizadas medidas reológicas do meio de cultura ao final do cultivo e todos apresentaram comportamento pseudoplástico. Meios de cultivo com o alginato formado e utilizando sacarose como fonte de carbono, apresentaram uma viscosidade aparente muito superior em relação aos meios onde foi utilizado glicose ou glicerol.

Palavras-chave: Alginato. *Pseudomonas mendocina*. Biopolímeros.

ANEXOS

ANEXO A - Curva de calibração para determinação da concentração

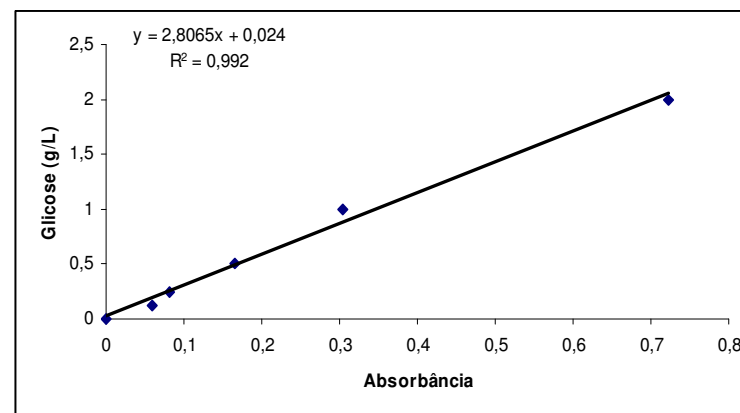


Figura A1 - Curva de calibração para determinação da concentração de glicose pelo kit Analisa.

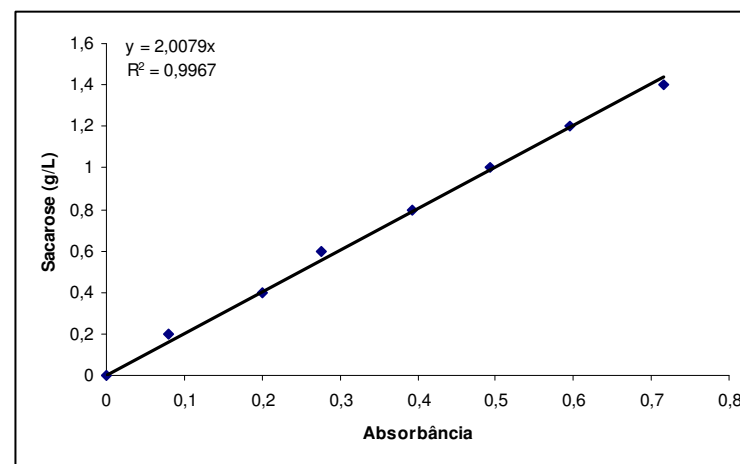


Figura A2 - Curva de calibração para a determinação da concentração de sacarose pelo método do ácido 3-5- dinitrosalicílico (DNS).

ABSTRACT

Alginate is a polysaccharide that occurs as a structural components in marine brown algae (Phaeophyceae) as well as capsular polysaccharides in two bacterial genera, *Pseudomonas* and *Azotobacter*. Alginate produced by microorganisms can have the same use of alginate obtained from brown algae. In food industry, can be used as thickeners, emulsifiers, stabilizers and gelling agents. Can be used as encapsulation agent and in formulation of dressings interactive, in pharmaceutical industry. As an ingredient in textil printing, detergent and shampoos in the chemical industry. In medical applications, to immobilizing living cells, as in treatment of hormonal diseases in experimental animal models and to manufacture wound dressing with improved healing properties. Bacterial alginate can be produced to specific applications with high-quality, improved properties allowing new commercial applications. This work was aimed to study the alginate production by *Pseudomonas mendocina* with different substrates as carbon source. Cultures were carried out on shake flasks with glucose, sucrose or glycerol as carbon source. The experiments were fitting by the Methodology of Experiment Planning for each one substrate to evaluate different substrate and nitrogen concentration in 48 h on process productivity. Optimal conditions for alginate production from glucose as carbon source, was 100 g.L⁻¹ glucose and 0.5 g.L⁻¹ ammonium sulfate, the maximum productivity was 0.33 g.L⁻¹h⁻¹. Using glycerol as carbon source, the optimal condition was 40 g.L⁻¹ glycerol and 0.7 g.L⁻¹ ammonium sulfate, the productivity found was 0.23 g.L⁻¹h⁻¹. Using sucrose as carbon source, the optimal condition for alginate production was 80 g.L⁻¹ sucrose and 0.7 ammonium sulfate. Optimized conditions studied in this work, showed higher productivity (0.42 g.L⁻¹h⁻¹) in culture media containing sucrose as carbon source for alginate synthesis by *Pseudomonas mendocina*. The biopolymer was characterized by ¹HNMR spectroscopy and could be verified that alginate synthesized by *Pseudomonas mendocina* only has homopolymeric M blocks. The culture media containing alginate was characterized by rheological measurements and exhibited the typical pseudoplastic behavior. Culture media containing sucrose as carbon source exhibited a higher apparent viscosity than culture media containing glucose or glycerol as carbon source.

Keywords: Alginate. *Pseudomonas mendocina*. Biopolymer.

SUTHERLAND, J.P.; BAYLISS, A. J. Predictive modeling of *Yersinia enterocolitica*: The effects of temperature, pH and sodium chloride. **International Journal Food Microbiology**, v. 21, p. 322-329, 1986 a.

TONELI, J. T. C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, J. K. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.7 (2), p.181-204, 2005.

VERMANI, M. V.; KELKAR, S.M.; KAMAT, M.Y. Production and optimization of certain growth parameters for an exopolysaccharide from *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80(6), p 599-602, 1995.

SABRA, W.; ZENG A.P. ; DECKWER W.D. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 56, p 315-325, 2001.

SANDFORD, P. A. Exocellular microbial polysaccharides. **Advances in Carbohydrate. Chemistry & Biochemistry**, v. 36 p. 265-313, 1979.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. tradução e adaptação: MOTHÉ, C. G.; CORREIA, D. Z.; PETRI, H. M.; GONÇALVES, M.; CARESTIATO, T., Artliber, São Paulo, 2006.

SENGHA, S. S.; & ANDERSON, A. J.; HACKING, A. J. & DAWES, E. A. The production of alginate by *Pseudomonas mendocina* in batch and continuous culture. **Journal of general microbiology**, v. 1135, p 795-804, 1989.

SILVERSTEIN, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Editora LTC, Rio de Janeiro, 2007.

SKJAK-BRÆK, G, GRASDALEM H, LARSEN L. Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. **Carbohydrate Research**, v.154, p. 239-250, 1986.

SOON-SHIONG P . Encapsulated islet cell therapy for the treatment of diabetes: Intraperitoneal injection of islets. **Journal Controlled Release**, v. 39, p 399-409, 1995.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in food Process Engineering**. East Lansing – Freeman Press, p. 421, 1996.

SUN, S.F. **Physical Chemistry of Macromolecules: Basic Principles and Issues**, 2nd. Ed. New York, USA: John Wiley & Sons, 549p, 2004.

SUTHERLAND, I. W. Extracellular Polysaccharides. In **Biotechnology**. Ed. Rhem. H.J. & Reed. G.; v. 3, cap.3 p. 531-574, 1986.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends Biotechnology**, v. 16, p 41-46, 1998.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura dos blocos homopoliméricos M e G e dos blocos heteropoliméricos M-G. 39
- Figura 2** - Atração dos blocos G pela presença do íon de cálcio, formando uma estrutura conhecida como “caixa de ovos”. 39
- Figura 3** - Acompanhamento do crescimento de *Pseudomonas mendocina*, expressado em $\ln(X/X_0)$ vs tempo, onde X_0 é o valor da absorbância no tempo inicial ♦ Curva do repique inicial ● Curva do repique final..... 69
- Figura 4** - Curva de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs o tempo para os meios com concentrações iniciais de glicose de ♦ 20 g.L⁻¹ ■ 40 g.L⁻¹ e ▲ 80 g.L⁻¹ a 30°C. 70
- Figura 5** - Curva de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs o tempo para os meios com concentrações iniciais de glicose de ♦ 20 g.L⁻¹ ■ 40 g.L⁻¹ e ▲ 80 g.L⁻¹ a 35°C. 71
- Figura 6** - Curva de consumo de glicose vs o tempo para os meios com concentrações iniciais de substrato de ♦ 20 g.L⁻¹ ■ 40 g.L⁻¹ e ▲ 80 g.L⁻¹ a 30 °C, onde S representa a concentração de glicose no meio em g.L⁻¹. 71
- Figura 7** - Curva de consumo de glicose vs o tempo para os meios com concentrações iniciais de substrato de ♦ 20 g.L⁻¹ ■ 40 g.L⁻¹ e ▲ 80 g.L⁻¹ a 35 °C, onde S representa a concentração de glicose no meio em g.L⁻¹. 72
- Figura 8** – Curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs tempo para meios com concentrações de iniciais de glicerol de ♦ 20 g.L⁻¹ ■ 40 g.L⁻¹ e ▲ 80 g.L⁻¹ a 30 °C. 74
- Figura 9** - Curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs tempo para

meios com concentrações iniciais de glicerol de \blacklozenge 20 g.L⁻¹ \blacksquare 40 g.L⁻¹ e \blacktriangle 80 g.L⁻¹ a 35 °C..... 74

Figura 10 - Curva de consumo de glicerol vs o tempo para os meios com concentrações iniciais de substrato de \blacklozenge 20 g.L⁻¹ \blacksquare 40 g.L⁻¹ e \blacktriangle 80 g.L⁻¹ a 30°C, onde S representa a concentração de glicerol no meio em g.L⁻¹..... 75

Figura 11 - Curva de consumo de glicerol vs o tempo para os meios com concentrações iniciais de substrato de \blacklozenge 20 g.L⁻¹ \blacksquare 40 g.L⁻¹ e \blacktriangle 80 g.L⁻¹ a 35°C, onde S representa a concentração de glicerol no meio em g.L⁻¹..... 75

Figura 12 - Curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs tempo para meios com concentrações iniciais de sacarose de \blacklozenge 20 g.L⁻¹ \blacksquare 40 g.L⁻¹ e \blacktriangle 80 g.L⁻¹ a 30°C..... 77

Figura 13 - Curva de consumo de sacarose vs o tempo para os meios com concentrações iniciais de substrato de \blacklozenge 20 g.L⁻¹ \blacksquare 40 g.L⁻¹ e \blacktriangle 80 g.L⁻¹ a 30°C, onde S representa a concentração de sacarose no meio em g.L⁻¹. 77

Figura 14 - Curva de consumo do substrato, onde S é a concentração de glicose em g.L⁻¹ e N é a concentração de (NH₄)₂SO₄ em g.L⁻¹ \blacklozenge S= 40 g.L⁻¹ com N= 0,7 g.L⁻¹ \blacksquare S= 40 g.L⁻¹ com N=1,4 g.L⁻¹ \blacktriangle S= 80 g.L⁻¹ com N=0,7 g.L⁻¹ e \times S= 80 g.L⁻¹ com N=1,4 g.L⁻¹ 81

Figura 15 - Curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs tempo onde S é a concentração de glicose em g.L⁻¹ e N é a concentração de (NH₄)₂SO₄ em g.L⁻¹: \blacksquare S = 40 g.L⁻¹ com N= 0,7 g.L⁻¹ \blacksquare S = 40 g.L⁻¹ com N= 1,4 g.L⁻¹ \blacksquare S= 80 g.L⁻¹ com N= 0,7 g.L⁻¹ \blacksquare S= 80 g.L⁻¹ com N= 1,4 g.L⁻¹. As linhas representam os dados experimentais ajustados ao Modelo Gompertz Modificado, com auxílio do software Matlab 7.0. 81

Figura 16 - Curva de consumo do substrato, onde S é a concentração de glicerol em g.L⁻¹ e N é a concentração de (NH₄)₂SO₄ em

MOREIRA, A. N.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através da inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia sp.7070*. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 8(2), p 135-142, 2005.

MÜLLER, J. M. **Otimização da produção de alginato por *Pseudomonas mendocina* com planejamento fatorial**, Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1997.

MÜLLER, J.M. & MONTE ALEGRE, R. Produção de biopolímero por mutante de *Pseudomonas mendocina*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 36(2), p 295-303, 1993.

PACE, G. W. Polímeros Microbianos. In: BU'LOCK, J.& KRISTIANSEN, B. **Biotecnología Básica**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1991.

OKABE, E.; MUTSUYASU, N.; HARUYOSHI, M.; NISIZAWA, K. Investigation of carbon and phosphorus sources in cultural media of a selected strain of alginate-producing *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 59 (1), p 1-7, 1981.

RAO, A. **Rheology of fluid and semisolid foods. Principles and Applications**. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, p. 1:21, 1999.

RHEMMINGHORST, U. & RHEM, B. H. A. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. **Biotechnology Letters**, v. 28, p 1701-1712, 2006.

RHEM, B. H. A. & VALLA, S. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 48, p 281-288, 1997.

RUITER, G. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, G. J. ROMBOUTS, F. M. Carbohydrate analysis of water soluble uronic acid containing polysaccharides with high performance anion exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. **Analytical Biochemistry**, v. 207, p 176-185, 1992.

alginate by a mutant of *Azotobacter vinelandii* and on the enzymes involved in its biosynthesis. **Journal of General Microbiology**, v. 127, p 185-191, 1981.

JARMAN, T. R.; DEAVIN, L.; SLOCOMBE, S.; RIGHELATO, C. R. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of General Microbiology**, 107, p 59- 64, 1978.

JERGA, A.; RAYCHAUDHURI, A.; TIPTON, P. *Pseudomonas aeruginosa* C5-mannuronan epimerase: Steady state kinetics and characterization of the product. **Biochemistry**, v 45 p. 552:560, 2006.

LAWS, A.; GU, Y.; MARSHALL, V. Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 19, p 597-625, 2001.

LEWIS, M. J. **Propriedades Físicas de los Alimentos y los Sistemas de Processado**. Zaragoza: Editora Acribia S. A., 1993.

KAYACIER, A. & DOGAN, M. Rheological properties of some gums-salep mixed solutions. **Journal of Food Engineering**, v. 72, p 261-265, 2006.

MANCINI, M.; MORESI, M.; SAPPINO, F. Rheological behaviour of aqueous dispersions of algal sodium alginates. **Journal of Food Engineering**, v.28, p 283-295, 1996.

MAUGERI, F. Produção de Polissacarídeos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., v. 3, 2001.

MILLER, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagents in determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p 426-429, 1959.

MIRSHAFIEY, A.; MATSUO, H; NAKANE, SHUNYA; RHEM, B. H. A; KOH, C; MIYOSHI, S. Novel Immunosuppressive Therapy by M2000 in Experimental Multiple Sclerosis. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 27, p 255-265, 2005.

g.L^{-1} \blacklozenge S= 40 g.L^{-1} com N= 0,7 g.L^{-1} \blacksquare S= 40 g.L^{-1} com N=1,4 g.L^{-1} \blacktriangle S= 80 g.L^{-1} com N=0,7 g.L^{-1} e \times S= 80 g.L^{-1} com N=1,4 g.L^{-1} 84

Figura 17 - Curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs tempo onde S é a concentração de glicerol em g.L^{-1} e N é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} : --- S = 40 g.L^{-1} com N= 0,7 g.L^{-1} --- S = 40 g.L^{-1} com N= 1,4 g.L^{-1} --- S= 80 g.L^{-1} com N= 0,7 g.L^{-1} --- S= 80 g.L^{-1} com N= 1,4 g.L^{-1} . As linhas representam os dados experimentais ajustados ao Modelo Gompertz Modificado, com auxílio do software Matlab 7.0. 84

Figura 18 - Curva de consumo de sacarose onde S é a concentração de sacarose em g.L^{-1} e N é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} \blacklozenge S= 40 g.L^{-1} com N= 0,7 g.L^{-1} \blacksquare S= 40 g.L^{-1} com N=1,4 g.L^{-1} \blacktriangle S= 80 g.L^{-1} com N=0,7 g.L^{-1} e \times S= 80 g.L^{-1} com N=1,4 g.L^{-1} 87

Figura 19 - Curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs tempo onde S é a concentração de sacarose em g.L^{-1} e N é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} : --- S = 40 g.L^{-1} com N= 0,7 g.L^{-1} --- S = 40 g.L^{-1} com N= 1,4 g.L^{-1} --- S= 80 g.L^{-1} com N= 0,7 g.L^{-1} --- S= 80 g.L^{-1} com N= 1,4 g.L^{-1} 87

Figura 20 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produtividade (P). 91

Figura 21 - Diagrama de Pareto para a variável resposta fator de bioconversão (Y)..... 92

Figura 22 - Superfície de Resposta referente ao efeito da concentração de glicose e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na produtividade (P) em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, onde A é a concentração de glicose em g.L^{-1} e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} 93

Figura 23 - Superfície de Resposta para o fator de bioconversão (Y) em gP.gS^{-1} , onde A é a concentração de glicose em g.L^{-1} e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} 93

- Figura 24** - Diagrama de Pareto para a variável resposta produtividade (P). 95
- Figura 25** - Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a produtividade (P) em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, onde A é a concentração de glicose em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} 96
- Figura 26** - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produtividade (P). A- Concentração de Glicerol em g.L^{-1} e B Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} . O ponto no qual a estimativa dos efeitos é significativa ($p=0,05$) é indicado pela linha pontilhada..... 98
- Figura 27**- Diagrama de Pareto para o fator de bioconversão (Y). 98
- Figura 28** - Superfície de Resposta referente ao efeito da concentração de glicerol e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na produtividade (P) em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, onde A é a concentração de glicerol em g.L^{-1} e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} 99
- Figura 29** - Superfície de Resposta para o fator de bioconversão (Y) em gP.gS^{-1} 100
- Figura 30** - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produtividade. 101
- Figura 31** - Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a produtividade (P) em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, onde A é a concentração de glicerol em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} 102
- Figura 32** - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produtividade (P). A- Concentração de Sacarose em g.L^{-1} e B Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} . O ponto no qual as estimativas dos efeitos são significativas ($p=0,05$) é indicado pela linha pontilhada. 104
- Figura 33** - Diagrama de Pareto para a resposta fator de bioconversão (Y). 105
- Figura 34** - Superfície de Resposta referente ao efeito da concentração de sacarose e concentração de nitrogênio na produtividade (P) em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ 106

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

FYFE, J. A. M. & GOVAN, J. R.W. Alginate synthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*: a chromosomal locus involved in control. **Journal of General Microbiology**, v. 1119, p.443-450, 1980.

FYFE, J. A. M. & GOVAN, J. R.W. Synthesis, regulation and biological function of bacterial alginate. In: **Progress in Industrial Microbiology**, Ed. M. E Bushell. Amsterdam, p.45-83, 1983.

GAMMAR- NOURANI, L.; BLONDEAU, K., & SIMONET, J. M. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83(3), p 281-287, 1997.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. Alginato bacteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, v. 31 (7), p.1800-1806, 2008.

GIMMESTAD, M.; STEIGEDAL, M, ERTESVAG, H.; MORENO, S.; CHRISTENSEN, E.B.; ESPÍN, G.; VALLA, S. Identification and characterization of an *Azotobacter vinelandii* type I Secretion System Responsible for export of the AlgE-Type Mannuronan C-5-Epimerases. **Journal of bacteriology**, v.188 (15), p 5551-5560, 2006.

GOH, K.K.T.; HAISMAN, D.R.; ARCHER, R.H.; SINGH, H. Evaluation and modification of existing methods for the quantification of exopolysaccharides in milk-based media. **Food Research International**, v. 38, p 605-613, 2005.

GOVAN, J. R. W.; FYFE, J. A. M., FYFE, J. A. M. & JARMAN, T. R. Isolation of alginate-producing mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina*. **Journal of General Microbiology**, v. 1125, p 217-220 , 1981.

HORAN, N. J.; JARMAN, T. R.; DAWES, E. A. Effects of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of

CLEMENTI, F. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, p 327-361, 1997.

CLEMENTI, F.; MANCINI, M.; MORESI, M. Rheology of alginate from *Azotobacter vinelandii* in aqueous dispersions. **Journal of Food Engineering**, v. 36, p 51-62, 1998.

CONTI, E.; FLAIBANI, A; O'REGAN, M & SUTHERLAND, I.W. Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: production and properties. **Microbiology**, v. 140, p 1125-1132, 1994.

CORRANDINI, M.G. & PELEG, M. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experimental data. **Journal of Applied Microbiology** v. 99, p 187-200, 2005.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food hydrocolloids**, v. 17, p. 25-39, 2003.

DRAGET, K. I.; SKJAK BRAEK, g., SMIDSRØD, O. Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p 31-38, 1994.

DRAGET, I. K. TAYLOR, C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. **Food Hydrocolloids**, doi:10.1016/j.foodhyd.2009.10.007, 2009.

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

ERKMEN, O. Predictive modeling of *Listeria monocytogenes* inactivation under high pressure carbon dioxide. **LWT – Food Science and Technology**, v. 33, p.514-519, 2000.

ERNANDES, F.; Garcia-Cruz, C. H. **Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção**. Semana: Ciências Agrárias, Londrina, v. 26 (1), p. 71-82, 2005.

Figura 35 - Superfície de Resposta para o fator de bioconversão (Y) em gP.gS^{-1} 106

Figura 36 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produtividade (P). 108

Figura 37- Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a produtividade (P) em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ 109

Figura 38 - Viscosidade aparente (η) vs taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) para os meios de cultivo após 48 horas..... 112

Figura 39 - Viscosidade aparente (η) vs taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) para os meios de cultivo após 48 horas..... 114

Figura 40 - Viscosidade aparente (η) vs taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) para os meios de cultivo após 48 horas..... 115




Figura 41 - Viscosidade aparente (η) vs taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) para os substratos  sacarose,  glicerol e  glicose, nas concentrações iniciais de substrato de 40 g.L^{-1} , a 30°C 117

Figura 42 - Tubos de ensaios contendo o meio de cultura ao final de 48 horas de cultivo. 118

Figura 43- Análise de $^1\text{HNMR}$ de amostras de alginato sintetizado por *Pseudomonas mendocina*..... 119

REFERÊNCIAS

- AL-ASHEH, S.; ABU-JDAYIL, B.; ABUNASSER, N.; BARAKAT, A. Rheological characteristics of microbial suspensions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, p 67–74, 2002.
- ALVES, V. D.; FREITAS, F.; TORRES, C.A.V.; CRUZ, M.; MARQUES, R.; GRANDFILS, C.; GONÇALVES, M. P.; OLIVEIRA, R. REIS, M.A.M. Rheological and morphological characterization of the culture broth during exopolysaccharide production by *Enterobacter* sp. **Carbohydrate Polymers** (2010), doi:10.1016/j.carbpol.2009.09.006.
- BARANY, J. & ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, Abstract, 1994.
- BOEHS, I. C.; KRANENBURG, R. V.; HUGENHOLTZ, J.; KLEEREBEZEM, M.; VOS, W. M. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p 723-732, 2001.
- BOUFFAR-ROUPE, C. & HEYRAUD, A. Determination of relative proportion of D-mannuronic and L-glucuronic acids in alginic acid by HPLC. **Food Hydrocolloids**, v. 5:6, p 559-561, 1987.
- CANILHA, L.; SILVA, D. D. V.; CARVALHO, W.; MANCILHA, I. M. Aditivos Alimentares produzidos por via fermentativa parte 3: Polissacarídeos e enzimas. **Revista Analytica**, v. 20, p 32-41, 2006.
- CARVALHO, H. H. **Alimentos: métodos físicos e químicos de análise**. Porto Alegre: Ed. Universidade / UFRGS, 2002.
- CHEN, W-P.; CHEN, J-Y.; CHANG, S-C.; SU, C-L. Bacterial alginate produced by a mutant of *Azotobacter vinelandii*. **Applied and environmental microbiology**, v. 49, p 543-546, 1985.
- CLEMENTI, F.; FANTOZZI, P.; MANCINI, F.; MORESI, M. Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. **Enzyme Microbial Technology**, v.17, p 983-988, 1995.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Polímeros microbianos de interesse comercial.....	32
Tabela 2 - Aplicações de alginatos produzidos comercialmente.....	44
Tabela 3 - Fatorial 2^2 onde: A - concentração do substrato (glicose, sacarose ou glicerol) em g.L^{-1} . B - concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1}	58
Tabela 4 - Planejamento composto central, onde A - Concentração de glicose em g.L^{-1} B - Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1}	58
Tabela 5 - Planejamento composto central, onde A - Concentração de sacarose em g.L^{-1} . B - Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1}	58
Tabela 6 - Planejamento composto central, onde A - Concentração de glicerol g.L^{-1} . B- Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1}	58
Tabela 7 - Dados obtidos nas culturas realizadas com glicose como fonte de carbono para a produção de alginato.....	73
Tabela 8 - Dados obtidos nas culturas realizadas com glicerol como fonte de carbono para a produção de alginato.....	76
Tabela 9 - Dados obtidos nas culturas realizadas com sacarose como fonte de substrato para a produção de alginato.....	78
Tabela 10 - Efeito do substrato na produção de alginato em frascos agitados.....	79
Tabela 11 - Valores dos índices estatísticos para o modelo Gompertz Modificado aplicado às curvas de crescimento de <i>Pseudomonas mendocina</i> em meios com glicose como fonte de carbono, onde S é a concentração de glicose g.L^{-1} e N é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1}	82
Tabela 12 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo modelo Gompertz Modificado aplicado às curvas de crescimento de <i>Pseudomonas mendocina</i> em meios com glicose em diferentes concentrações como fonte de carbono.....	83
Tabela 13 - Resumo dos dados obtidos nas culturas realizadas com glicose como fonte de substrato para a produção de alginato.....	83

Tabela 14 - Valores dos índices estatísticos para o modelo Gompertz Modificado aplicado às curvas de crescimento de <i>Pseudomonas mendocina</i> em meios com glicerol como fonte de carbono.	85
Tabela 15 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo modelo Gompertz Modificado aplicado às curvas de crescimento de <i>Pseudomonas mendocina</i> em meios com glicerol em diferentes concentrações como fonte de carbono.	85
Tabela 16 - Resumo dos dados obtidos nas culturas realizadas com glicerol como fonte de substrato para a produção de alginato.	86
Tabela 17 - Valores dos índices estatísticos para o modelo Gompertz Modificado aplicado às curvas de crescimento de <i>Pseudomonas mendocina</i> em meios com sacarose como fonte de carbono. onde S é a concentração de sacarose g.L ⁻¹ e N é a concentração de (NH ₄) ₂ SO ₄ em g.L ⁻¹	88
Tabela 18 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo modelo Gompertz Modificado aplicado às curvas de crescimento de <i>Pseudomonas mendocina</i> em meios com sacarose em diferentes concentrações como fonte de carbono.	88
Tabela 19 - Resumo dos dados obtidos nas culturas realizadas com sacarose como fonte de carbono para a produção de alginato.	89
Tabela 20 - Planejamento fatorial 2 ² para produção de alginato a partir de glicose por <i>Pseudomonas mendocina</i>	90
Tabela 21 - Planejamento Composto Central, para produção de alginato a partir de glicose por <i>Pseudomonas mendocina</i>	94
Tabela 22 - Planejamento fatorial 2 ² para produção de alginato a partir de glicerol por <i>Pseudomonas mendocina</i>	97
Tabela 23 - Planejamento composto central, para produção de alginato a partir de glicerol por <i>Pseudomonas mendocina</i>	101
Tabela 24 - Planejamento fatorial 2 ² para produção de alginato a partir de sacarose por <i>Pseudomonas mendocina</i>	103
Tabela 25 - Planejamento composto central, para produção de alginato a partir de sacarose por <i>Pseudomonas mendocina</i> , onde A (g.L ⁻¹) representa a concentração de sacarose, B (g.L ⁻¹) representa a concentração de (NH ₄) ₂ SO ₄ em g.L ⁻¹ e P é a produtividade em g.L ⁻¹ h ⁻¹ . Tempo de cultivo: 48 h.	107

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados apresentados é possível fazer algumas sugestões de estudos:

- Estudo da cinética de crescimento do micro-organismo e da biossíntese do alginato utilizando glicerol como substrato;
- Estudo da influência de outras variáveis importantes no processo, como, agitação, aeração e concentração de íons cálcio.
- Ampliação de escala para biorreator;
- Testar metodologias para recuperação e purificação do alginato;
- Análise do peso molecular e grau de acetilação do alginato formado em diferentes condições de cultivo.
- Caracterizar reologicamente as soluções aquosas do biopolímero;
- Estudo da viabilidade econômica da produção de alginato a partir de diferentes fontes de carbono.

glicerol e 0,7 g.L-1 de sulfato de amônio. A produtividade obtida nessa condição foi 0,23 g.L-1h-1.

- A condição maximizada para a produção de alginato sintetizado por *Pseudomonas mendocina*, a partir de sacarose, dentro das condições estudadas foi 80 g.L-1 de sacarose e 0,7 de sulfato de amônio. A produtividade obtida nessa condição foi 0,42 g.L-1h-1.
- Nas condições otimizadas utilizadas neste trabalho, a sacarose apresentou a maior produtividade (0,42 g.L-1h-1) para a síntese de alginato por *Pseudomonas mendocina*.

Em relação à caracterização:

- Através da técnica de espectroscopia de ressonância magnética (1HNMR) pode-se verificar que o alginato sintetizado por *Pseudomonas mendocina* só possui blocos M.
- Os meios de cultura estudados apresentaram comportamento pseudoplástico.
- Meios de cultivo onde foi utilizada sacarose como substrato apresentaram uma viscosidade aparente maior para as mesmas taxas de deformação aplicadas em relação aos meios onde foi utilizado glicose e glicerol.
- Para os meios onde foi utilizada sacarose foram também observados os maiores índices de consistência.

Tabela 26 - Resultados apresentados na literatura para concentração de alginato e produtividade..... 110

Tabela 27 - Parâmetros de ajuste do modelo de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) para ensaios utilizando glicose como substrato, onde n é o índice de fluxo e K é o índice de consistência (mPaⁿ)..... 113

Tabela 28 - Parâmetros de ajuste do modelo de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) para ensaios utilizando sacarose como substrato..... 114

Tabela 29 - Parâmetros de ajuste do modelo de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) para ensaios utilizando glicerol como substrato..... 116

5 CONCLUSÕES

Em relação ao acompanhamento da síntese do biopolímero:

- Nas condições estudadas, o aumento da temperatura (de 30 °C para 35 °C) não favoreceu a produção de alginato e prolongou o tempo de cultivo.
- Nos experimentos utilizando glicose como substrato foi obtido o menor tempo para que todo o substrato fosse consumido. Ensaio utilizando glicerol necessita de um tempo superior, aproximadamente 144 horas (com concentração inicial de substrato de 20 g.L⁻¹), para o total consumo do substrato presente.
- Nas condições estudadas, em um período de 48 horas, uma maior concentração de biopolímero foi encontrada para experimentos utilizando sacarose como substrato em uma concentração de 80 g.L⁻¹, resultando em uma concentração de 19,36 g.L⁻¹ de alginato no meio de cultura.
- Diferentes concentrações de substrato e de nitrogênio e a utilização de diferentes substratos não influenciaram no aumento da biomassa.
- Não houve influência do substrato utilizado na velocidade específica máxima de crescimento e nem na duração da fase lag, que variou de 1,20 a 2,60 horas. .

Em relação ao conjunto de experimentos do planejamento experimental:

- O aumento da concentração de sulfato de amônio na primeira etapa do planejamento fatorial diminuiu significativamente a produtividade e o fator de bioconversão do processo, para todos os substratos utilizados.
- A condição maximizada para a produção de alginato sintetizado por *Pseudomonas mendocina*, a partir de glicose, dentro das condições estudadas foi 100 g.L⁻¹ de glicose e 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de amônio. A produtividade obtida nessa condição foi 0,33 g.L⁻¹h⁻¹.
- A condição maximizada para a produção de alginato sintetizado por *Pseudomonas mendocina*, a partir de glicerol, dentro das condições estudadas foi 40 g.L⁻¹ de

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	23
1 INTRODUÇÃO	25
CAPÍTULO II.....	27
REVISÃO DA LITERATURA	27
2 REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1 POLISSACARÍDEOS.....	29
2.1.1 Exopolissacarídeos	33
2.1.2 Micro-organismos produtores de EPS.....	34
2.1.3 Biossíntese de polissacarídeos.....	34
2.2 ALGINATO - CARACTERÍSTICAS GERAIS	37
2.2.1 Estrutura Química	38
2.2.2 Aplicações do alginato	41
2.3 RECUPERAÇÃO DO BIOPOLÍMERO.....	44
2.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BIOPOLÍMERO	46
2.4.1 Caracterização Reológica.....	48
2.4.2 Viscoelasticidade.....	52
CAPÍTULO III MATERIAL E MÉTODOS	53
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1 MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO.....	55
3.2 MEIOS DE CULTURA	55
3.3 CULTIVOS	56
3.3.1 Culturas em frascos agitados.....	56
3.3.2 Curva de crescimento do micro-organismo na pré-cultura.	56
3.3.3 Experimentos para produção de alginato	56
3.3.3.1 Ensaios iniciais.....	56
3.3.4 Planejamento Experimental.....	57
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	59
3.4.1 Determinação da concentração de biomassa	59
3.4.1.1 Modelagem do crescimento microbiano	59
3.4.1.1.1 Modelo de Gompertz Modificado	59
3.4.1.1.2 Modelo Logístico	60

3.4.1.1.3 Modelo Logístico Modificado.....	60
3.4.1.1.4 Modelo de Baranyi.....	61
3.4.2 Determinação do consumo de substrato.....	62
3.4.2.1 Determinação do consumo de glicose.....	62
3.4.2.2 Determinação do consumo de sacarose.....	63
3.4.2.3 Determinação do consumo de glicerol.....	63
3.4.3 Determinação da concentração do biopolímero.....	63
3.4.4 pH.....	64
3.4.5 Cálculo da Produtividade de Biopolímero.....	64
3.4.6 Fator de conversão.....	64
3.4.7 Caracterização Reológica do biopolímero.....	65
3.4.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nucler (NMR).....	65

CAPÍTULO IV RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 67

4 RESULTADOS.....	69
4.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES.....	69
4.1.1 Curva de crescimento do micro-organismo.....	69
4.1.2 Ensaio iniciais para meio com glicose, glicerol e sacarose.....	70
4.1.2.1 Ensaio utilizando glicose como substrato.....	70
4.1.2.2 Ensaio utilizando glicerol como substrato.....	73
4.1.2.3 Ensaio utilizando sacarose como fonte de carbono.....	76
4.2 ACOMPANHAMENTO DA SÍNTESE DO BIOPOLÍMERO.....	80
4.2.1 Ensaio utilizando glicose como substrato.....	80
4.2.2 Ensaio utilizando glicerol como substrato.....	83
4.2.3 Ensaio utilizando sacarose como substrato.....	86
4.3 AVALIAÇÃO DE SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE ALGINATO UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	89
4.3.1 Ensaio utilizando glicose como substrato.....	90
4.3.1.1 Primeira etapa: Fatorial completo 2 ²	90
4.3.1.2 Segunda etapa: Planejamento Fatorial Composto Central.....	94
4.3.2 Ensaio utilizando glicerol como substrato.....	97
4.3.2.1 Primeira etapa: Fatorial completo 2 ²	97
4.3.2.2 Segunda etapa: Planejamento Composto Central.....	100
4.3.3 Ensaio utilizando sacarose como substrato.....	103
4.3.3.1 Primeira etapa: Fatorial completo 2 ²	103
4.3.3.2 Segunda etapa: Planejamento Composto Central.....	107
4.4 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA.....	110
4.4.1 Ensaio reológicos para meios utilizando glicose como substrato	111

**CAPÍTULO V
CONCLUSÕES E SUGESTÕES**

4.4.2 Ensaio reológico para meios utilizando sacarose como substrato	113
4.4.3 Ensaio reológico para meios utilizando glicerol como substrato	115
4.4.4 Avaliação dos resultados	116
4.5 CARACTERIZAÇÃO POR ¹ H-NMR	118
CAPÍTULO V CONCLUSÕES E SUGESTÕES	121
5 CONCLUSÕES	123
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	125
REFERÊNCIAS	127
ANEXOS	135
ANEXO A - Curva de calibração para determinação da concentração	135
ANEXO B - ANOVA	137

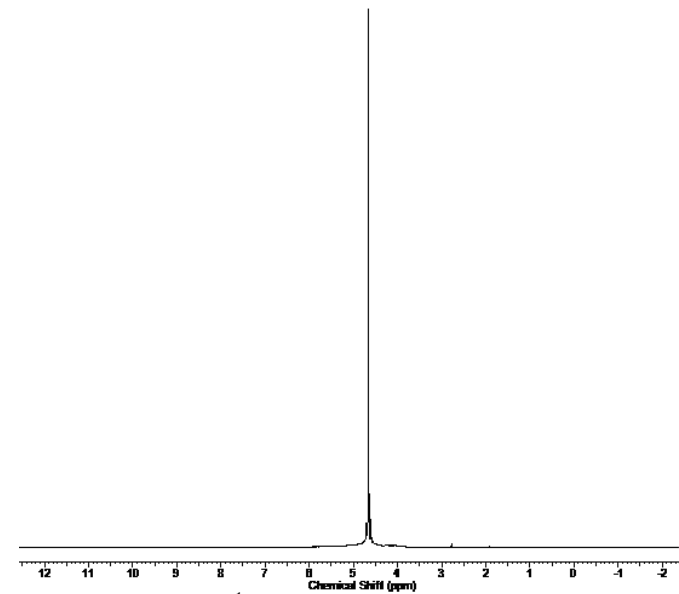


Figura 43- Análise de ^1H NMR de amostras de alginato sintetizado por *Pseudomonas mendocina*.
O espectro foi programado na frequência de 400 MHz e 80°C em D₂O.

glicose e glicerol em tubos de ensaios contendo o meio de cultura ao final do cultivo em temperatura de 30°C.

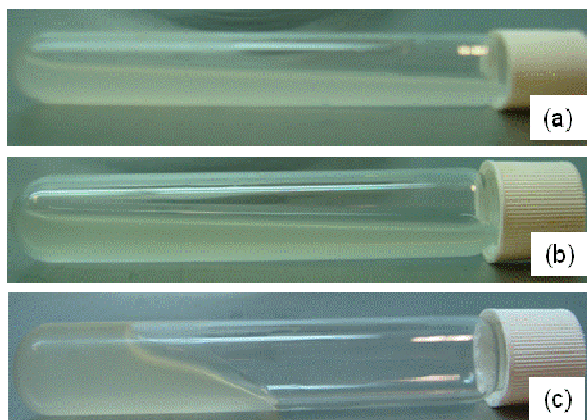


Figura 42 - Tubos de ensaios contendo o meio de cultura ao final de 48 horas de cultivo.

Na concentração de 40 g.L⁻¹ de substrato a) para glicose, b) para glicerol e c) para sacarose.

4.5 CARACTERIZAÇÃO POR ¹H_NMR

Resíduos de ácidos manurônicos e gulurônicos são facilmente distinguíveis pelo deslocamento químico do próton do carbono anomérico. Na Figura 43 está apresentado o resultado obtido para análise de ¹HNMR de uma amostra de alginato sintetizado por *Pseudomonas mendocina*. O espectro foi programado na frequência de 400 MHz e 80 °C em D₂O. Para essa análise foi utilizada amostra de alginato utilizando meio padrão descrito no item 3.2, o substrato utilizado foi glicose, em uma concentração de 20 g.L⁻¹.

De acordo com Gimmetstad et al. (2006) e Jerga et al. (2006), na região de 4.7 ppm observa-se os hidrogênios referentes aos blocos M, o que permite concluir que a amostra analisada contém somente blocos homopoliméricos de resíduos manurônicos. Confirmando que *Pseudomonas mendocina* não sintetiza sequências de resíduos gulurônicos (blocos G), como descrito por Skajak-Braek et al. (1986).

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

substratos avaliados.

Como se pode observar nas curvas de viscosidade aparente, todos os meios de cultura apresentaram comportamento pseudoplástico, ou seja, as viscosidades aparentes em todas as concentrações analisadas decresceram de maneira substancial com o aumento da taxa de deformação.

As curvas de viscosidade aparente dos meios de cultura apresentaram diferentes comportamentos para as diferentes fontes de carbono utilizadas indicando uma influência da concentração e do substrato utilizado nas características reológicas do meio, provavelmente devido a mudanças estruturais da molécula e no peso molecular do biopolímero. Para confirmar essa hipótese é necessário uma análise do peso molecular e do grau de acetilação do alginato formado em diferentes substrato e em diferentes concentrações.

Na Figura 41 é apresentada uma comparação entre as curvas de viscosidade aparente *versus* a taxa de deformação para os diferentes substratos estudados em uma concentração inicial de substrato de 40 g.L⁻¹ e temperatura de 30°C. Observam-se valores de viscosidade aparente acentuadamente maiores em ensaios utilizando sacarose como fonte de carbono. Em ensaios utilizando sacarose foram constatado maiores rendimentos.

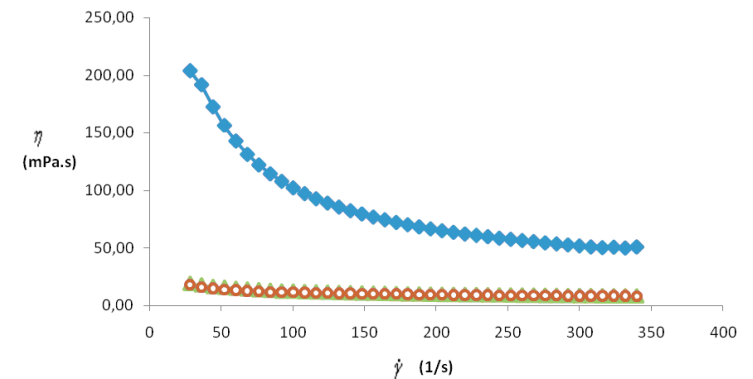


Figura 41 - Viscosidade aparente (η) vs taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) para os substratos —●— sacarose, —○— glicerol e —▲— glicose, nas concentrações iniciais de substrato de 40 g.L⁻¹, a 30°C.

Na Figura 42 pode-se observar a diferença entre a viscosidade do meio de cultura utilizando sacarose como substrato de meios utilizando

concentrações também foi observado maiores valores do índice de consistência (K). Para o meio com concentração inicial de glicerol de 20 g.L⁻¹ o índice de consistência diminuiu com o aumento da temperatura. Os valores do índice de fluxo foram próximos para todas as concentrações estudadas e foram independentes da temperatura.

Meios com concentrações iniciais de 40 g.L⁻¹ e 80 g.L⁻¹ de glicerol, ao final do cultivo ainda apresentaram grande quantidade de substrato presente, o que pode justificar essa queda na viscosidade devido a interações moleculares e afinidades entre soluto e solvente. Para confirmação dessa hipótese é necessário a análise reológica da solução do biopolímero purificada e um estudo das interações moleculares envolvidas.

Tabela 29 - Parâmetros de ajuste do modelo de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) para ensaios utilizando glicerol como substrato.

Concentração de Glicerol (g.L ⁻¹)	Concentração de Biopolímero (g.L ⁻¹)	T = 30°C		T = 60°C	
		N	K (mPa ⁿ)	n	K (mPa ⁿ)
20	11,74 ± 1,07	0,65	106,90	0,62	83,95
40	10,32 ± 0,76	0,70	45,50	0,62	44,46
80	8,19 ± 0,53	0,58	20,99	0,68	21,13

Onde n é o índice de fluxo e K é o índice de consistência (mPaⁿ).

4.4.4 Avaliação dos resultados

O comportamento reológico do alginato em soluções aquosas depende tanto do peso molecular (influenciado pelo comprimento da cadeia do polímero) quanto da proporção e arranjo das unidades monoméricas (SIME, 1990 apud MANCINI et al., 1995).

A influência dos constituintes do meio também pode ter influenciado no comportamento reológico do meio de cultivo e nos valores dos índices de consistência e índice de fluxo. Uma análise das características reológicas do biopolímero formado submetido a processos de separação e purificação é necessária para confirmação dessas hipóteses.

O aumento da viscosidade aparente e o afastamento do comportamento newtoniano estão associados principalmente ao acúmulo de EPS no meio de cultura. O que foi observado para todos os

1 INTRODUÇÃO

Biopolímeros são biomoléculas produzidas por seres vivos. Celulose, amido, quitina, proteínas, peptídeos, DNA e RNA são exemplos de biopolímeros. As unidades monoméricas podem ser açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e outras. Dentre os biopolímeros mais estudados podem-se destacar os polissacarídeos com capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso. Podem ser de origem vegetal, como os exsudados de árvores, extraídos de sementes, algas marinhas ou de frutas, ou ainda serem produzidos por micro-organismos.

A produção em escala industrial ainda se concentra em produtos de origem vegetal, como goma arábica, goma guar e alginatos obtidos de algas marinhas. Os biopolímeros têm uma extensa aplicação em indústria química, farmacêutica, biomédica e alimentos. Dextrana, xantana e gelana, são exemplos de polissacarídeos microbianos que já são produzidos industrialmente e ocupam uma extensa faixa comercial no mercado de gomas. Para se tornarem comercialmente atrativos, os polissacarídeos microbianos devem possuir propriedades que os destaquem em relação aos polissacarídeos de origem vegetal.

O alginato é um polissacarídeo existente na parede celular de algas marinhas marrons (*Phaeophyceae*) e que também pode ser sintetizado por *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas* spp. O alginato microbiano difere do alginato obtido de algas marinhas apenas por ser acetilado.

As aplicações do alginato microbiano podem ser as mesmas do alginato extraído de algas, como, por exemplo, na indústria de alimentos, pode ser utilizado como gelificante, emulsificante, estabilizante e espessante. Em molhos para salada para evitar a separação de fases, em sorvetes, para prevenir a cristalização e garantir a homogeneidade, como “agente de corpo” para formulação de produtos de baixa caloria. Como “análogos de frutas ou produtos tipo imitação”, como por exemplo, cerejas artificiais. Ainda pode ser utilizado como agente de encapsulação e na formulação de curativos interativos, na indústria farmacêutica. Como ingrediente em pastas de impressão têxtil, detergentes e shampoos na indústria química.

Estudos já avaliaram a utilização do alginato bacteriano como agente gelificante para imobilização de células vivas, como por exemplo, imobilização de células produtoras de insulina em cápsulas de alginato para serem implantadas em portadores de diabetes tipo I.

Também, na manufatura de pele artificial com melhores propriedades cicatrizantes.

O Alginato bacteriano pode ser produzido para fins específicos, com uma melhora nas suas propriedades qualitativas permitindo novas aplicações deste polímero no mercado.

O destaque para a produção de alginato por *Pseudomonas mendocina* deve-se ao fato da bactéria não apresentar patogenicidade a humanos, ao contrário do que ocorre com a *Pseudomonas aeruginosa* e também, por não precisar de um controle tão rigoroso de processo como *Azotobacter vinelandii*. Sendo as duas últimas bactérias também produtoras de alginato.

Considerando a escassez de informações na literatura científica sobre a produção de alginato por *Pseudomonas mendocina*, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a produção de alginato por este micro-organismo, em diferentes substratos.

Os objetivos específicos foram:

- Produzir alginato utilizando como fonte de carbono glicose, glicerol e sacarose em diferentes concentrações variando também a concentração de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄).
- Avaliar o efeito das variáveis independentes concentração de substrato e nitrogênio, no fator de bioconversão e produtividade através de Planejamentos Fatoriais e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)
- Analisar as propriedades reológicas de viscosidade aparente do meio de produção do alginato
- Caracterizar o material quanto à composição química através da técnica de Espectroscopia por Ressonância Magnética.

4.4.3 Ensaios reológicos para meios utilizando glicerol como substrato

A Figura 40 apresenta as curvas de viscosidade aparente *versus* a taxa de deformação para meios de cultura com concentrações iniciais de 80, 40 e 20 g.L⁻¹ de glicerol, a 30 °C (a) e 60 °C (b).

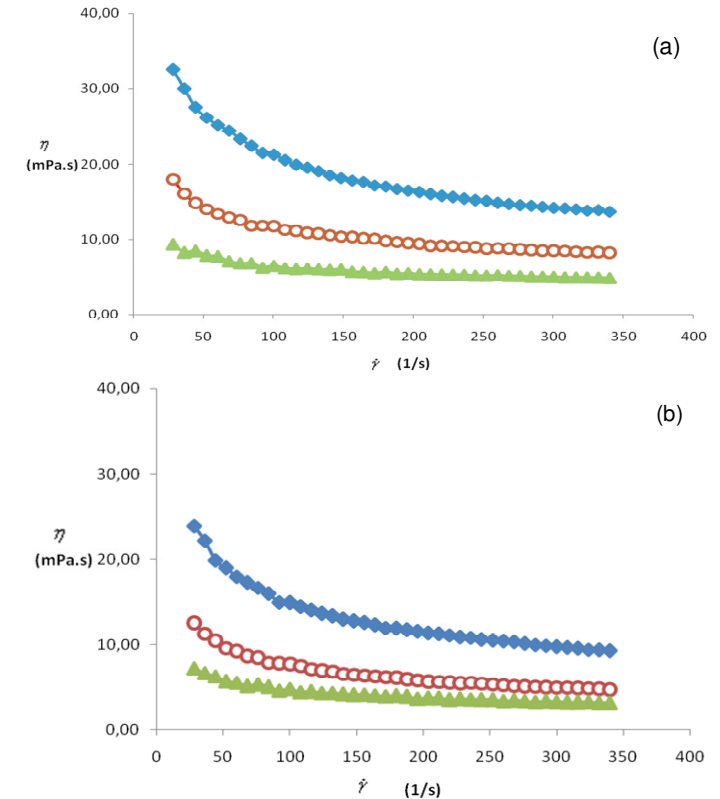


Figura 40 - Viscosidade aparente (η) vs taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) para os meios de cultivo após 48 horas.

Concentração inicial de glicerol (S_0) e concentração final de biopolímero (C): ◆ $S_0=20$ g.L⁻¹ e C = 11,74 g.L⁻¹, ○ $S_0=40$ g.L⁻¹ e C = 10,32 g.L⁻¹ e ▲ $S_0=80$ g.L⁻¹ e C= 8,19 g.L⁻¹ a 30°C (a) e 60°C(b).

Valores acentuadamente maiores de viscosidade aparente foram encontrados para meios de cultivo utilizando concentrações iniciais de 20 g.L⁻¹ de glicerol o qual também apresentou uma maior concentração de biopolímero ao final do processo (11,74 g.L⁻¹). Para essas

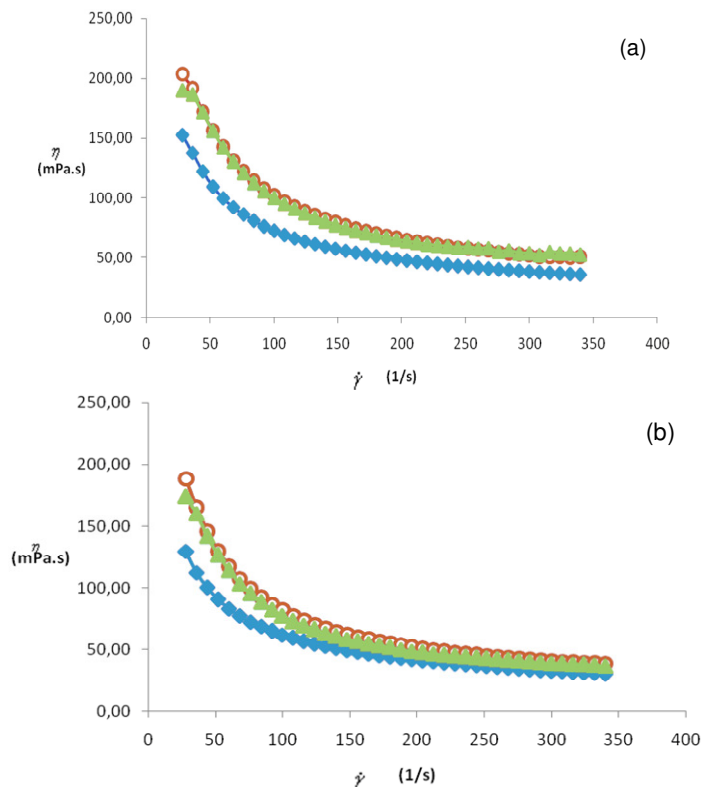


Figura 39 - Viscosidade aparente (η) vs taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) para os meios de cultivo após 48 horas.

Concentração inicial de sacarose (S_0) e concentração final de biopolímero (C): \blacklozenge $S_0=20$ g.L^{-1} e $C = 7,50 \text{ g.L}^{-1}$, \circ $S_0=40 \text{ g.L}^{-1}$ e $C = 12,91 \text{ g.L}^{-1}$ e \blacktriangle $S_0= 80 \text{ g.L}^{-1}$ e $C= 19,36 \text{ g.L}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (a) e $60 \text{ }^\circ\text{C}$ (b).

CAPÍTULO II REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 28 - Parâmetros de ajuste do modelo de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) para ensaios utilizando sacarose como substrato.

Concentração de Sacarose (g.L^{-1})	Concentração de biopolímero (g.L^{-1})	$T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$		$T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$	
		n	K (mPa^n)	n	K (mPa^n)
20	$7,50 \pm 0,64$	0,41	1116,8	0,42	885,11
40	$12,91 \pm 2,01$	0,39	1659,6	0,35	1629,3
80	$19,36 \pm 1,11$	0,42	1472,3	0,35	1592,2

Onde n é o índice de fluxo e K é o índice de consistência (mPa^n).

Tabela 27 - Parâmetros de ajuste do modelo de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) para ensaios utilizando glicose como substrato, onde n é o índice de fluxo e K é o índice de consistência (mPa^n).

Concentração de Glicose (g.L^{-1})	Concentração do Biopolímero (g.L^{-1})	$T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$		$T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$	
		n	K (mPa^n)	n	K (mPa^n)
20	$9,50 \pm 0,98$	0,57	202,8	0,56	130,32
40	$11,26 \pm 0,25$	0,66	59,02	0,65	35,97
80	$14,56 \pm 0,59$	0,61	90,99	0,58	87,90

4.4.2 Ensaios reológicos para meios utilizando sacarose como substrato

As curvas de viscosidade aparente *versus* taxa de deformação para meios de cultura onde foi utilizada sacarose como substrato nas concentrações iniciais de 80, 40 e 20 g.L^{-1} estão apresentadas na Figura 39 a) para temperatura de 30 °C e b) para temperatura de 60 °C.

Pode-se observar que quanto maior a concentração de biopolímero no meio, maior foram os valores de viscosidade aparente, e na temperatura de 60 °C menores valores de viscosidade aparente foram encontrados, características típicas de soluções poliméricas. O índice de consistência (K) para ensaios utilizando sacarose como substrato foram consideravelmente maiores do que em ensaios com glicose ou glicerol, como pode se observar na Tabela 28. Para concentrações iniciais de substrato de 20 g.L^{-1} o índice de consistência diminuiu com o aumento da temperatura. O índice de consistência também foi maior para meios com concentrações iniciais de sacarose de 40 e 80 g.L^{-1} , os quais também apresentaram maiores concentrações de biopolímero no meio (12,91 e 19,36 g.L^{-1} , respectivamente). Não houve diferença nos valores do índice de fluxo (n) para os diferentes meios de cultura utilizando sacarose como substrato.

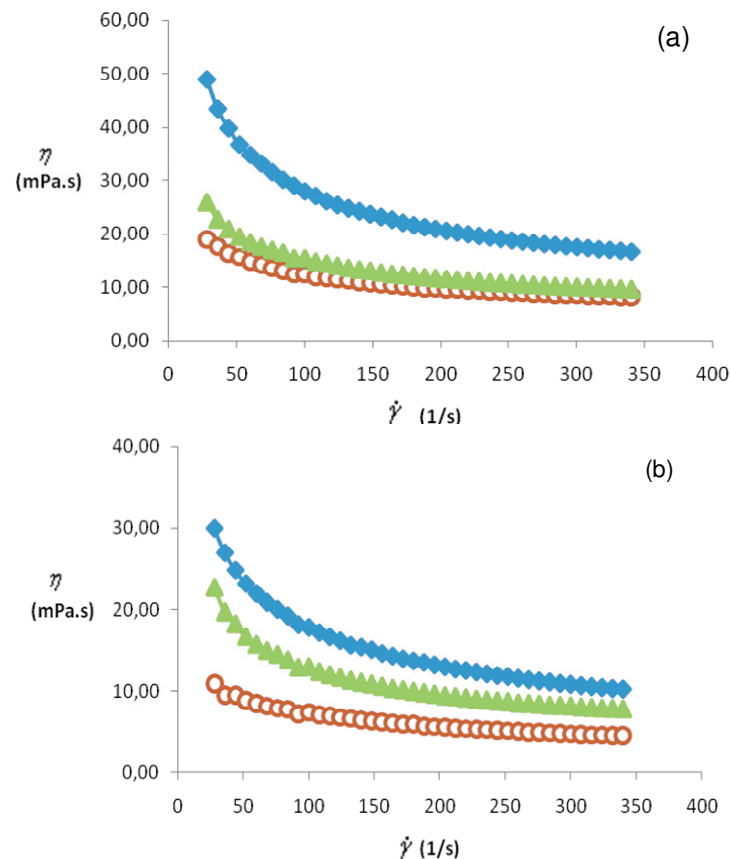


Figura 38 - Viscosidade aparente (η) vs taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) para os meios de cultivo após 48 horas.

Concentração inicial de glicose (S_0) e concentração final de biopolímero (C): ◆ $S_0=20$ g.L⁻¹ e $C = 9,50$ g.L⁻¹, ○ $S_0=40$ g.L⁻¹ e $C = 11,26$ g.L⁻¹ e ▲ $S_0= 80$ g.L⁻¹ e $C= 14,56$ g.L⁻¹ a 30 °C(a) e 60 °C (b).

A viscosidade do alginato é uma função da composição do biopolímero e da presença ou ausência de íons metálicos (GIMMESTAD et al., 2006). O peso molecular do biopolímero e o grau de acetilação também afetam consideravelmente as características reológicas do meio, podendo também ser a causa dessas diferenças encontradas na viscosidade do meio de cultura.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 POLISSACARÍDEOS

Os biopolímeros podem ser compostos por aminoácidos, nucleotídeos, ou açúcares. Os biopolímeros, cujas unidades monoméricas são monossacarídeos, são frequentemente chamados de polissacarídeos. Os polissacarídeos apresentam alto peso molecular entre 25 kDa a 15000kDa (SUN, 2004).

Os polissacarídeos hidrossolúveis que podem ser obtidos de plantas, algas marinhas e fontes microbianas são chamados de “hidrocolóides ou gomas” (DICKINSON, 2003). As gomas de origem vegetal são obtidas de exsudados de árvores (gomas arábica e karaya), de sementes (gomas guar e locusta) e de frutas cítricas (pectina), enquanto as de origem marinha são obtidas de algas (alginato, ágar e carragena), e as de origem microbiana são produzidas por micro-organismos a partir de cultivo com substratos carbônicos (xantana, curdlana e levana) (ERNANDES, 2005).

Polissacarídeos produzidos por micro-organismos, têm a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso (MOREIRA, 2005). Vários micro-organismos possuem a habilidade de sintetizar polissacarídeos a partir de substratos orgânicos simples ou complexos. Embora a composição destes polissacarídeos possa ser limitada a um número pequeno de monossacarídeos e outros componentes como fosfato, piruvato e acetato, uma extensa faixa de propriedades físicas é encontrada (SANDFORD, 1979).

A produção e uso industrial de polissacarídeos baseavam-se até recentemente em produtos de origem vegetal e de algas marinhas. Esses produtos tradicionais, tais como amido, alginatos, goma arábica, goma guar e goma de algaroba são largamente empregados nas indústrias de alimentos, farmacêutica e química (MAUGERI, 2001).

A indústria de alimentos é uma das principais consumidoras de polissacarídeos sendo estes aplicados primordialmente como espessantes ou agentes de suspensão e gelificantes. Os polissacarídeos são, no entanto, importantes também pelos seus efeitos secundários, que incluem emulsificação, estabilização de emulsões, controle de cristalização, inibição da sinérese, encapsulação e formação de filmes (MAUGERI, 2001).

Muitos micro-organismos produzem grandes quantidades de polissacarídeos sob uma ampla variação de condições. Os

polissacarídeos apresentam papéis específicos como compostos de armazenamento como, por exemplo, o glicogênio, compostos estruturais, como a quitina ou, no caso de polissacarídeos produzidos extracelularmente, como mediadores de interações entre o micro-organismo e o ambiente. Algumas funções possíveis dos exopolissacarídeos incluem (PACE, 1991):

- Proteção do micro-organismo contra desidratação;
- Formação de barreira impedindo que vírus e anticorpos se liguem a sítios específicos sobre a parede celular;
- Ligação e neutralização de toxinas carregadas ou íons metálicos tóxicos;
- Atuação como uma fonte de carbono e energia;
- Conversão do excesso de substrato em uma massa espumosa que é muito mais fácil ser metabolizada por outros micro-organismos;
- Interação com células de animais ou plantas em relações específicas, simbióticas ou patogênicas.

Os polissacarídeos obtidos de micro-organismos são uma alternativa válida, pois possuem propriedades similares aos tradicionais e, em alguns casos mais vantajosos, por possuírem propriedades específicas que o qualificam para o desenvolvimento de novos produtos (MAUGERI, 2001).

A produção de polímeros para uso comercial por bioprocessos comparada com a extração de plantas e algas, ou síntese química, oferece várias vantagens potenciais que incluem (PACE, 1991):

- Ampla diversidade de polímeros produzidos por micro-organismos;
- A produção de gomas em quantidade segura e qualidade relativamente independente das condições climáticas, conduzindo cultivos bem controlados e produtos de qualidade constante;
- A manipulação da composição do produto e suas propriedades por alterações nas condições de cultivo;
- Como muitos polissacarídeos microbianos são extracelulares, as severas técnicas utilizadas na extração de resinas de plantas e algas podem ser evitadas, diminuindo assim, a degradação do produto durante a recuperação.

As gomas microbianas têm como principal desvantagem o seu elevado custo. Isso se deve aos processos de produção que são

temperatura utilizada para os cultivos, e a 60 °C, uma vez que nas etapas seguintes de separação do biopolímero ele poderá ser submetido a tratamentos térmicos para pasteurizar o meio de cultura ou mesmo para facilitar a separação de células por centrifugação.

4.4.1 Ensaios reológicos para meios utilizando glicose como substrato

A Figura 38 a, exibe as curvas de viscosidade aparente *versus* a taxa de deformação, para meios de cultura cujas concentrações iniciais de glicose foram 80, 40 e 20 g.L⁻¹, as análises foram realizadas a T = 30 °C.

A Figura 38 b, exibe as curvas da viscosidade aparente *versus* a taxa de deformação para meios cuja concentração inicial foi de 80, 40 e 20 g.L⁻¹ de glicose, em temperaturas de 60 °C. Confirmado que a viscosidade aparente do meio de cultura diminui com o aumento da temperatura.

Pode-se observar que meios com concentrações iniciais de glicose de 20 g.L⁻¹ formaram meios mais viscosos, apresentando índices de consistência (K) maiores mesmo com uma concentração menor de biopolímero no meio (9,50 g.L⁻¹). O valor do índice de fluxo para esta concentração também foi menor, caracterizando um fluido com comportamento mais pseudoplástico (Tabela 27). Para meios com concentrações iniciais de 40 g.L⁻¹ e 80 g.L⁻¹ de glicose, as viscosidades foram mais próximas, e as concentrações de biopolímero no meio foram 11,26 g.L⁻¹ e 14,56 g.L⁻¹ respectivamente. Como pode-se observar nos itens 4.3.1 e 4.1.2.1, ao final de 48 horas, para meios com 20 g.L⁻¹ e 40 g.L⁻¹ de glicose todo o substrato já havia sido consumido, já para meios com 80 g.L⁻¹ ainda havia uma quantidade residual de glicose que pode ter influenciado nessa diminuição da viscosidade, por interações químicas e afinidade entre as moléculas. Para meios com concentrações iniciais de glicose de 20 e 40 g.L⁻¹ observa-se que o índice de consistência diminuiu com o aumento da temperatura.

Tabela 26 - Resultados apresentados na literatura para concentração de alginato e produtividade.

Micro-organismo	Substrato	[S] (g.L ⁻¹)	[P] (g.L ⁻¹)	Tempo (h)	Produtividade (g.L ⁻¹ h ⁻¹)	Processo
<i>P. mendocina</i> ¹	Glicose	100	15,84	48	0,33	FA
<i>P. mendocina</i> ¹	Sacarose	80	20,16	48	0,42	FA
<i>P. mendocina</i> ¹	Glicerol	40	11,04	48	0,23	FA
<i>P. mendocina</i> ²	Glicose	20	12,69	24	0,53	FA
<i>P. mendocina</i> ²	Glicose	20	8,95	22	0,41	FB
<i>P. mendocina</i> ³	Glicose	20	7,14	15	0,48	FB
<i>P. mendocina</i> ⁴	Glicose	50	20	45	0,44	FB
<i>P. putida</i> ⁵	Glicose	20	2,2	50	0,04	FA
<i>A. Vinelandii</i> ⁶	Sacarose	20	6,22	110	0,06	FA
<i>A. Vinelandii</i> ⁷	Sacarose	20	5,60	90	0,06	FA
<i>A. Vinelandii</i> ⁸	Sacarose	40	3,00	70	0,04	FB
<i>A. Vinelandii</i> ⁹	Sacarose	10	1,50	120	0,01	FA

FA: frascos agitados; FB: Cultivo Batelada.

1- Este Trabalho 2- MÜLLER, 1997 3-MÜLLER & MONTE ALEGRE (1993) 4- SENGHA et al. (1989) 5- CONTI et al. (1994) 6- CHEN et al. (1985) 7- HORAN et al. (1981) 8- JARMAN et al. (1978) 9- OKABE et al. (1981)

Considerando os resultados apresentados na Tabela 27, observa-se que neste trabalho foram obtidas produtividades próximas as obtidas em outros estudos com *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato.

4.4 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA

Uma das principais características exibidas pelos polissacarídeos é sua habilidade de modificar o comportamento reológico de soluções. Esta variação está relacionada principalmente com a composição química, arranjo e/ ou ligação molecular e peso molecular médio do biopolímero.

As medidas reológicas foram realizadas com amostras dos três meios de cultura coletadas ao final do cultivo limitado em 48 horas.

Para confirmação do comportamento pseudoplástico das soluções, foi realizado o ajuste ao modelo de Ostwald - de -Waele ($\sigma = K\gamma^n$) dos dados experimentais, obtendo-se os valores de K (índice de consistência) e n (índice de fluxo). Para n = 1, essa equação se reduz à lei da viscosidade de Newton com $K = \mu$. Assim, o desvio de “n” da unidade indica o grau de desvio do comportamento newtoniano, sendo que, se n < 1 o comportamento é pseudoplástico e, se n > 1, dilatante.

As avaliações foram realizadas em duas temperaturas, a 30 °C,

intensivos em capital e energia. Até o momento, dextrana e xantana são, praticamente, os únicos polissacarídeos microbianos comercializados em larga escala, dividindo fatias importantes do mercado de gomas. Desde 1969, o terceiro polissacarídeo produzido comercialmente por biossíntese microbiana tem sido a goma gelana, que obteve aprovação do FDA (“Food and Drugs Administration”) dos EUA, em 1990, para uso em alimentos. (MAUGERI, 2001).

Em vista de seu alto custo, o polissacarídeo microbiano deve se destacar em relação aos outros por propriedades que o tornam comercialmente atrativo. Incluem-se entre essas propriedades uma alta viscosidade, maior poder gelificante, compatibilidade com uma grande variedade de sais numa ampla faixa de pH e temperatura, alta solubilidade em água e ação sinérgica com outros polissacarídeos. Além disso, o mercado mundial encontra-se desprovido de oferta de produto adequados às novas tendências do moderno processamento de alimentos, tais como alimentos de baixo teor calórico, cozimento por micro-ondas, irradiação, aquecimento ôhmico, tratamento com ultrassom, etc (MAUGERI, 2001).

São conhecidas várias fontes microbianas para uma numerosa quantidade de polissacarídeos. Alguns destes polissacarídeos são comparáveis a produtos extraídos de plantas como amido, celulose e alginato, outros são similares a produtos de origem animal como o glicogênio, quitina e ácido hialurônico. Sua produção apresenta-se como uma alternativa válida, seja através do desenvolvimento de produtos com propriedades idênticas às gomas usadas atualmente ou de materiais com melhores características reológicas (SUTHERLAND, 1986).

Os polissacarídeos podem ser classificados em duas classes principais: agentes de viscosidade (como, por exemplo, goma xantana) e agentes geleificantes (como, por exemplo, goma gelana e alginato). Uma terceira categoria inclui polissacarídeos, cujas aplicações são bem específicas como dextrana clínica e polissacarídeos para obter açúcares raros (MAUGERI, 2001).

Alguns polissacarídeos de origem microbiana encontram aplicações comerciais dentro de faixas de mercado bem específicas. São os casos da dextrana, muito utilizada na indústria farmacêutica, e da pululana, com potencial para uso como plástico biodegradável (MAUGERI, 2001).

A inclusão dos polissacarídeos microbianos no mercado de polímeros solúveis em água tem sido lenta, devido ao alto custo e energia que tendem a deixar os polímeros microbianos menos eficazes economicamente quando comparados aos demais polímeros solúveis em

água. O custo e o tempo necessário para se obter a aprovação do uso de novos polímeros em alimentos é também muito alto. Além do mais, a busca e a seleção de novas gomas de interesse comercial são difíceis, devido ao pouco conhecimento da natureza física e química dos polissacarídeos e as suas relações com as aplicações do produto final e o efeito das impurezas sob o comportamento dos polímeros. Alguns polímeros microbianos de interesse estão apresentados na Tabela 1 (PACE, 1991).

Tabela 1 - Polímeros microbianos de interesse comercial.

Polissacarídeos	Micro-organismos Produtores	Tipo de polímeros	Monômeros
Dextrana	Bactérias: <i>Leuconostoc</i> , <i>Klebsiella</i> , etc.	Cadeias curtas.	D-glucopiranosídeo.
Escleoglucana	Fungos: <i>Sclerotium</i> sp.	Cadeias curtas.	D-glucopiranosídeo.
Pululana	Fungos: <i>Aureobasidium</i> sp.	Bloco linear.	D-glucopiranosídeo.
Álginato	Bactérias: <i>Azotobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>	Bloco linear poliacídico.	Ácido D-manurônico Ácido L-gulurônico
Xantana	Fungos: <i>Xanthomonas</i> sp.	Esqueleto linear com Ramificações acídicas trimétricas ou unidades alternadas.	Ramificações de D-glicose 6-acetil-D-manose Acido D-glucurônico D-manose-4,6 piruvato cetal

Fonte: Adaptado de PACE (1991).

A principal característica dos polímeros é a sua capacidade de modificar a reologia e o comportamento das soluções. Além do mais, a maior parte dos polímeros solúveis em água são multi-funcionais, quer dizer, exibem uma combinação de propriedades que são essenciais para a aplicação final. Por exemplo, as gomas utilizadas para fabricar produtos de limpeza em meio aquoso, além de ter propriedades reológicas adequadas devem também resistir à degradação por alcoóis ou ácidos. As propriedades de tais polímeros solúveis em água são determinadas pela sua composição química, agrupamentos e uniões moleculares, seu peso molecular médio e sua distribuição. Os polissacarídeos microbianos variam desde aniônicos, a neutros, até

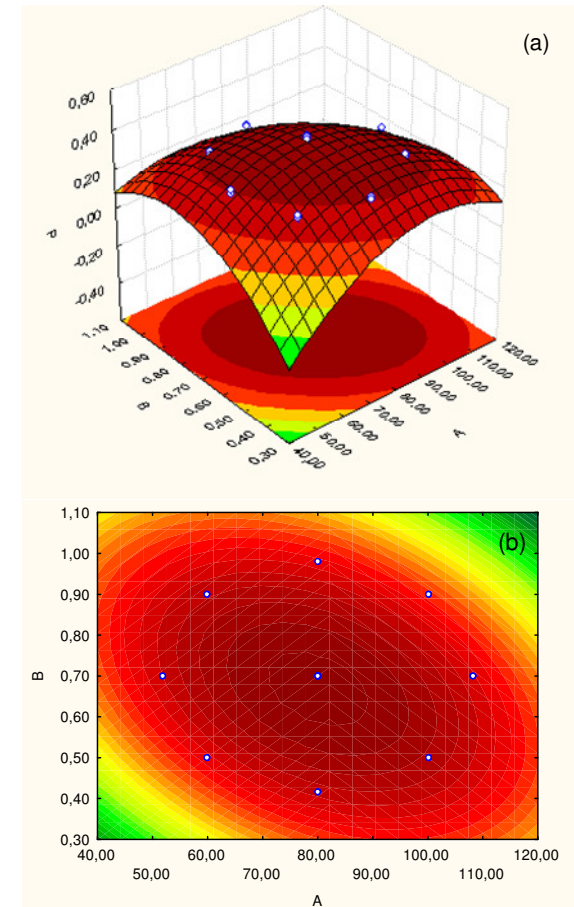


Figura 37- Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a produtividade (P) em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$

Onde A é a concentração de sacarose em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} .

Nas condições otimizadas, as maiores produtividades encontradas foram $0,42 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ para concentrações de 80 g.L^{-1} de sacarose e $0,7$ de sulfato de amônio, $0,33 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para concentrações de 100 g.L^{-1} de glicose e $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio e $0,23 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para concentrações de 40 g.L^{-1} de glicerol e $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio.

Na Tabela 26 são mostrados alguns resultados obtidos na produção de alginato através de diferentes condições de cultivo.

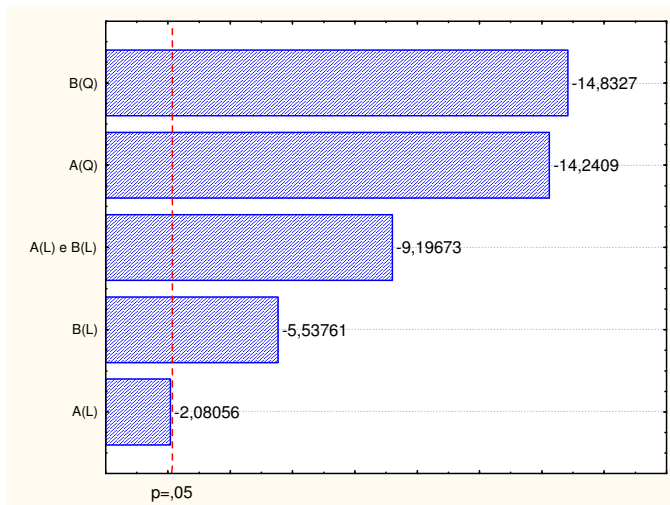


Figura 36 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produtividade (P).

A- Concentração de sacarose em g.L^{-1} e B- Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} . L-termo linear, Q-termo quadrático. O ponto no qual a estimativa dos efeitos é significativa ($p=0,05$) é indicado pela linha pontilhada.

O modelo ajustado para a região experimental é apresentado na Figura 37. O modelo prediz a região experimental com coeficiente de correlação de 0,96. A Tabela ANOVA encontra-se no Anexo B, Tabela B.9.

A equação para a produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ajustada para a região investigada é (Equação 21):

$$P = -1,879 + 0,031A + 3,032B - 1,576438B^2 - 0,012AB \quad (\text{Equação 21})$$

Onde: A é a concentração de sacarose em g.L^{-1} e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} .

Através da superfície de resposta e curvas de contorno geradas pelo modelo (Figura 37), pode-se observar as concentrações de substrato e sulfato de amônio que resultam em maior produtividade. É possível verificar que para a concentração de sacarose a faixa ótima está na faixa de 70 a 85 g.L^{-1} e para a concentração de nitrogênio a faixa ótima está entre 0,65 e 0,75 g.L^{-1} .

polímeros catiônicos de monossacarídeos ou derivados de monossacarídeos e frequentemente contém grupos laterais como acetato, piruvato, succinato, componentes de tipo lipídico, nitrogênio orgânico ou íons inorgânicos. O grau de substituição por estes grupos laterais tem efeito marcante sobre as propriedades destes polímeros (PACE, 1991).

O desenvolvimento de novos produtos, principalmente nas áreas de alimentos e fármacos, trará novos desafios para o desenvolvimento e obtenção de novos polímeros que, entre outros, deverão suportar técnicas modernas na indústria de alimentos, como processamento UHT, micro-ondas, extrusão, processamento a vácuo, etc., além de novas formulações baseadas em baixos teores de gordura, sal e calorias (MAUGERI, 2001).

A exploração comercial de um dado produto pode ser dificultada pela instabilidade genética do micro-organismo ou então pela baixa produtividade. Conseqüentemente, estudos no sentido de descobrir novas linhagens mais produtoras ou novas tecnologias que levam a processos mais produtivos, são de grande interesse (MAUGERI, 2001).

2.1.1 Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos ou bactérias, os quais são encontrados ligados à superfície das células ou são excretados para o meio de cultivo na forma de material viscoso (CANILHA et al., 2006). Como resultado da produção do exopolissacarídeo, ocorre mudança na viscosidade do meio de cultivo, começando como um fluido Newtoniano de baixa viscosidade e finalizando como um fluido não-Newtoniano, de elevada viscosidade (MOREIRA et al., 2005).

Polissacarídeos microbianos podem apresentar-se como constituintes da parede celular (lipopolissacarídeos ou LPS), associados covalentemente à superfície celular (polissacarídeos capsulares ou CPS), ou secretados para o meio extracelular (exopolissacarídeos ou EPS) (BOEHLIS et al., 2001). Enquanto os polissacarídeos associados à célula (CPS e LPS) apresentam importância médica, muitos EPS têm amplo espectro de aplicações na indústria alimentícia, podendo ser utilizados como espessantes, estabilizantes, emulsificantes, coagulantes, formadores de filmes, gelificantes, agentes de suspensão e dispersantes (SUTHERLAND, 1998).

As condições de cultivo influenciam fortemente a produção de EPS. Estudos sugerem que as melhores condições para a produção de

EPS são diferentes da condição ótima para o crescimento celular (GAMMAR et al., 1997). A produção de EPS parece ocorrer durante a fase logarítmica e, para algumas bactérias, continua durante a fase estacionária de crescimento (LAWS et al., 2001).

2.1.2 Micro-organismos produtores de EPS

Muitos micro-organismos produtores de gomas são obtidos do solo ou de outras fontes como a água do mar. A capacidade de sintetizar polissacarídeos também é apresentada por diversos patógenos de animais ou de plantas. Devido a razões éticas e problemas com a aceitabilidade do produto, o uso de micro-organismos patogênicos a humanos deve ser evitado para a produção de biopolímeros (SUTHERLAND, 1986).

Outro problema está relacionado com a variabilidade genética apresentada pelos micro-organismos que, por natureza, são instáveis. Atualmente não existe um método que conserve integralmente o genótipo de um micro-organismo. A sensibilidade a certos antibióticos, a morfologia e o tamanho das colônias são algumas das características de cepas que apresentam elevada capacidade de síntese de polissacarídeos, mas nenhuma destas características constitui prova definitiva de que a cepa produzirá biopolímeros na quantidade e qualidade determinadas como objetivo (SANDFORD, 1979).

Membros do gênero *Pseudomonas* são habitantes comuns do solo, da água fresca, e do ambiente marinho. Algumas espécies causam doenças em plantas, enquanto que outras são patógenas ocasionais de humanos e animais. As células são gram-negativas e móveis através de um flagelo polar. São estritamente aeróbias, exceto para espécies que podem usar desnitrificação como forma de respiração anaeróbia. Estão entre os mais versáteis micro-organismos conhecidos e são capazes de utilizar uma extensa variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (FYFE e GOVAN, 1983).

2.1.3 Biossíntese de polissacarídeos

Os processos através dos quais os substratos entram na célula e são modificados por várias reações enzimáticas e finalmente secretados na forma de biopolímeros, têm merecido a atenção de vários pesquisadores (MÜLLER, 1997).

Observa-se que, nas condições estudadas, o aumento da produtividade está diretamente relacionado a maiores concentrações de sacarose e menores concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. E o aumento do fator de bioconversão está diretamente relacionado a menores concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4.3.3.2 Segunda etapa: Planejamento Composto Central

A partir da análise dos resultados obtidos na primeira etapa de experimentos, foi estruturado um segundo planejamento experimental apresentado na Tabela 25.

Tabela 25 - Planejamento composto central, para produção de alginato a partir de sacarose por *Pseudomonas mendocina*, onde A (g.L^{-1}) representa a concentração de sacarose, B (g.L^{-1}) representa a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} e P é a produtividade em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$. Tempo de cultivo: 48 h.

Experimento	Fatores		P
	A	B	
1	-1,00	-1,00	0,28 ± 0,01
2	-1,00	1,00	0,31 ± 0,01
3	1,00	-1,00	0,35 ± 0,01
4	1,00	1,00	0,20 ± 0,01
5	-1,41	0,00	0,30 ± 0,01
6	1,41	0,00	0,29 ± 0,01
7	0,00	-1,41	0,31 ± 0,01
8	0,00	1,41	0,28 ± 0,02
9	0,00	0,00	0,41 ± 0,01
10	0,00	0,00	0,42 ± 0,01
11	0,00	0,00	0,41 ± 0,02

A : concentração de sacarose (-1,41) 51,8 g.L^{-1} ; (- 1,00) 60,0 g.L^{-1} ; (0,00) 80,0 g.L^{-1} ; (+1,00) 100,0 g.L^{-1} ; (+1,41) 108,2 g.L^{-1} .

B :concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (-1,41) 0,418 g.L^{-1} ; (- 1,00) 0,50 g.L^{-1} ; (0,00) 0,70 g.L^{-1} ; (+1,00) 0,90 g.L^{-1} (+1,41) 0,982 g.L^{-1} .

Os efeitos principais e de interação da concentração de sacarose e da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sobre a produtividade estão apresentados no Diagrama de Pareto (Figura 36). Todos os efeitos foram significativos ($p > 0,05$), exceto o termo linear referente à concentração de sacarose

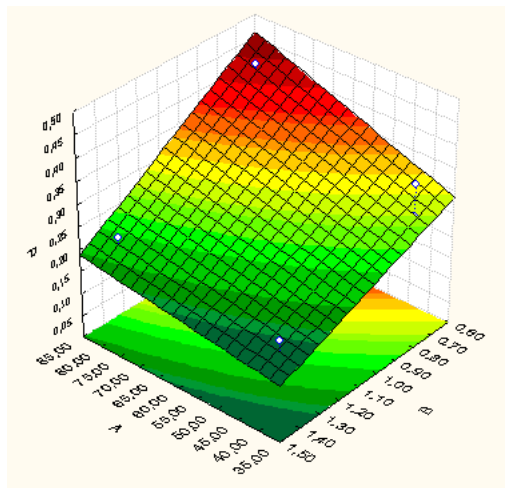


Figura 34 - Superfície de Resposta referente ao efeito da concentração de sacarose e concentração de nitrogênio na produtividade (P) em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$. Onde A é a concentração de sacarose em g.L^{-1} e B é a concentração de nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) em g.L^{-1} .

A Figura 35 representa a superfície de resposta para o fator de bioconversão. Maiores valores para o fator de bioconversão podem ser obtidos com menores concentrações de nitrogênio.

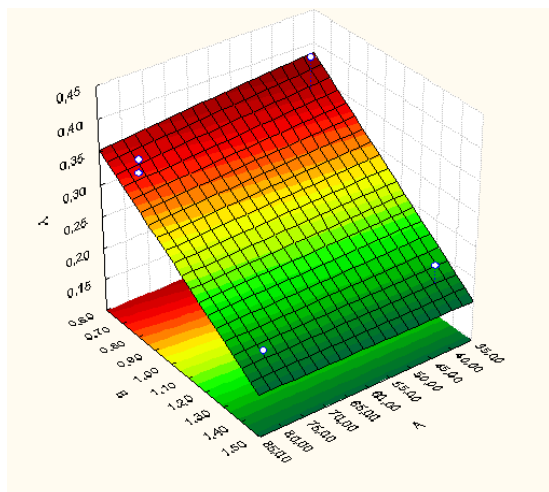


Figura 35 - Superfície de Resposta para o fator de bioconversão (Y) em gP.gS^{-1} . Onde A é a concentração de sacarose em g.L^{-1} e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$.

A síntese da maior parte dos polissacarídeos tem, de forma generalizada, as seguintes etapas (PACE, 1991):

- A síntese ou o transporte para o interior da célula do componente saacarídico básico do polímero, em forma de ésteres de açúcar 1- fosfato;
- A ativação destes componentes por nucleotídeos trifosfatos para formar nucleotídeo difosfato de açúcares;
- Quando preciso, a modificação de nucleotídeos difosfato de açúcares a outros derivados, como açúcares ácidos ativados;
- O encaixe sobre um lipídio portador isoprenóide, de cadeia larga, dos açúcares ativados ou derivados, para formar a estrutura base do polímero. O mesmo lipídio portador isoprenóide atua como sítio para a síntese de peptídeoglicano e dos lipopolissacarídeos;
- Modificação por adição de grupos ao polímero;
- O transporte e a liberação desde o lipídio portador ao ambiente externo.

Vários mecanismos de controle podem existir nestas vias, incluindo (PACE, 1991):

- Controle do fornecimento de substrato;
- A concentração intracelular de açúcares nucleotídeos (determinados pela atividade de enzimas sintéticas e hidrolíticas);
- A utilização de substratos para síntese de outros carboidratos (como polímeros intracelulares e de parede celular);
- A disponibilidade do lipídio portador isoprenoide, cuja prioridade de síntese é em ordem: peptídeoglicano, lipopolissacarídeo e logo exopolissacarídeo.
- Os mecanismos que controlam os níveis dos substituintes variáveis;
- O alongamento da cadeia e o controle da liberação do biopolímero.

O conhecimento destes controles pode ser útil para focar o aumento tanto na eficiência de conversão e na produtividade do cultivo, como para alterar o peso e a composição molecular do polímero (PACE, 1991).

Para a máxima produção de polissacarídeos o ambiente de crescimento é importante. Culturas puras e condições assépticas são necessárias com o objetivo de evitar o crescimento de micro-organismos

indesejáveis. Melhores resultados têm sido encontrados através do estudo das condições fisiológicas aplicadas ao crescimento (SUTHERLAND, 1986).

Em muitos micro-organismos, a cinética e a eficiência da produção de polímeros, o peso molecular dos polímeros e a sua estrutura podem ser afetados por mudanças nas condições de crescimento. O tipo de resposta observada frequentemente varia entre micro-organismos e provavelmente reflete na variedade de funções específicas que tem os diferentes exopolissacarídeos. O entendimento e controle das variáveis ambientais importantes que controlam a síntese do polímero podem ser utilizadas para obter vantagens no projeto do processo econômico (PACE, 1991).

Na produção do alginato microbiano e de outros polímeros, tanto a eficiência de conversão como o valor absoluto da velocidade específica de formação do produto podem ser influenciadas pela natureza dos nutrientes limitantes do crescimento. A capacidade dos micro-organismos para produzir exopolissacarídeos em baixa concentração de carbono também varia (PACE, 1991).

As relações cinéticas entre o crescimento e a formação de produtos são importantes para ajudar a determinar o modo de operação mais econômico, como cultivo contínuo ou, alternativamente, em culturas descontínuas, que alcancem rapidamente a máxima concentração celular, seguida pelo crescimento mais lento, com acúmulo de produto, ou alguma opção intermediária. A velocidade específica de formação de polissacarídeos pode ser ou independente da velocidade de crescimento, ou pode aumentar com o aumento da velocidade de crescimento dependendo do micro-organismo e dos nutrientes que limitem o crescimento (PACE, 1991).

A velocidade e a eficiência da produção do polímero são também afetadas por outras variáveis ambientais como o oxigênio dissolvido, o pH e a temperatura e há algumas sugestões na literatura que uma alta tensão de cisalhamento pode aumentar a produção de polímero reduzindo a camada de polímero sobre a superfície celular e melhorando, portanto a difusão no interior e exterior da célula (PACE, 1991). A produção de polissacarídeo requer pH acima de 5,0 e seu controle pode ser realizado por adição de uma base mantendo o pH entre 6,0 e 7,5 o que é importante devido à influência dessas possíveis variáveis na fisiologia dos micro-organismos e, conseqüentemente, sobre a síntese do biopolímero (SANDFORD, 1979).

A estrutura básica da maior parte dos exopolissacarídeos não muda com as condições de crescimento, mas o conteúdo dos grupos

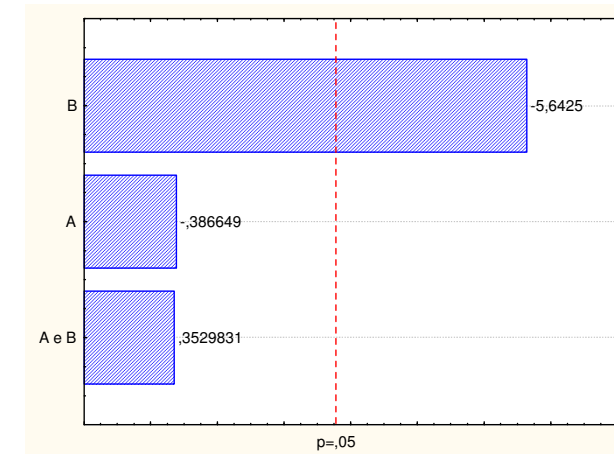


Figura 33 - Diagrama de Pareto para a resposta fator de bioconversão (Y). A Concentração de Sacarose e B Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O ponto no qual a estimativa dos efeitos é significativa ($p=0,05$) é indicado pela linha pontilhada.

Considerando os fatores significativos para os parâmetros avaliados, foi ajustado um modelo para a região experimental. Os modelos predizem a região experimental com coeficientes de correlação $R^2= 0,95$ para a produtividade e $R^2= 0,89$ para o fator de bioconversão. A tabela ANOVA é mostrada no Anexo B, Tabela B.7 para a produtividade e Tabela B.8 para o fator de bioconversão.

A equação ajustada para a produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) referente à produtividade é (Equação 19):

$$P=0,220+0,005A-0,092B \quad (\text{Equação 19})$$

Onde: A é a concentração de sacarose (g.L^{-1}) e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g.L^{-1}).

A equação para o modelo ajustado referente ao fator de bioconversão (gP.gS^{-1}) é (Equação 20):

$$Y_p/s= 0,567- 0,001A - 0,270B \quad (\text{Equação 20})$$

Onde: A é a concentração de sacarose (g.L^{-1}) e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g.L^{-1}).

A Figura 34 apresenta a superfície de resposta para a produtividade onde observa-se que uma maior produtividade pode ser obtida com maiores concentrações de sacarose, e menores concentrações de nitrogênio.

Nos Diagramas de Pareto estão apresentados os efeitos principais e de interação da concentração de sacarose e da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sobre a produtividade (Figura 32) e sobre o fator de bioconversão (Figura 33).

Para a produtividade, os efeitos principais foram significativos ($p > 0,05$), já a interação entre eles não foi significativa. Observa-se também que o efeito concentração de nitrogênio é negativo e a concentração de substrato positiva, ou seja, a produtividade aumenta com a diminuição da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e com o aumento da concentração de sacarose nas condições estudadas.

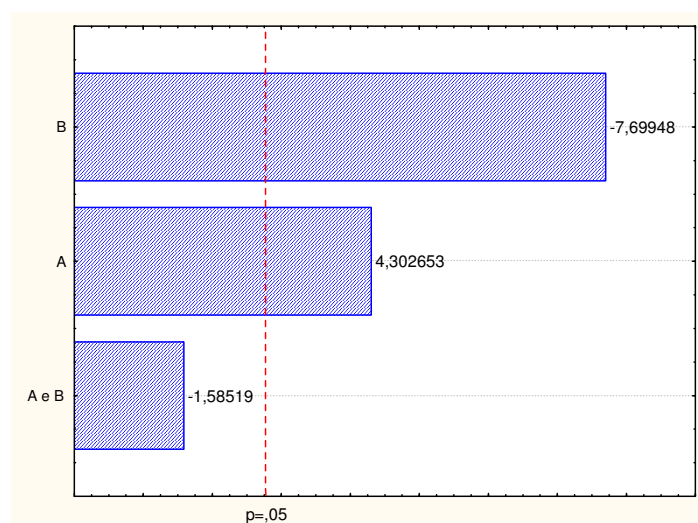


Figura 32 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produtividade (P). A- Concentração de Sacarose em g.L^{-1} e B Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} . O ponto no qual as estimativas dos efeitos são significativas ($p=0,05$) é indicado pela linha pontilhada.

Para o fator de bioconversão o único efeito significativo ($p>0,05$) foi a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que influencia negativamente na resposta, ou seja, ao aumentarmos a concentração de nitrogênio há uma diminuição do fator de bioconversão.

ligados a cadeia, como os grupos acil ou acetal podem variar amplamente. Uma exceção interessante é a variação da relação de ácidos manurônicos e gulurônicos que constituem a estrutura básica do alginato microbiano em culturas contínuas (PACE, 2001).

O conteúdo relativo de ácidos gulurônicos neste polímero depende da atividade da epimerase extracelular, que catalisa a conversão dos componentes do ácido manurônico do alginato aos componentes gulurônicos uma vez formada e liberada a cadeia do alginato. A atividade desta enzima aumenta significativamente na presença de altas concentrações de íons de cálcio, e controlando a concentração de cálcio pode-se produzir alginatos de diferentes composições (PACE, 1991).

Variações nos grupos substituintes, como o grupo acil ou acetal, pode ter efeitos dramáticos sobre as propriedades reológicas do polímero, e, portanto sua efetividade em distintas aplicações. Por exemplo, o conteúdo em piruvato de xantana pode ser modificado desde quase zero até 8% (a máxima concentração teórica) alterando o meio de crescimento. Portanto, é possível na produção de polímeros microbianos que a escolha do meio de produção leve em conta não somente os custos, a velocidade de produção e a eficiência de conversão desejada, mas também o efeito sobre a qualidade do produto. (PACE, 1991).

2.2 ALGINATO - CARACTERÍSTICAS GERAIS

O termo “Alginato” refere-se a um grupo de polissacarídeos que ocorrem naturalmente na parede celular de algas marinhas marrons (*Phaeophyceae*) onde eles existem como um sal misto de cálcio-sódio-potássio do ácido algínico (CLEMENTI et al., 1995) e também pode ser sintetizado por *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas* spp. como uma mucilagem extracelular (polissacarídeo capsular) e difere do ácido algínico presente em algas apenas por ser acetilado. Somente *Azotobacter vinelandii* produz alginato com seqüência de resíduos de ácidos L-gulurônicos (SKJAK-BRAEK et al., 1986; GARCIA-CRUZ et al., 2008).

O isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*, produtora de alginato, foi inicialmente feito em pacientes com fibrose cística submetidos a um tratamento prolongado com antibióticos. Por este motivo, a possibilidade de produção deste biopolímero por outras cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi investigada. Através da técnica de isolamento de micro-organismos resistentes a antibiótico, foi constatado que várias outras cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, originalmente não

produtoras de polissacarídeos, foram convertidas em cepas sintetizadoras de alginato. Esta conversão pode ser realizada através da seleção à resistência a antibióticos como a cabercilina (FYFE e GOVAN, 1980).

A técnica de isolamento por resistência a antibiótico foi aplicada para *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas mendocina*. O produto foi sintetizado por micro-organismos mutantes isolados através desta técnica foi identificado como sendo um copolímero de ácidos D-manurônicos e L-gulurônicos parcialmente acetilado (GOVAN et al., 1981).

2.2.1 Estrutura Química

O alginato é um copolímero linear que consiste de quantidades variáveis de resíduos de ácidos β – D- manurônico e seu epímero α -L-gulurônico unidos por ligações glicosídicas tipo β 1,4. Os monômeros são distribuídos em blocos homopoliméricos de resíduos manurônicos (Blocos M), resíduos gulurônicos (Blocos G) ou resíduos alternados (Blocos M-G) como demonstra a Figura 1. Alginatos isolados de diferentes fontes naturais variam no comprimento e distribuição dos diferentes blocos. Os resíduos de manuronatos do alginato bacteriano são acetilados nas posições O-2 e/ou O-3. A estrutura dos blocos de resíduos de monômeros é similar em alginatos produzidos por algas marrons e *Azotobacter*, em contraste, os produzidos por *Pseudomonas* não possuem blocos G (SKJAK-BRAEK et al., 1986).

Em vista da exploração comercial do alginato, a viscosidade e a capacidade de formação de gel são as características mais importantes deste polímero. Estas características são largamente afetadas pela estrutura dos blocos e comprimento das cadeias do polímero. Foi observado que a força do gel depende do número de ligações cruzadas formadas entre as cadeias, do tipo de íons das ligações cruzadas e do comprimento dos blocos entre as ligações (MOE et al., 1995 apud SABRA et al., 2001). O conteúdo de ácidos gulurônicos no polímero corresponde a mais áreas de interação com cátions divalentes (especialmente Ca^{+2}), resultando em uma estrutura mais forte e formação de um gel mais rígido (Figura 2) (REMMINGHORST e RHEM, 2006).

É possível verificar através da superfície de resposta e curvas de contorno que para a concentração de substrato a faixa ótima é de 25 a 50 g.L^{-1} e para a concentração de nitrogênio na faixa de 0,65 a 0,85 g.L^{-1} , resultando em maiores produtividades.

O modelo ajustado prediz que a maior produtividade ($0,23 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$) foi obtida com concentrações de glicerol de 40 g.L^{-1} e de sulfato de amônio de 0,7 g.L^{-1} . As melhores condições para o processo estão próximas a ponto central 40 g.L^{-1} glicerol e 0,7 g.L^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4.3.3 Ensaios utilizando sacarose como substrato

O planejamento experimental estruturado para avaliar os ensaios utilizando sacarose como substrato foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa foi estruturado um fatorial completo 2^2 , foram obtidas como variáveis respostas a produtividade e o fator de bioconversão. Na segunda etapa foi estruturado um Planejamento Composto Central, onde foi obtida como resposta a produtividade.

4.3.3.1 Primeira etapa: Fatorial completo 2^2

Os valores encontrados para as variáveis respostas produtividade e fator de bioconversão estão apresentados na Tabela 24:

Tabela 24 - Planejamento fatorial 2^2 para produção de alginato a partir de sacarose por *Pseudomonas mendocina*

Experimento	Fatores		P	Yp/s
	A	B		
1	-	-	0,29±0,05	0,36±0,08
2	+	-	0,42±0,02	0,34±0,01
3	-	+	0,15±0,03	0,19±0,04
4	+	+	0,21±0,01	0,19±0,01

Onde A (g.L^{-1}) representa a concentração de sacarose, B (g.L^{-1}) representa a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} . P é a produtividade em $\text{g.L}^{-1} \text{h}^{-1}$ e Yp/s o fator de bioconversão (g.P.gS^{-1}). Tempo de cultivo: 48 h.

A : concentração de sacarose (-) 40 g.L^{-1} ; (+) 80 g.L^{-1}

B :concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (-) 0,7 g.L^{-1} ; (+) 1,4 g.L^{-1}

O modelo ajustado para a região experimental é apresentado na Figura 31. O modelo prediz a região experimental com coeficiente de correlação de 0,95. A Tabela ANOVA encontra-se no Anexo B Tabela B.6.

A equação para a produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ajustada para a região investigada é (Equação 18):

$$P = -0,414 + 0,007A + 1,380B - 0,880B^2 - 0,002AB \quad (\text{Equação 18})$$

Onde: A é a concentração de glicerol (g.L^{-1}) e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g.L^{-1}).

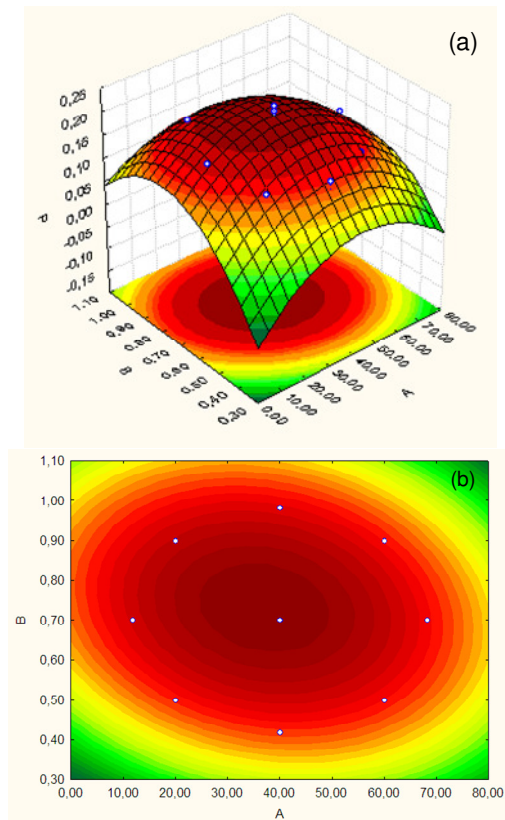


Figura 31 - Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a produtividade (P) em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, onde A é a concentração de glicerol em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} .

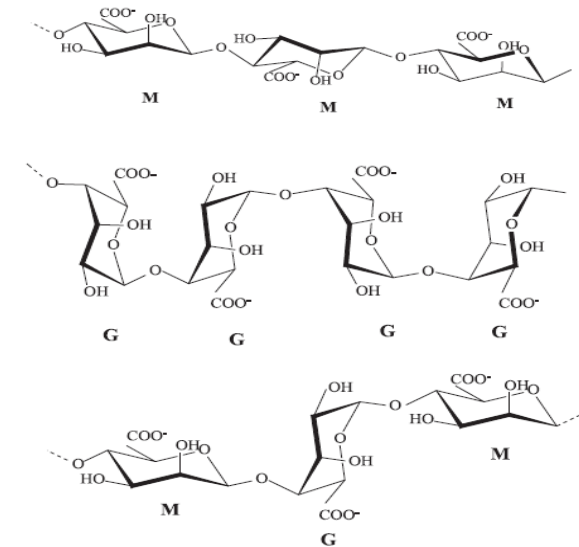


Figura 1 - Estrutura dos blocos homopoliméricos M e G e dos blocos heteropoliméricos M-G.

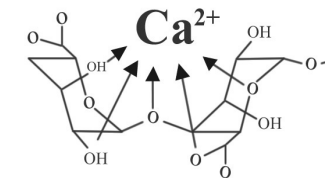


Figura 2 - Atração dos blocos G pela presença do íon de cálcio, formando uma estrutura conhecida como “caixa de ovos”.

Fonte: SABRA et al, 2001.

No que se refere à composição, alginatos com baixa proporção M/G produzem géis rígidos e quebradiços, enquanto alginatos com alta proporção M/G produzem géis elásticos. A biotecnologia oferece meios para a modificação da estrutura dos polímeros para obter-se as mudanças desejadas em suas propriedades funcionais. Técnicas enzimáticas permitem transformar alginatos de qualquer peso molecular em bons formadores de gel. Outras possibilidades estão relacionadas com a modificação do meio de cultura ou das condições do bioprocessamento. Dependendo das características destes polímeros, alginatos com diferentes proporções M/G e graus de acetilação podem apresentar valor comercial substituído ao alginato de algas (MÜLLER, 1997).

No alginato bacteriano, a liase funciona como uma enzima que controla o comprimento e o peso molecular do biopolímero (REMMINGHORST e RHEM, 2006).

As seqüências de resíduos M e G podem ser modificadas por uma polimerização enzimática com C-5 manuronato epimerase produzida por *Azotobacter vinelandii*, a qual converte resíduos M a G dentro da cadeia polimérica. *Azotobacter. vinelandii* codifica uma família de sete iso-enzimas extracelulares com a capacidade de epimerisar alginatos a diferentes seqüências poliméricas desde cadeias longas de blocos G, cadeias curtas de blocos G a cadeias alternadas. Alginatos com melhores propriedades químicas e físicas podem assim ser produzidos (DRAGET e TAYLOR, 2009).

Draget et al, (1994) investigaram a influência da composição química, seqüência de resíduos M e G e peso molecular de diferentes amostras de alginato nas propriedades finais do gel. Observaram que altas proporções de ácido gulurônico proporcionam géis com maior resistência comparados a alginatos ricos em ácido manurônico, e que altas frações de blocos homopoliméricos G favorecem a formação de zonas de junção (ligação entre duas moléculas por íons divalentes, conhecidas como estrutura “caixa de ovos”. Neste estudo os géis foram caracterizados utilizando-se medidas reológicas dinâmicas em um reômetro oscilatório (F= 1Hz, Strain = 0, 022), determinando-se G' (módulo elástico) e G'' (módulo de dissipação mecânica). O trabalho foi realizado com alginatos extraídos de algas marinhas e sintetizados por *P aeruginosa*.

Skajak-Braek et al. (1986) estudaram os modelos de acetilação e de estruturas sequenciais de alginatos de *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas mendocina* por espectroscopia de ressonância magnética. Neste estudo os autores observaram que os grupos O-acetil estão exclusivamente associados aos resíduos manurônicos e o grau de acetilação varia de 4 a 57 % dependendo da proporção deste ácido no polímero. Observaram também que a principal diferença entre alginatos sintetizados por *Azotobacter vinelandii* e pelas espécies de *Pseudomonas*, foi a completa ausência de resíduos de ácido gulurônico consecutivos nesta última. Para *Pseudomonas mendocina*, não foram observadas seqüências de resíduos gulurônicos. A proporção M/G foi de 74/26 e o grau de acetilação foi de 30 %.

Tabela 23 - Planejamento composto central, para produção de alginato a partir de glicerol por *Pseudomonas mendocina*

Experimento	Fatores		P
	A	B	
1	-1,00	-1,00	0,14 ± 0,01
2	-1,00	1,00	0,19 ± 0,01
3	1,00	-1,00	0,14 ± 0,01
4	1,00	1,00	0,15 ± 0,02
5	-1,41	0,00	0,15 ± 0,01
6	1,41	0,00	0,16 ± 0,01
7	0,00	-1,41	0,15 ± 0,01
8	0,00	1,41	0,16 ± 0,02
9	0,00	0,00	0,21 ± 0,01
10	0,00	0,00	0,22 ± 0,01
11	0,00	0,00	0,23 ± 0,03

Onde A (g.L^{-1}) representa a concentração de glicerol, B (g.L^{-1}) representa a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} e P é a produtividade em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$. Tempo de cultivo: 48 h.
 A : concentração de glicerol (-1,41) 11,8 g.L^{-1} ; (- 1,00) 20,0 g.L^{-1} ; (0,00) 40,0 g.L^{-1} ; (+1,00) 60,0 g.L^{-1} ; (+1,41) 68,2 g.L^{-1} .
 B : concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (-1,41) 0,418 g.L^{-1} ; (- 1,00) 0,50 g.L^{-1} ; (0,00) 0,70 g.L^{-1} ; (+1,00) 0,90 g.L^{-1} ; (+1,41) 0,982 g.L^{-1} .

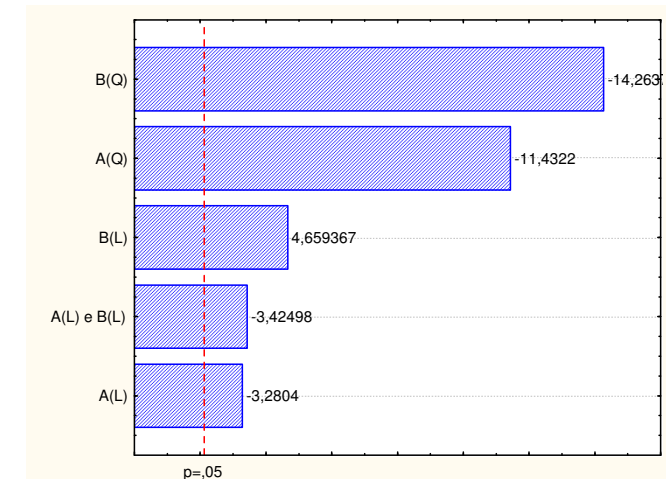


Figura 30 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produtividade. A- Concentração de Glicerol em g.L^{-1} e B- Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} . L- termo linear, Q- termo quadrático. O ponto no qual a estimativa dos efeitos é significativa ($p=0,05$) é indicado pela linha pontilhada.

A Figura 29 representa a superfície de resposta para o fator de bioconversão. Maiores fatores de bioconversão podem ser obtida com menores concentrações de glicerol e de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nas condições estabelecidas.

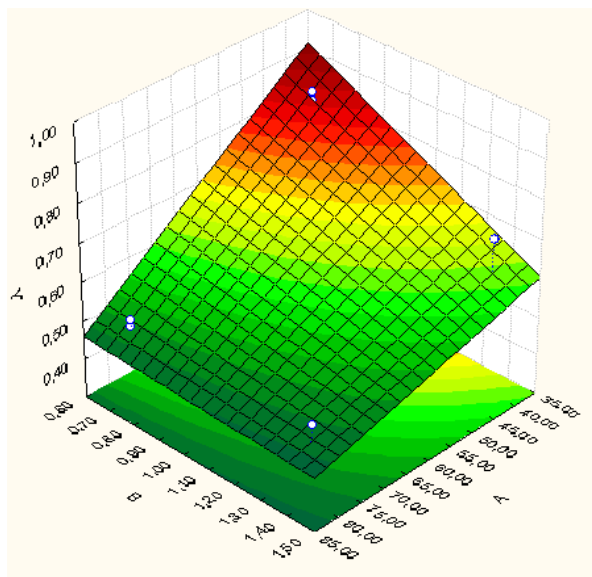


Figura 29 - Superfície de Resposta para o fator de bioconversão (Y) em gP.gS^{-1} . Onde A é a concentração de glicerol em g.L^{-1} e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} .

Observa-se que, nas condições estudadas, o aumento da produtividade e do fator de bioconversão está diretamente relacionado a menores concentrações de glicerol e menores concentrações de nitrogênio.

4.3.2.2 Segunda etapa: Planejamento Composto Central

A partir da análise dos resultados obtidos na primeira etapa de experimentos, foi estruturado um segundo planejamento experimental conforme a Tabela 23.

Os efeitos principais e de interação da concentração de glicerol e da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sobre a produtividade estão apresentados no Diagrama de Pareto (Figura 30). Todos os efeitos foram significativos ($p > 0,05$).

2.2.2 Aplicações do alginato

O alginato é utilizado atualmente para uma variedade de propósitos industriais e a produção comercial é baseada no alginato extraído de algas marrons (REMMINGHORST e RHEM, 2006, REHM e VALLA, 1997). Os preços são, em geral, baixos, e isto aparenta ser uma dificuldade para estabelecer a competitividade do processo de produção de alginato microbiano nesta faixa de preço. Entretanto, há ao menos dois fatores que fazem com que o alginato bacteriano se torne um produto de interesse comercial. O primeiro é relacionado com preocupações ambientais associadas com a produção e processamento do alginato de algas marinhas, e o segundo está relacionado com a qualidade final do polímero (REHM e VALLA, 1997). Alginatos extraídos de algas marrons estão susceptíveis a variabilidade na composição devido a mudanças sazonais e ambientais (REMMINGHORST e RHEM, 2006).

O ácido algínico é insolúvel em água à temperatura ambiente, tornando-se solúvel em temperaturas elevadas. Portanto, os sais de sódio, cálcio e potássio do ácido algínico, solúveis em água, são preferidos para o emprego na indústria de alimentos. O composto mais amplamente utilizado é o alginato de sódio. Em muitas aplicações, o alginato de sódio solúvel torna-se insolúvel por meio da adição de cátions divalentes, geralmente cálcio, resultando em géis ou filmes. Tais géis não são termo-reversíveis quando altas concentrações de cálcio são utilizadas, podendo ser termo-reversíveis em baixas concentrações. A força do gel depende da natureza do cátion divalente. (GARCIA-CRUZ et al., 2008).

Alginatos com melhores propriedades qualitativas têm a vantagem de serem vendidos a preços mais altos, e também apresentam possibilidades para novas aplicações. As propriedades do alginato puro são determinadas pelo seu grau de polimerização e acetilação, e pela sua composição e seqüenciamento de monômeros (MOE et al. 1995 apud REHM e VALLA, 1997). É provável que seja possível um controle destes três parâmetros na produção de alginato microbiano (REHM e VALLA, 1997).

O desafio para se ter esses produtos no mercado estão provavelmente relacionados com preços e vantagens técnicas comparados com aqueles já disponíveis de algas marinhas. Para uso em alimentos e aplicações farmacêuticas, a aprovação por autoridades legais provavelmente é o maior obstáculo (REHM e VALLA, 1997).

Polímeros derivados de fontes naturais são extensamente

utilizados como biomateriais e suas aplicações variam de curativos ou implantes dentários, até na engenharia de tecidos. A microencapsulação, não somente medicamentos, mas também de peptídeos ou células, em cápsulas de alginato com sistemas de liberação controlada do conteúdo, tem crescido rapidamente com uma extensa área de aplicação (REMMINGHORST e RHEM, 2006).

Alginatos têm sido por muitos anos, utilizados na área da saúde, na encapsulação de medicamentos, curativos, material de implante dentário e em algumas formulações para prevenir refluxo gástrico. Uma vantagem no uso de alginato como cápsula de medicamentos é a sua capacidade de preservar a estrutura do material em condições gástricas (ácida) devido à formação do gel de ácido algínico. Essa propriedade permite a proteção de componentes delicados da acidez do suco gástrico (DRAGET e TAYLOR, 2009).

O alginato bacteriano pode ser usado como imunoestimulante ou como agente gelificante para imobilização de células. Células imobilizadas podem ser utilizadas para uma variedade de processos biotecnológicos ou em tecnologias de transplantes na medicina (RHEM e VALLA, 1997). O ingrediente ativo é encapsulado em microesferas de alginato e gradativamente liberado quando exposto a determinadas condições do meio (REMMINGHORST e RHEM, 2006).

Uma das mais interessantes aplicações envolve a diabetes tipo I, imobilizou-se células produtoras de insulina em cápsulas de alginato que foram implantadas no corpo de alguns animais e também em humanos para para liberação gradativa de insulina ao organismo (SOON-SHIONG, 1995).

Na revisão apresentada por Conti et al (1994), foi reportado que alginatos com composições específicas demonstraram possuir atividade antitumor. Alginatos bacterianos foram também utilizados na indução da produção de citoquina em monócitos humanos no tratamento de doenças hormonais em cobaias.

Polimanuronatos, ou seu produto de degradação, ácido manurônico, são conhecidos por exercerem ação antiinflamatória com eficácia (MIRSHAFIEY et al., 2005).

Na indústria de alimentos, os alginatos são largamente utilizados como aditivos com a capacidade de aumentar a viscosidade, estabilizar, emulsificar e gelificar soluções aquosas. A principal aplicação provavelmente é na produção de sorvetes, na qual é utilizado para prevenir a cristalização e o encolhimento, originando um produto homogêneo. Outra aplicação é em molhos para saladas, onde o alginato de sódio ou o éster de alginato de propileno glicol (PGA) são usados como

bioconversão, respectivamente. A Tabela ANOVA para a produtividade é mostrada no Anexo B Tabela B.4 e para o fator de bioconversão Tabela B.5.

A equação para o modelo ajustado referente à produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) é (Equação 16):

$$P=0,325-0,001A-0,086B \quad (\text{Equação 16})$$

Onde: A é a concentração de glicerol (g.L^{-1}) e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g.L^{-1}).

A equação para o modelo ajustado referente o fator de bioconversão (gP.gS^{-1}) é (Equação 17):

$$Yp/s=1,84 - 0,016A - 0,757B + 0,009AB \quad (\text{Equação 17})$$

Onde: A é a concentração de glicerol (g.L^{-1}) e B a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g.L^{-1}).

A Figura 28 apresenta a superfície de resposta para a produtividade, onde observa-se que maiores produtividades podem ser obtida com menores concentrações de glicerol e de nitrogênio nas condições estabelecidas.

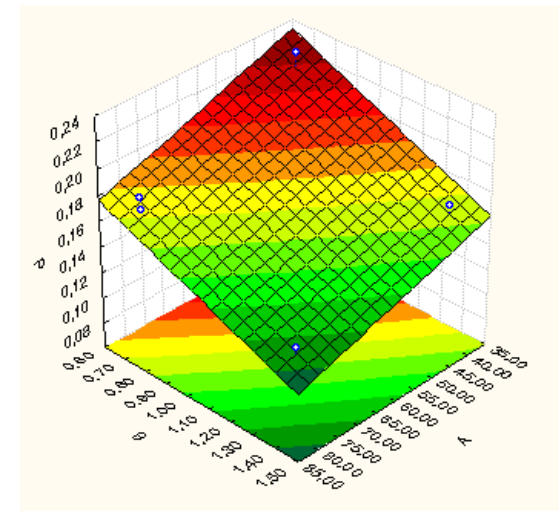


Figura 28 - Superfície de Resposta referente ao efeito da concentração de glicerol e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na produtividade (P) em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, onde A é a concentração de glicerol em g.L^{-1} e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} .

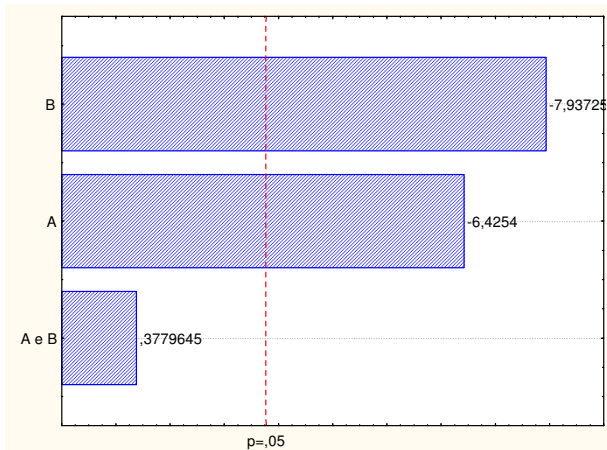


Figura 26 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produtividade (P). A- Concentração de Glicerol em g.L^{-1} e B Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} . O ponto no qual a estimativa dos efeitos é significativa ($p=0,05$) é indicado pela linha pontilhada.

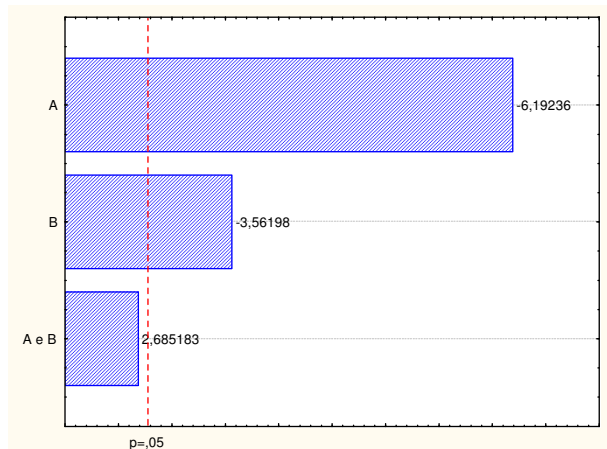


Figura 27- Diagrama de Pareto para o fator de bioconversão (Y). A- Concentração de glicerol em g.L^{-1} e B- Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} . O ponto no qual a estimativa dos efeitos é significativa ($p=0,05$) é indicado pela linha pontilhada.

Considerando os fatores significativos para os parâmetros avaliados, foi ajustado um modelo para a região experimental. Os modelos predizem a região experimental com coeficientes de correlação $R^2 = 0,96$ e $R^2 = 0,94$ para a produtividade e para o fator de

estabilizante para evitar a separação de fases; com a mesma finalidade é aplicado em maionese para estabilizar as emulsões água/óleo. Devido ao seu baixo conteúdo calórico (1,4 kcal/g) estes polímeros podem ser utilizados como agentes de corpo na formulação de produtos de baixa caloria, como maionese e massas (CLEMENTI, 1997).

Os alginatos são muito empregados na área de análogos de frutas ou produtos tipo imitação. Em 1946, Peschardt patenteou um processo para fazer cerejas artificiais utilizando uma solução colorida e aromatizada de alginato em açúcar, que era adicionada em formas de gotas a uma solução coagulante de sais solúveis de cálcio que penetravam por difusão em seu interior para fazer a gelificação. Uma película de alginato de cálcio insolúvel formava-se imediatamente em volta da superfície das gotas. Estas cerejas fabricadas não eram afetadas pelo calor e podiam ser perfeitamente usadas em produtos de panificação. Além disso, tinham a vantagem de apresentar uniformidade no tamanho, peso e qualidade. Foram desenvolvidos produtos similares utilizando purês de cereja em um sistema de gelificação de alginato comercializados com o nome de “bolas moldadas de cereja”. Outros produtos tipo imitação encontrados comercialmente são: imitação de fatias de pimentão para recheio de azeitonas, de anéis de cebola, caviar, carne, pescados, produtos marinhos, etc (GLICKSMAN, 1986 APUD GARCIA-CRUZ et al., 2008).

Uma das estratégias da pesquisa com alginatos microbianos foi desenvolver um polímero com peso molecular tão grande quanto possível para competir com o amplo espectro do alginato de algas. Em 1969, Tate e Lyle iniciaram um programa de pesquisa de produção de alginato microbiano, que finalizou com o desenvolvimento de um processo de produção em escala piloto de 1.000 L. Esse processo foi vendido para a Kelco. A produção é possível em processos de batelada ou contínuo, tendo como característica principal a limitação de fósforo, favorecendo a produção de ácido algínico (MAUGERI, 2001).

O alginato bacteriano tem aplicações potenciais na indústria de alimentos (sorvetes, geléias, cervejas, etc.) e na indústria têxtil, que são os principais mercados de alginatos. Porém, tem que competir com produtores de alginatos de algas fortemente estabelecidos como Kelco (produtor de alginato desde 1929), Protan e Fagertur A.S. (Noruega), Mero-Rousselot-Satia (França) e Alginate Industries Limited (Reino Unido). O mercado mundial vem crescendo continuamente e os maiores consumidores são as cervejarias, que usam alginatos de propilenoglicol, e grandes produtores de alimentos como Kraft e General Food (MAUGERI, 2001).

O constante incremento nas aplicações deste polímero nos setores alimentício e farmacêutico e a constante poluição dos mares, uma vez que, as algas necessitam de água límpida para seu crescimento, levou a uma pesquisa continua visando entender melhor as vias bioquímicas, a função fisiológica e a biologia das bactérias produtoras deste polímero, visando à regulação da sua formação e composição, e ainda a otimização do processo de produção (CLEMENTI, 1997).

Algumas aplicações de alginatos são detalhadas na Tabela 2. Os principais produtores são Danisco, Dinamarca; Kimitsu e Kibun Cemifa, Japão; Pronova Biopolymer, Noruega, Systems Bio-industries, France; Kelco, USA. E mais algumas produções na china. O preço de venda varia na faixa de U.S. \$ 5-20/Kg para a maior parte das aplicações, mas, para área farmacêutica e produtos com alto teor de pureza são vendidos por até U.S. \$ 40000/Kg (RHEM e VALLA,1997).

Tabela 2 - Aplicações de alginatos produzidos comercialmente.

<i>Aplicação</i>	<i>Função do Alginato</i>
Tinta para impressão têxtil	Fixação, rendimento da cor e brilho
Tratamento de telas (tecido) e papel	Melhorar a uniformidade da superfície
Soldagem	Componente para cobrir materiais para a soldagem. Aumenta a flexibilidade do material e a resistência a quebra
Tratamento de água	Aumenta o tamanho das partículas no processo de floculação
Selamento de latas	Fechamento de latas impermeáveis
Creme de Látex	Concentração de látex natural durante a extração de gomas de plantas
Produtos cerâmicos	Reduz o tempo de secagem da superfície da cerâmica
Alimentos para humanos e animais	Estabilizante; agente de corpo e gelificante
Indústria farmacêutica e biotecnologia	Imobilizador de células; tratamentos de refluxo e dermatológicos; cicatrização de feridas e materiais para impressão dentaria.

Fonte: Rhem e Valla (1997).

2.3 RECUPERAÇÃO DO BIOPOLÍMERO

A recuperação e o processamento adicional dos exopolissacarídeos microbianos (EPS) seguem a tecnologia utilizada no

4.3.2 Ensaios utilizando glicerol como substrato

O planejamento experimental estruturado para avaliar os ensaios utilizando glicerol como substrato foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa foi estruturado um fatorial completo 2^2 , foram obtidas como variáveis respostas a produtividade e fator de bioconversão. Na segunda etapa foi estruturado um Planejamento Composto Central, onde foi obtida como resposta a produtividade.

4.3.2.1 Primeira etapa: Fatorial completo 2^2

Os valores encontrados para as variáveis respostas produtividade e fator de bioconversão estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Planejamento fatorial 2^2 para produção de alginato a partir de glicerol por *Pseudomonas mendocina*.

<i>Experimento</i>	<i>Fatores</i>		<i>P</i>	<i>Yp/s</i>
	A	B		
1	-	-	0,22±0,01	0,84±0,01
2	+	-	0,18±0,01	0,50±0,01
3	-	+	0,17±0,01	0,62±0,11
4	+	+	0,13±0,01	0,46±0,06

Onde A (g.L^{-1}) representa a concentração de glicerol, B (g.L^{-1}) representa a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} . P é a produtividade em g.L^{-1} e Yp/s o fator de bioconversão (gP.gS^{-1}). Tempo de cultivo: 48 h.

A : concentração de glicerol (-) 40 g.L^{-1} ; (+) 80 g.L^{-1}

B :concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (-) 0,7 g.L^{-1} ; (+) 1,4 g.L^{-1}

Nos diagramas de Pareto estão apresentados os efeitos principais e de interação da concentração de glicerol e da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sobre a produtividade (Figura 26) e sobre o fator de bioconversão (Figura 27).

Tanto para a produtividade como para o fator de bioconversão os efeitos principais foram significativos ($p > 0,05$), já a interação entre eles não foi significativa. Observa-se também que os efeitos são negativos nas respostas avaliadas, ou seja, ao aumentar a concentração de substrato ou de nitrogênio no meio de cultivo, a produtividade e o fator de bioconversão diminuirão.

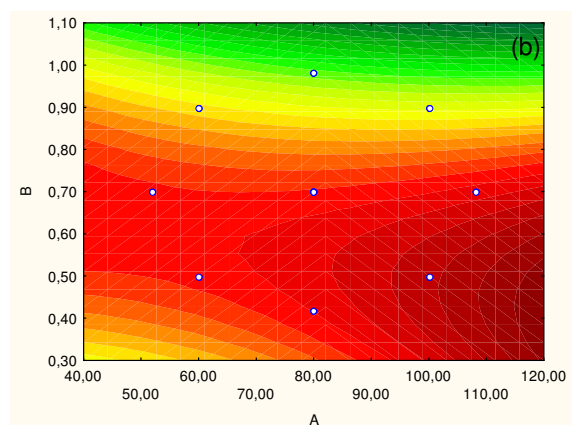
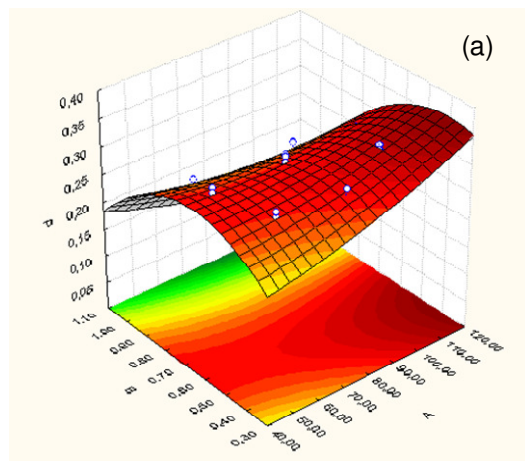


Figura 25 - Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a produtividade (P) em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, onde A é a concentração de glicose em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} .

A Figura 25 apresenta a superfície de resposta e as curvas de contorno, onde observa-se que o aumento da produtividade está diretamente relacionado a concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre $0,418 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,7 \text{ g.L}^{-1}$. Nas condições estudadas a melhor produtividade foi obtida nas concentrações de 100 g.L^{-1} de glicose e $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

processamento de muitos outros polímeros solúveis em água como as gomas de algas ou de plantas. São muitas as técnicas disponíveis para conseguir o isolamento e a purificação das gomas e os métodos utilizados dependem do objetivo do procedimento e do custo. As operações utilizadas para recuperação dos polissacarídeos microbianos frequentemente resultam na purificação e concentração simultaneamente (PACE, 1991).

Um dos problemas encontrados na produção de gomas microbianas é a separação das células do meio viscoso. Algumas culturas requerem uma aplicação prolongada de forças centrífugas da ordem de 75000 a 80000 g para a remoção de células. Em laboratório esse procedimento é possível porque são utilizadas pequenas quantidades de material. Industrialmente, para a maioria de suas aplicações, os biopolímeros são processados sem nenhuma recuperação das células e o produto é obtido através da precipitação com solventes ou sais, por secagem “spray dryer” ou tambor rotativo (SUTHERLAND, 1986).

As células podem ser separadas fisicamente utilizando a centrifugação e a filtração, embora a solução possa ter que ser diluída ou aquecida para diminuir os efeitos da viscosidade sobre a separação. Alternativamente podem ser utilizados métodos químicos ou enzimáticos para degradar as células, que podem ser logo complementados com operações posteriores de purificação/concentração. A eliminação de células é feita quando a presença de células pode afetar o comportamento do produto, o aspecto cosmético em solução ou sua toxicologia. Por exemplo, a presença de células de *Azotobacter* em alginatos microbianos utilizados na obtenção de pastas de impressão pode resultar na formação de precipitados (PACE, 1991).

Algumas técnicas utilizadas para isolar e/ou purificar EPS incluem ultrafiltração, diafiltração, cromatografia de troca iônica, cromatografia por exclusão, centrifugação, diálise, ultrassom e liofilização. As técnicas normalmente utilizadas para precipitação de EPS bacterianos incluem a adição de etanol, acetona, propanol, isopropanol, brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB) e 3,5,6-trifenil-2,3,5,6 tetraaza biciclo-1-hexeno (GOH et al, 2005).

O método mais utilizado para a recuperação primária dos polímeros microbianos é a precipitação utilizando solventes imiscíveis em água, como o isopropanol, etanol, metanol ou acetona (PACE, 1991).

Na recuperação da xantana, como na maior parte dos polímeros precipitados com álcool, os maiores custos estão na recuperação do

álcool utilizado na etapa de precipitação e nas perdas durante o uso do solvente. A quantidade de solvente requerido para precipitação completa também é função da composição do polímero, por exemplo, à medida que a concentração de piruvato na xantana aumenta, a quantidade de álcool requerido para precipitar o polímero aumenta. A precipitação com solventes também resulta na purificação parcial de polímeros por eliminação dos componentes solúveis em álcool (PACE, 1991).

Vários métodos alternativos estão descritos na literatura para a recuperação primária dos polímeros microbianos. Estes se concentram principalmente na produção de uma forma insolúvel do polímero por adição de certos sais ou por ajuste de pH. Por exemplo, o alginato microbiano pode ser recuperado por formação de um sal de cálcio insolúvel ou por acidificação, na forma de ácido algínico. Depois da precipitação, o produto é desidratado mecanicamente e seco. Alternativamente os extratos aquosos que contém a goma podem ser secos diretamente. Neste caso, o produto resultante é relativamente impuro quando comparado com o obtido utilizando-se um método de precipitação (PACE, 1991).

No processo de recuperação, a exposição ao calor e a tensão mecânica podem resultar na modificação ou degradação do produto. Por exemplo, a dessecação rápida a alta temperatura, pode resultar em um produto de baixa solubilidade e características reológicas inferiores, como pode ocorrer com o alginato microbiano. Por outro lado, o aquecimento controlado na produção de xantana pode resultar num produto com reologia melhorada em solução. Os polissacarídeos podem ser tratados fisicamente ou quimicamente durante a recuperação, para mudar sua pureza, reologia e outras propriedades (PACE, 1991).

2.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BIOPOLÍMERO

Os métodos de análises de polissacarídeos complexos baseiam-se, principalmente, na determinação dos constituintes dos resíduos obtidos após a hidrólise química dos polímeros nativos (RUITTER et al., 1992). Esses são compostos de inúmeros resíduos de açúcares interligados por ligações glicosídicas (α e β), que podem diferir consideravelmente na sua suscetibilidade à hidrólise ácida. Ácidos urônicos são frequentemente envolvidos por fortes ligações glicosídicas, particularmente nos tipos de ligações dos ácidos aldobiurônicos (DRUZIAN, 2000).

Os procedimentos empregados para a determinação destes

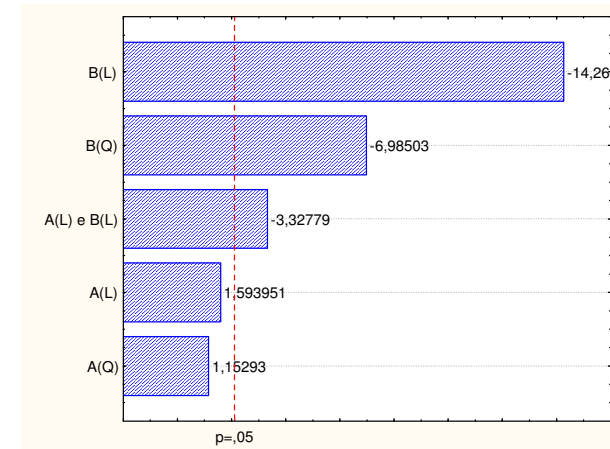


Figura 24 - Diagrama de Pareto para a variável resposta produtividade (P). A- Concentração de glicose em g.L^{-1} e B- Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} . L-termo linear e Q-termo quadrático. O ponto no qual a estimativa dos efeitos é significativa ($p=0,05$) é indicado pela linha pontilhada.

O modelo ajustado para a região experimental é apresentado na Figura 25. O modelo prediz a região experimental com coeficiente de correlação de 0,95. A Tabela ANOVA encontra-se no Anexo B, Tabela B.3.

A equação para a produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) válida para região investigada é (Equação 15):

$$P=0,019+ 0,836B- 0,554B^2 - 0,003AB \quad (\text{Equação 15})$$

Onde: A é a concentração de glicose (g.L^{-1}) e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g.L^{-1}).

Observa-se que o aumento da produtividade está diretamente relacionado ao aumento da concentração de glicose e diminuição da concentração de nitrogênio. O fator de bioconversão foi menor para maiores concentrações de nitrogênio e de glicose.

4.3.1.2 Segunda etapa: Planejamento Fatorial Composto Central

A partir da análise dos resultados dos experimentos realizados na primeira etapa, foi estruturado um segundo planejamento experimental composto central indicado na Tabela 21. O parâmetro avaliado foi a produtividade após 48 horas de cultivo.

Tabela 21 - Planejamento Composto Central, para produção de alginato a partir de glicose por *Pseudomonas mendocina*

Experimento	Fatores		P
	A	B	
1	-1,00	-1,00	0,29 ± 0,01
2	-1,00	1,00	0,25 ± 0,01
3	1,00	-1,00	0,33 ± 0,01
4	1,00	1,00	0,24 ± 0,01
5	-1,41	0,00	0,30 ± 0,01
6	1,41	0,00	0,30 ± 0,01
7	0,00	-1,41	0,31 ± 0,01
8	0,00	1,41	0,18 ± 0,01
9	0,00	0,00	0,30 ± 0,01
10	0,00	0,00	0,29 ± 0,01
11	0,00	0,00	0,29 ± 0,01

Onde A (g.L⁻¹) representa a concentração de glicose, B (g.L⁻¹) representa a concentração de (NH₄)₂SO₄ em g.L⁻¹ e P é a produtividade em g.L⁻¹.h⁻¹. Tempo de cultivo: 48 h.

A : concentração de glicose (-1,41) 51,8 g.L⁻¹; (- 1,00) 60,0 g.L⁻¹; (0,00) 80,0 g.L⁻¹; (+1,00) 100,0 g.L⁻¹; (+1,41) 108,2 g.L⁻¹.

B :concentração de (NH₄)₂SO₄ (-1,41) 0,418 g.L⁻¹; (- 1,00) 0,50 g.L⁻¹; (0,00) 0,70 g.L⁻¹ (+1,00) 0,90 g.L⁻¹ (+1,41) 0,982 g.L⁻¹.

No diagrama de Pareto estão apresentados os efeitos principais e de interação da concentração de glicose e da concentração de (NH₄)₂SO₄, sobre a produtividade (Figura 24).

Entre os fatores avaliados, os termos referentes à concentração de nitrogênio e o termo de interação entre as variáveis tiveram efeito significativo (p>0,05) a concentração de substrato não teve efeito significativo(p<0,05).

constituintes, geralmente, exigem hidrólise antes ou depois de reações de derivações e posterior separação, quantificação e determinação da sequência dos resíduos glicosil e configurações anoméricas dos mesmos por técnicas e/ou métodos cromatográficos como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG) acoplada com espectrofotometria de massa (EM), auxiliada por técnicas de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN) (BOUFAR-ROUPE & HEYRAUD, 1987).

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

Ressonância magnética nuclear (RMN) é um fenômeno de absorção, similar a espectroscopia ultravioleta e de infravermelho, porém a energia do RMN é devido à radiação provocada pela exposição do núcleo a um campo magnético. Desde que 'Purcell e Bloch em 1946 observaram o fenômeno, RMN tem se tornado uma ferramenta indispensável na química para o estudo da estrutura molecular e comportamento de moléculas (SUN, 2004).

Sobre condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência (rf) em uma frequência regida pelas características estruturais da amostra. A absorção é função de determinados núcleos da molécula. Um espectro RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades (SILVERSTEIN, 2007).

Com algum domínio da teoria básica, a interpretação dos espectros de RNM, meramente por inspeção, pode ser feita em mais detalhes do que no caso dos espectros de infravermelho ou de massas (SILVERSTEIN, 2007).

O espectro de hidrogênios em um campo magnético constante, obtido por varredura (CW) ou pelo modo pulsado com transformações de Fourier (FT), é registrado como uma série de picos cujas áreas são proporcionais ao número de hidrogênio que eles representam. As áreas de picos são medidas por um integrador eletrônico que traça uma linha em degraus cujas alturas são proporcionais às áreas dos picos. A contagem dos hidrogênios a partir da integração é útil para determinar ou confirmar fórmulas moleculares, detectar picos sobrepostos, determinar a pureza de amostras e efetuar análises quantitativas. As posições dos picos são medidas em frequência a partir de um pico de referência (SILVERSTEIN, 2007).

2.4.1 Caracterização Reológica

Por definição, reologia é o estudo da deformação e escoamento da matéria. A ciência da reologia cresceu consideravelmente devido a pesquisa e trabalhos feitos com polímeros sintéticos e suas soluções em diferentes solventes, os quais foram necessários devido ao uso de polímeros no dia-a-dia e em aplicações industriais. As propriedades reológicas são baseadas no escoamento e deformação quando o material é exposto a uma tensão (RHAO, 1999).

De acordo com Steffe (1996), podem-se destacar diversas áreas na indústria de alimentos nas quais o conhecimento dos dados reológicos é essencial:

- Cálculos em engenharia de processos, envolvendo grande variedade de equipamentos, tais como bombas, tubulações, extrusores, misturadores, trocadores de calor, dentre outros;
- Determinação da funcionalidade de ingredientes no desenvolvimento de produtos;
- Controle intermediário ou final da qualidade de produtos;
- Testes de tempo de prateleira;
- Avaliação da textura de alimentos e correlação com testes sensoriais.

O conhecimento de alguns conceitos, como viscosidade, comportamento Newtoniano e não Newtoniano são fundamentais para o entendimento dessas características (LEWIS, 1993).

Viscosidade é uma propriedade reológica definida como a medida da fricção interna de um fluido, ou seja, sua resistência a fluir. Ela se torna aparente quando uma camada de fluido move-se em relação à outra camada. Assim, à medida que aumenta a viscosidade do fluido, aumentam as forças de atrito e é necessário mais energia para que haja escoamento. Conseqüentemente, fluidos altamente viscosos requerem maior força para se mover do que materiais menos viscosos (LEWIS, 1993).

A viscosidade depende muito da temperatura sendo, portanto, importante controlá-la durante as determinações experimentais. Os líquidos têm sua viscosidade diminuída com o aumento da temperatura, ao contrário da maioria dos gases, cuja viscosidade aumenta com o aumento da temperatura (LEWIS, 1993).

Define-se a viscosidade aparente (η) como a viscosidade dependente da taxa de deformação $\dot{\gamma}$ (s^{-1}), de acordo com $\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma}$,

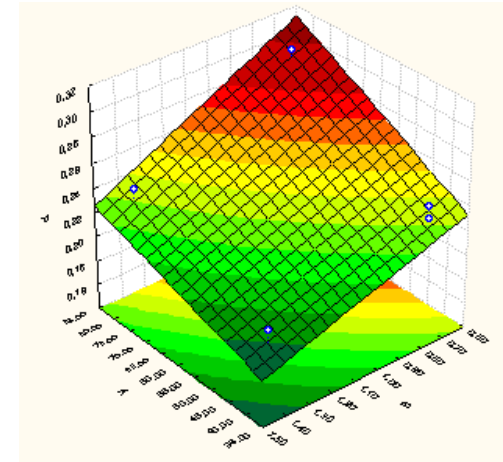


Figura 22 - Superfície de Resposta referente ao efeito da concentração de glicose e concentração de $(NH_4)_2SO_4$ na produtividade (P) em $g.L^{-1}h^{-1}$, onde A é a concentração de glicose em $g.L^{-1}$ e B é a concentração de $(NH_4)_2SO_4$ em $g.L^{-1}$.

A Figura 23 representa a superfície de resposta para o fator de bioconversão. Maiores fatores de bioconversão podem ser obtidas com menores concentrações de glicose e de nitrogênio nas condições propostas.

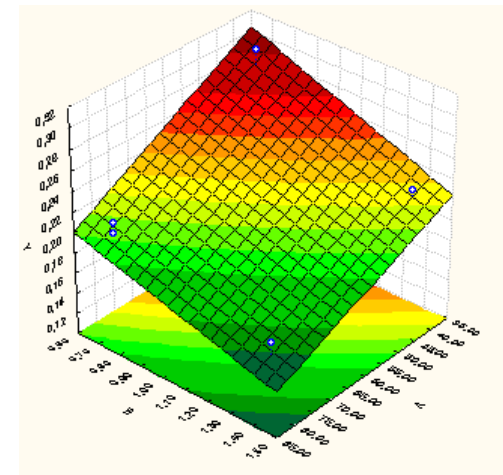


Figura 23 - Superfície de Resposta para o fator de bioconversão (Y) em $gP.gS^{-1}$, onde A é a concentração de glicose em $g.L^{-1}$ e B é a concentração de $(NH_4)_2SO_4$ em $g.L^{-1}$.

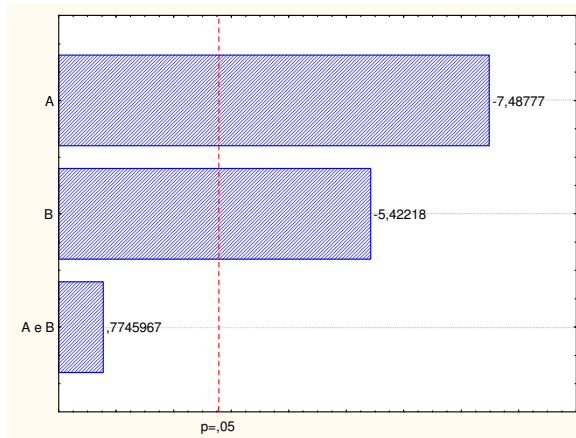


Figura 21 - Diagrama de Pareto para a variável resposta fator de bioconversão (Y).

A- Concentração de glicose e B- Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O ponto no qual a estimativa dos efeitos é significativa ($p=0,05$) é indicado pela linha pontilhada.

A equação para o modelo ajustado referente à produtividade ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$), válida para região investigada é (Equação 13):

$$P = 0,200 + 0,002A - 0,036B \quad (\text{Equação 13})$$

Onde: A é a concentração de glicose (g.L^{-1}) B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g.L^{-1}).

A equação para o modelo ajustado referente ao fator de bioconversão (gP.gS^{-1}) é (Equação 14):

$$Y_{p/s} = 0,44 - 0,002A - 0,107B \quad (\text{Equação 14})$$

Onde: A é a concentração de glicose (g.L^{-1}) B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g.L^{-1}).

A Figura 22 apresenta a superfície de resposta para a produtividade onde observa-se que maiores produtividades podem ser obtidas com maiores concentrações de glicose e menores concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nas condições estabelecidas.

onde σ (Pa) é a tensão de cisalhamento (TONELI et al., 2005).

Os fluidos podem ser classificados como Newtonianos ou não newtonianos, conforme seu comportamento. Assim, para fluidos Newtonianos, a viscosidade independe da taxa de cisalhamento na qual é medida. Portanto, a relação entre a tensão de cisalhamento (σ) e a taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) é uma linha reta, e a viscosidade (μ) permanece constante para taxas de deformação ($\dot{\gamma}$) variadas (LEWIS, 1993).

Fluidos não-Newtonianos são definidos como aqueles onde a relação $\sigma/\dot{\gamma}$ não é uma constante, ou seja, quando a taxa de deformação

varia, a tensão de cisalhamento não varia na mesma proporção (ou necessariamente na mesma direção). Assim, a viscosidade de tais fluidos mudará conforme varie a taxa de deformação. Os fluidos não-Newtonianos classificam-se em independentes do tempo e dependentes do tempo (LEWIS, 1993).

Dentre os fluidos não Newtonianos independentes do tempo temos os pseudoplásticos, os dilatantes e os plásticos. Para os pseudoplásticos, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação. Exemplos mais comuns de fluidos pseudoplásticos incluem tintas, emulsões e dispersões de muitos tipos. Já para os dilatantes, a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de deformação. Como exemplos de comportamentos dilatantes temos caramelo e amido de milho em água. Os fluidos plásticos comportam-se como sólidos sob condições estáticas. Eles apresentam forças internas que o impedem de fluir até certa tensão de cisalhamento, quando então, começam a fluir. Exemplos desse tipo de fluido incluem chocolate, catchup e maionese (LEWIS, 1993).

Os produtos que se comportam como fluidos pseudoplásticos tendem a apresentar um comportamento newtoniano, quando submetidos a grandes gradientes de velocidade, provocado pelo total alinhamento molecular. Por outro lado, sob baixas taxas de deformação, a distribuição, completamente casual das partículas, também induz a esse tipo de comportamento (TONELI et al., 2005).

Os fluidos pseudoplásticos, durante o escoamento, podem apresentar três regiões distintas: região de baixas taxas de deformação, região de taxas de deformação médias e região de altas taxas de deformação. Na região newtoniana de baixas taxas de deformação, a viscosidade aparente (η_0), chamada de viscosidade limitante à taxa de deformação zero, não varia com a taxa de deformação aplicada. Na região de taxas de deformação médias, a viscosidade aparente (η)

diminui com o aumento da taxa de deformação (comportamento pseudoplástico) e, na região de altas taxas de deformação, a viscosidade aparente (η_{∞}) volta a ficar constante e é chamada de viscosidade limitante a taxas de deformação infinitas (TONELI et al., 2005).

A descrição do comportamento reológico dos materiais é feita através de modelos que relacionam como a tensão de cisalhamento varia com a taxa de deformação. Dentre os modelos matemáticos existentes, alguns dos mais aplicados para sistemas de alimentos são: Ostwald-De-Waele (Lei da Potência), Plástico de Bingham, Herschel-Bulkley e Casson (TONELI et al., 2005).

A principal característica reológica apresentada pela maior parte dos fluidos de cultivo de polissacarídeos é a sua extrema viscosidade a concentrações relativamente baixas de produto e comportamento pseudoplástico. À medida que aumenta a concentração de produto durante o crescimento descontínuo, tanto a viscosidade como a natureza pseudoplástica do meio de cultura aumentam. Em alguns casos, como nos cultivos da pululana e do alginato com *Azotobacter vinelandii*, a viscosidade do fluido de cultivo pode diminuir até o final do cultivo devido à atividade da polimerase. (PACE, 1991).

De acordo com Schramm (2006), soluções poliméricas com longas cadeias entrelaçadas e enoveladas quando em repouso, têm suas moléculas numa ordem interna irregular que se caracteriza por uma considerável resistência interna ao fluxo, ou seja, uma elevada viscosidade. Com o aumento das taxas de cisalhamento, há uma ordenação ou alinhamento das partículas, na direção do fluxo, provavelmente por ter as interações desfeitas. Além disso, ainda segundo o mesmo autor, o cisalhamento também pode induzir a quebra de agregados, auxiliando o material a escoar mais rapidamente.

As propriedades reológicas dos polissacarídeos em solução dependem de suas características físico-químicas intrínsecas, isto é, peso molecular, polidispersividade e grau de substituição. No caso dos polissacarídeos microbianos essas propriedades físico-químicas, bem como a eficiência de produção estão relacionadas ao processo fermentativo, linhagem bacteriana, composição do meio, pH, temperatura e outras variáveis ambientais do cultivo. Fenômenos de transporte e mistura dos nutrientes no fermentador são os fatores que mais influenciam a biossíntese do biopolímero (LEWIS, 1993).

A máxima produtividade e concentração do produto que pode ser obtida em processos bioquímicos são limitadas pelos fenômenos de transportes durante o processo, os quais são influenciados pelo grau de agitação e condições hidrodinâmicas do processo. Estes parâmetros

bioconversão (Figura 21).

Para a produtividade, os efeitos principais foram significativos ($p > 0,05$) sendo que a concentração de glicose tem efeito positivo na produtividade e a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tem efeito negativo, ou seja, aumentando a concentração de substrato e diminuindo a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a produtividade aumentou, nas condições estudadas.

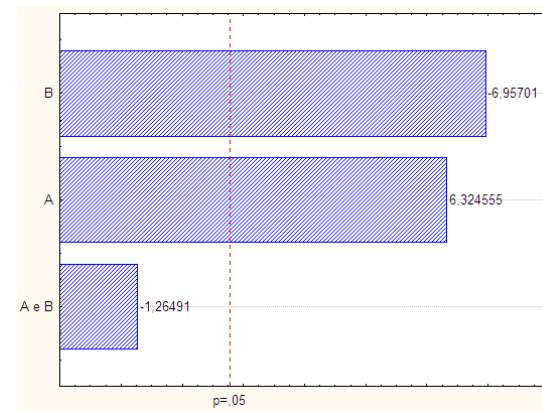


Figura 20 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produtividade (P).

A- Concentração de Glicose em g.L^{-1} e B- Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} . O ponto no qual a estimativa dos efeitos é significativa ($p=0,05$) é indicado pela linha pontilhada.

Para o fator de bioconversão, os efeitos principais foram significativos ($p > 0,05$) e a interação entre eles não foi significativa. Os parâmetros avaliados tiveram efeitos negativos, ou seja, aumentando a concentração de substrato e a concentração de nitrogênio há uma diminuição no valor do fator de bioconversão nas condições estudadas como se pode observar na Figura 21.

Considerando os fatores significativos para os parâmetros avaliados, foi ajustado um modelo para a região experimental. Os modelos predizem a região experimental com coeficientes de correlação $R^2 = 0,96$ tanto para a produtividade quanto para o fator de bioconversão. A Tabela ANOVA para a produtividade é mostrada no Anexo B Tabela B.1 e para o fator de bioconversão Anexo B Tabela B.2.

foram estruturados planejamentos experimentais 2^2 . Os fatores avaliados foram concentração de substrato (glicose, sacarose ou glicerol) e concentração de nitrogênio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nestes experimentos foram obtidas como variável resposta a produtividade em alginato ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$) e o fator de bioconversão do substrato em alginato (gP.gS^{-1}), após 48 horas de cultivo. Os ensaios foram realizados em duplicata ou triplicata.

4.3.1 Ensaios utilizando glicose como substrato

O planejamento experimental para avaliar os ensaios utilizando glicose como substrato foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa foi estruturado um fatorial completo 2^2 , onde foram obtidas como respostas a produtividade e o fator de bioconversão. Na segunda etapa foi estruturado um Planejamento Composto Central, onde foi obtida como resposta a produtividade.

4.3.1.1 Primeira etapa: Fatorial completo 2^2

Os valores observados para as respostas produtividade e fator de bioconversão estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Planejamento fatorial 2^2 para produção de alginato a partir de glicose por *Pseudomonas mendocina*.

Experimento	Fatores		P	$Y_{p/s}$
	A	B		
1	-	-	0,24± 0,01	0,29± 0,02
2	+	-	0,30± 0,01	0,21± 0,01
3	-	+	0,19± 0,01	0,23± 0,01
4	+	+	0,23± 0,01	0,16± 0,01

Onde A (g.L^{-1}) representa a concentração de glicose, B (g.L^{-1}) representa a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} . P é a produtividade em alginato dada por g.L^{-1} e $Y_{p/s}$ é o fator de bioconversão (gP.gS^{-1}). Tempo de cultivo: 48 h.

A : concentração de glicose (-) 40 g.L^{-1} ; (+) 80 g.L^{-1}

B :concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (-) 0,7 g.L^{-1} ; (+) 1,4 g.L^{-1}

Nos diagramas de Pareto estão apresentados os efeitos principais e de interação da concentração de glicose e da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre a produtividade (Figura 20) e sobre o fator de

estão relacionados com as características do escoamento do fluido que determinam a transferência de massa (oxigênio, fonte de carbono e outros nutrientes) e transferência de calor em biorreatores (AL-ASHEH et al, 2002). O estudo das propriedades reológicas do meio de cultura é a chave para aumentar o rendimento de produtos obtidos de micro-organismos (ALVES et al., 2010).

Meios de cultura contendo micro-organismos unicelulares de formas simples deveriam se comportar como fluidos Newtonianos. Entretanto, na maior parte dos cultivos microbianos os meios de cultura são muito mais complexos e os desvios do comportamento Newtoniano são significativos. Em muitos casos, o meio de cultura exibe diferentes tipos de comportamento dependendo do estágio de desenvolvimento durante o cultivo. Em grande parte de processos industriais, o meio de cultivo apresenta comportamento pseudoplástico (ALVES et al., 2010). Por exemplo, polissacarídeos microbianos como xantana, pululana, dextrana e alginatos.

A viscosidade do meio de cultura pode ser influenciada por parâmetros físicos, bem como biológicos, incluindo o meio de cultivo utilizado, o tamanho das células e dos aglomerados de células formados, a concentração da biomassa, parâmetros morfológicos e o produto sendo secretado na solução (AL-ASHEH et al., 2002).

Mancini et al. (1996), caracterizaram reologicamente soluções aquosas de alginato com diferentes concentrações de blocos de ácidos manurônicos e ácidos gulurônicos extraídos de *Macrocystis pyrifera* (61 % p/p de manuronato) em concentrações (na solução) alta (HV), média (MV) e baixa (LV) e extraído de *Laminaria hyperborea* (69 % p/p de guluronato) a 35°C. Maiores valores de viscosidade aparente (900 mPa.s), foram obtidos para alginatos com alta concentração de resíduos manurônicos (HV) variando a taxa de deformação de 1 a 1000 s^{-1} , e menores valores de viscosidade aparente foram encontrados para alginatos obtidos de *Laminaria hyperborea* com altos conteúdo de resíduos G na faixa de 40 mPa.s na mesma variação da taxa de deformação. O índice de consistência (K) foi encontrado como uma função da temperatura e da concentração, enquanto que mudanças no índice de fluxo com a temperatura foram estatisticamente negligenciáveis.

Kayacier e Dogan (2006), relatam valores de viscosidade aparente na faixa de 900, 1500, 4000 e 9000 mPa.s, para soluções aquosas com concentrações de alginato de 0,25 %, 0,5 %, 0,75 % e 1 % respectivamente. O índice de fluxo diminuiu conforme aumentou a concentração de alginato no meio, variando de 0,437 para concentração

de 0,25 % a 0,266 para concentração de 1 %. O índice de consistência aumentou com o aumento da concentração de alginato, variando de 322.75 mPaⁿ para concentrações de 0,25 % até 1827 mPaⁿ para concentrações de 1% de alginato na solução.

Clementi et al (1998), estudaram o comportamento reológico de soluções aquosas de alginato sintetizado por *A.vinelandii*, com diferentes massas molares (40 kDa, 64 kDa, 116 kDa, 178 kDa e 193 kDa), e concentrações (0,5 e 1 % p/v) as quais exibiram comportamento pseudoplástico. Maiores valores de viscosidade aparente foram encontrado para soluções aquosas a 1% p/v de alginato com peso molecular de 193 kDa. Para esta concentração a viscosidade aparente foi na faixa de 1000 mPa.s em uma variação da taxa de deformação de 10 a 1000 s⁻¹.

2.4.2 Viscoelasticidade

Viscoelasticidade é uma das propriedades reológicas mais simples de substâncias de comportamento reológico complexo, como são os biopolímeros. Soluções de biopolímeros com interesse de aplicação comercial exibem propriedades viscoelásticas, isto é, a capacidade de formar géis verdadeiros em baixas concentrações, apresentando, portanto, características intermediárias entre sólidos e fluidos. Assim, apresentam propriedades viscosas e elásticas que se manifestam ao mesmo tempo e quando cessa a tensão de cisalhamento, a deformação do material não diminui imediatamente até zero (LEWIS, 1993).

Muitos alimentos, tais como massa de pão, queijo e produtos gelatinosos são descritos como viscoelásticos. Porém, o comportamento de muitos destes produtos é extremamente complexo, sendo empregadas, para sua análise, cinco técnicas principais: relações deformação-tempo; relação da tensão para um cisalhamento constante; utilização do efeito Weissenberg; técnicas oscilatórias e métodos empíricos (LEWIS, 1993).

A partir dos valores dos parâmetros descritos na Tabela 18, pode se observar que não houve diferença no aumento populacional máximo devido ao uso de diferentes concentrações de sacarose ou de nitrogênio. A fase lag foi maior para meios de cultivo com maiores concentrações de nitrogênio e maiores concentrações de substrato. A velocidade específica máxima de crescimento foi menor para ensaios utilizando maiores concentrações de sacarose (80 g.L⁻¹).

A Tabela 19 apresenta a concentração de alginato no meio após 48 horas. A maior concentração foi 19,36 g.L⁻¹, obtida utilizando concentrações de 80 g.L⁻¹ de sacarose e 0,7 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄.

Tabela 19 - Resumo dos dados obtidos nas culturas realizadas com sacarose como fonte de carbono para a produção de alginato.

S	N	pH inicial	pH final	C
40	0,7	7,2	6	12,91 ± 2,01
40	1,4	7,2	6,1	8,39 ± 0,37
80	0,7	7,2	6,2	19,36 ± 1,11
80	1,4	7,1	6,2	9,92 ± 0,75

Onde S é a concentração inicial de sacarose em g.L⁻¹, N é a concentração de (NH₄)₂SO₄ em g.L⁻¹ e C é a concentração de alginato em g.L⁻¹.

Maiores concentrações de nitrogênio, diminuíram consideravelmente a concentração de alginato no meio, confirmando o descrito por Müller (1997), onde constatou-se em seus estudos que, concentrações maiores de sulfato de amônio (1,0 g.L⁻¹), diminuíram sensivelmente a concentração de alginato e apresentou-se como o efeito mais significativo.

Diferentes concentrações de substrato, de nitrogênio e a utilização de diferentes substratos não influenciaram no aumento populacional máximo. Não houve influencia do substrato utilizado na velocidade específica máxima de crescimento e nem no tempo da fase lag, que variou de 1,20 a 2,60 h.

4.3 AVALIAÇÃO DE SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE ALGINATO UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL

Para avaliar o efeito de diferentes substratos, concentrações de substrato e concentração de nitrogênio sobre a produção de alginato

Comparando os modelos Gompertz Modificado, Logístico, Logístico Modificado e Baranyi através dos índices estatísticos, parâmetros obtidos e visualmente, o modelo que melhor descreveu a curva de crescimento de *Pseudomonas mendocina* utilizando sacarose como substrato foi Gompertz Modificado.

A Tabela 17 apresenta os índices estatísticos encontrados para o modelo Gompertz Modificado, utilizado para modelar a curva de crescimento do micro-organismo nas condições estudadas. Os coeficientes de correlação (R^2) foram superiores a 0,98, os valores para o MSE foram próximos a zero e os valores para o fator Bias e Exatidão foram próximos a 1, apresentando um bom ajuste às curvas de crescimento.

Tabela 17 - Valores dos índices estatísticos para o modelo Gompertz Modificado aplicado às curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* em meios com sacarose como fonte de carbono. onde S é a concentração de sacarose g.L^{-1} e N é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} .

S	N	R^2	MSE	Fator Bias	Fator Exatidão
40	0,7	0,99	0,011	1,006	1,028
40	1,4	0,99	0,013	0,995	1,020
80	0,7	0,98	0,049	1,048	1,341
80	1,4	0,98	0,049	1,048	1,089

MSE: Erro médio Quadrático; R^2 : coeficiente de correlação.

A partir das curvas ajustadas pelo modelo Gompertz Modificado (Figura 19) obtiveram-se os parâmetros de crescimento λ , μ e A, apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo modelo Gompertz Modificado aplicado às curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* em meios com sacarose em diferentes concentrações como fonte de carbono.

S	N	A	λ	$\mu_{m\acute{a}x}$
40	0,7	4,75	1,26	0,44
40	1,4	4,63	2,18	0,48
80	0,7	4,87	2,00	0,31
80	1,4	4,62	2,40	0,29

onde S é a concentração de sacarose g.L^{-1} e N é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} . A: aumento logarítmico da população; λ : duração da fase lag (h); $\mu_{m\acute{a}x}$: velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}).

CAPÍTULO III MATERIAL E MÉTODOS

após 48 horas de cultivo a concentração de substrato no meio era em torno de 25% da concentração inicial. A concentração de nitrogênio não influenciou na curva de consumo de substrato (Figura 18).

Através das curvas de crescimento microbiano apresentadas na Figura 19 pode-se observar que não houve influência das concentrações estudadas de nitrogênio sobre o crescimento do micro-organismo. Comparando as Figuras 18 e 19, o consumo de substrato foi maior durante a fase exponencial de crescimento e continuou sendo alto no início da fase estacionária, como pode-se observar também nos ensaios utilizando glicose como substrato.

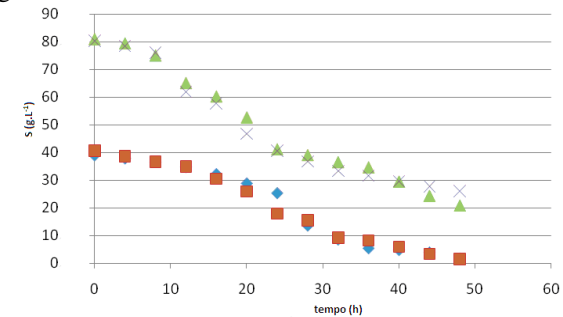


Figura 18 - Curva de consumo de sacarose onde S é a concentração de sacarose em g.L^{-1} e N é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} \bullet S= 40 g.L^{-1} com N= 0,7 g.L^{-1} \blacksquare S= 40 g.L^{-1} com N=1,4 g.L^{-1} \blacktriangle S= 80 g.L^{-1} com N=0,7 g.L^{-1} e \times S= 80 g.L^{-1} com N=1,4 g.L^{-1} .

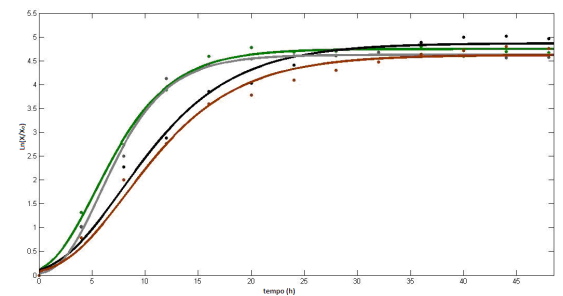


Figura 19 - Curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs tempo onde S é a concentração de sacarose em g.L^{-1} e N é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} : — S = 40 g.L^{-1} com N= 0,7 g.L^{-1} — S = 40 g.L^{-1} com N= 1,4 g.L^{-1} — S= 80 g.L^{-1} com N= 0,7 g.L^{-1} — S= 80 g.L^{-1} com N= 1,4 g.L^{-1} .

As linhas representam os dados experimentais ajustados ao Modelo Gompertz Modificado, com auxílio do software Matlab 7.0.

A partir dos valores dos parâmetros descritos na Tabela 15, pode-se observar que não houve diferença no aumento populacional máximo devido ao uso de diferentes concentrações de glicerol ou de nitrogênio. A fase lag foi em torno de 2,10 a 2,55 h para todas as concentrações estudadas. A velocidade específica máxima de crescimento ficou entre 0,38 e 0,47 h⁻¹ para todas as concentrações de glicerol e de nitrogênio estudadas.

A Tabela 16 apresenta a concentração de alginato no meio de cultura após 48 horas. A maior concentração foi 10,32 g.L⁻¹, obtida utilizando concentrações de 40 g.L⁻¹ de glicerol e 0,7 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄.

No período de 48 horas, o consumo de glicerol foi muito inferior aos ensaios que utilizaram glicose ou sacarose como substrato. Com glicerol, em torno de 20% do substrato inicial foi consumido durante o cultivo. Embora o consumo do glicerol tenha sido baixo, o crescimento do micro-organismo em glicerol foi similar ao ocorrido na presença de sacarose e glicose. Os valores referentes à concentração de alginato no meio (Tabela 16) também foram próximas as observadas para ensaios com glicose e sacarose. Isso pode ser atribuído à necessidade do micro-organismo em utilizar uma rota metabólica alternativa para consumo do glicerol, o que acarreta em um maior tempo necessário para o consumo total do substrato. O mecanismo da síntese de alginato utilizando glicerol como substrato ainda não foi investigado.

Tabela 16 - Resumo dos dados obtidos nas culturas realizadas com glicerol como fonte de substrato para a produção de alginato.

S	N	pH inicial	pH final	C
40	0,7	7,2	7,0	10,32 ± 0,76
40	1,4	7,2	6,9	7,63 ± 0,42
80	0,7	7,2	7,0	8,19 ± 0,53
80	1,4	7,2	7,0	5,89 ± 0,31

Onde S é a concentração inicial de glicerol em g.L⁻¹, N é a concentração de (NH₄)₂SO₄ em g.L⁻¹ e C é a concentração de alginato em g.L⁻¹.

4.2.3 Ensaios utilizando sacarose como substrato

Pode-se observar na Figura 18 que após 48 horas de cultivo, para ensaios com a concentração de sacarose de 40 g.L⁻¹, todo o substrato já havia sido consumido. Para as concentrações de 80 g.L⁻¹ de sacarose,

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO

O micro-organismo utilizado foi *Pseudomonas mendocina* M13 (CCT2245), um mutante isolado através da técnica de resistência ao antibiótico carbenicilina (MÜLLER, 1997). Este micro-organismo foi mantido em refrigeração a 4°C em tubos inclinados e placas de Petri ambos contendo o meio descrito no item 3.2.

3.2 MEIOS DE CULTURA

O meio utilizado para manutenção foi composto de (g.L⁻¹): sacarose (1,0), KH₂PO₄ (0,3), Na₂HPO₄ (0,5), peptona (0,25) e MgSO₄.7H₂O (0,25). Foram preparados 100 mL de meio suplementado com 2 % de ágar vertido em placas de Petri ou tubos inclinados. Os tubos foram colocados em estufa a 30° C por 24 h e, em seguida, mantidos em refrigeração a 4° C para uso posterior. O pH foi ajustado a 7,0 com adição de NaOH.

Os experimentos foram realizados após uma pré-cultura para reativação do micro-organismo, sendo o meio composto de 1,3 g de caldo nutriente em 100 mL de água destilada.

O meio utilizado para a produção do biopolímero foi similar ao utilizado por Müller (1997) com os seguintes constituintes (em g.L⁻¹):

- Fonte de carbono composta por glicose, sacarose ou glicerol em diferentes concentrações conforme descrito no planejamento experimental;
- (NH₄)₂SO₄ em concentrações de 0,7 g.L⁻¹ ou em diferentes concentrações conforme descrito no planejamento experimental;
- Extrato de levedura (0,1), MgSO₄.7H₂O (0,1), CaCl₂(0,1); MnSO₄.7H₂O (0,86 x10⁻³), ZnSO₄.7H₂O (0,2x10⁻³), CoCl₂.6H₂O (0,28x10⁻³), FeSO₄.7H₂O (3,6x10⁻³);
- 12,5 g/L de Na₂HPO₄; 3 g/L de KH₂PO₄ (tampão fosfato 0,11 M a pH 7,0).

3.3 CULTIVOS

3.3.1 Culturas em frascos agitados

Todos os experimentos foram realizados a partir de culturas isoladas em placas de Petri ou tubos inclinados por esgotamento, sendo inoculados com duas alças de células.

Os meios para a pré-cultura foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C. Foram colocados 100 mL de meio em erlenmeyers de 500 mL sem defletores. Após a esterilização, foram incubados em agitador rotatório a 240 rpm na temperatura de 30°C.

Os meios para produção do biopolímero foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C. A fonte de carbono foi esterilizada separadamente, junto ao cálcio. Foram colocados 125 mL de meio em erlenmeyers de 500 mL sem defletores. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 240 rpm na temperatura de 30°C. Foi adicionado ao meio de cultura 0,5 mL de inóculo padronizado em espectrofotômetro ajustando a densidade óptica entre 2,5 a 3,0 em 600 nm.

3.3.2 Curva de crescimento do micro-organismo na pré-cultura.

Foram retiradas amostras de 1 mL da pré-cultura a cada duas horas de forma asséptica. O crescimento microbiano foi acompanhado através de medidas de densidade óptica (DO) em um espectrofotômetro SP-1105 Spectrum no comprimento de onda de 600 nm contra um branco constituído de meio sem o inóculo. Foi estimada a faixa de concentração ideal de biomassa na pré-cultura para padronizar o inóculo. Para a inoculação foi retirado 0,5 mL da pré-cultura e adicionado ao meio para produção do biopolímero. As análises foram realizadas em duplicatas.

3.3.3 Experimentos para produção de alginato

3.3.3.1 Ensaios iniciais

Em um conjunto inicial de experimentos foram efetuadas análises da concentração da biomassa e do consumo de substrato. Nestes cultivos o objetivo principal foi determinar o tempo necessário para que a maior parte ou todo o substrato fosse consumido.

A determinação da biomassa foi feita de acordo com o item 3.4.1. Comparando os modelos Gompertz Modificado, Logístico, Logístico Modificado e Baranyi através dos índices estatísticos, parâmetros obtidos e visualmente, o modelo que melhor descreveu a curva de crescimento de *Pseudomonas mendocina* utilizando glicerol como substrato foi Gompertz Modificado.

A Tabela 14 apresenta os índices estatísticos para o modelo Gompertz Modificado, os coeficientes de correlação (R^2) foram superiores a 0,95, os valores para o MSE foram próximos a zero e os valores para o fator Bias e Exatidão foram próximos a 1, apresentando um bom ajuste às curvas de crescimento.

A partir das curvas ajustadas pelo modelo Gompertz Modificado (Figura 17) obtiveram-se os parâmetros de crescimento λ , μ e A , apresentados na Tabela 15.

Tabela 14 - Valores dos índices estatísticos para o modelo Gompertz Modificado aplicado às curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* em meios com glicerol como fonte de carbono.

<i>S</i>	<i>N</i>	R^2	<i>MSE</i>	<i>Fator Bias</i>	<i>Fator Exatidão</i>
40	0,7	0,95	0,122	1,072	1,134
40	1,4	0,95	0,1425	0,998	1,051
80	0,7	0,95	0,151	1,087	1,148
80	1,4	0,96	0,110	1,057	1,129

Onde *S* é a concentração de glicerol g.L⁻¹ e *N* é a concentração de (NH₄)₂SO₄ em g.L⁻¹.
MSE: Erro médio Quadrático; R^2 : coeficiente de correlação.

Tabela 15 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo modelo Gompertz Modificado aplicado às curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* em meios com glicerol em diferentes concentrações como fonte de carbono.

<i>S</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	λ	$\mu_{m\acute{a}x}$
40	0,7	4,63	2,20	0,42
40	1,4	4,97	2,40	0,47
80	0,7	4,53	2,10	0,38
80	1,4	4,72	2,55	0,41

Onde *S* é a concentração de glicerol g.L⁻¹ e *N* é a concentração de (NH₄)₂SO₄ em g.L⁻¹.
A: aumento logarítmico da população; λ : duração da fase lag (h); $\mu_{m\acute{a}x}$: velocidade específica máxima de crescimento (h⁻¹).

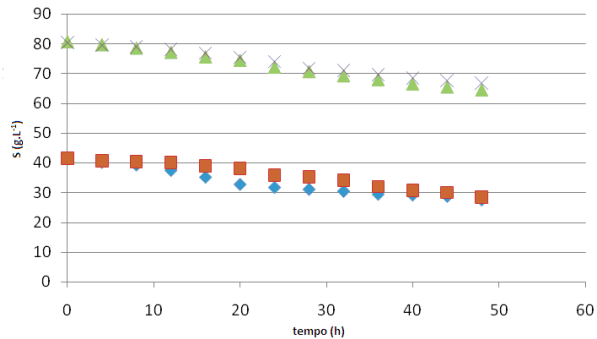


Figura 16 - Curva de consumo do substrato, onde S é a concentração de glicerol em g.L^{-1} e N é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} \bullet S= 40 g.L^{-1} com N= 0,7 g.L^{-1} \blacksquare S= 40 g.L^{-1} com N=1,4 g.L^{-1} \blacktriangle S= 80 g.L^{-1} com N=0,7 g.L^{-1} e \times S= 80 g.L^{-1} com N=1,4 g.L^{-1} .

Através das Figuras 16 e 17, observa-se que não houve influência das concentrações de nitrogênio e de glicerol no crescimento do micro-organismo. O consumo de substrato não foi maior durante a fase exponencial de crescimento, como se pode observar nos ensaios utilizando glicose e sacarose como substrato.

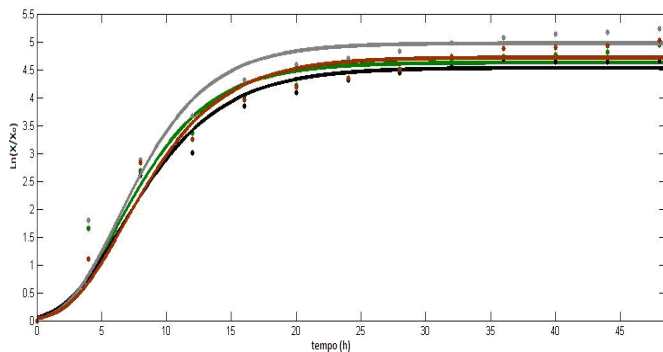


Figura 17 - Curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs tempo onde S é a concentração de glicerol em g.L^{-1} e N é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} — S = 40 g.L^{-1} com N= 0,7 g.L^{-1} — S = 40 g.L^{-1} com N= 1,4 g.L^{-1} — S= 80 g.L^{-1} com N= 0,7 g.L^{-1} — S= 80 g.L^{-1} com N= 1,4 g.L^{-1} . As linhas representam os dados experimentais ajustados ao Modelo Gompertz Modificado, com auxílio do software Matlab 7.0.

Foram retiradas amostras de 2 mL no tempo inicial para leitura da absorbância, pH, concentração de substrato (sacarose, glicose e glicerol) e de 1 mL durante o cultivo para leitura de absorbância e consumo de substrato. No último ponto foram retirados 15 mL para quantificação de alginato formado, além de leitura da absorbância, pH e concentração de substrato.

3.3.4 Planejamento Experimental

Com base nos ensaios preliminares foi estruturado um planejamento experimental para cada substrato, avaliando as diferentes concentrações de carbono e nitrogênio limitando-se o tempo de cultivo em 48 h. Foi utilizada a metodologia de Planejamento Experimental para verificar o efeito da concentração de nitrogênio e de substrato na produtividade do processo.

O planejamento experimental foi realizado em duas etapas. Na primeira empregou-se um fatorial 2^2 completo (Tabela 3) onde foram avaliados o efeito da concentração dos substratos e da concentração de sulfato de amônio sobre a produtividade e também o fator de bioconversão de substrato em alginato.

A segunda etapa, definida a partir das avaliações realizadas no primeiro conjunto de experimentos, empregou-se um planejamento fatorial completo (2^2), com triplicata do ponto central e quatro pontos axiais perfazendo um total de 11 ensaios para cada substrato (glicose, sacarose e glicerol). O planejamento descrito é também usualmente reportado como planejamento estrela e extensamente utilizado como metodologia de superfície de resposta.

Na Tabela 3 é apresentado o fatorial 2^2 utilizado nos primeiros experimentos para os três substratos utilizados (glicose, sacarose e glicerol). As variáveis independentes foram a concentração de substrato (g.L^{-1}) e a concentração de nitrogênio (g.L^{-1}), enquanto as variáveis dependentes (respostas) foram a produtividade e o fator de bioconversão.

Na primeira etapa do planejamento, foram acompanhados o crescimento celular e o consumo de substrato com amostragem a cada 4 h durante o processo de biossíntese, conforme metodologia descrita nos itens 3.4.1 e 3.4.2.

Tabela 3 - Fatorial 2^2 onde: A - concentração do substrato (glicose, sacarose ou glicerol) em g.L^{-1} . B - concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} .

Variáveis	Níveis	
	-1	+1
A	40	80
B	0,7	1,4

Após a análise estatística dos dados experimentais no programa Statistica 6.0 foram definidos novos níveis do planejamento para cada substrato, conforme a segunda etapa. Na Tabela 4 estão apresentados os níveis para o planejamento estrela para a glicose, na Tabela 5 para o glicerol e na Tabela 6 para a sacarose.

Tabela 4 - Planejamento composto central, onde A - Concentração de glicose em g.L^{-1} B - Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} .

Variáveis	Valores Codificados				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
A	51,8	60	80	100	108,2
B	0,418	0,5	0,7	0,9	0,982

Tabela 5 - Planejamento composto central, onde A - Concentração de sacarose em g.L^{-1} . B - Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} .

Variáveis	Valores Codificados				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
A	51,8	60	80	100	108,2
B	0,418	0,5	0,7	0,9	0,982

Tabela 6 - Planejamento composto central, onde A - Concentração de glicerol g.L^{-1} . B- Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} .

Variáveis	Valores Codificados				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
A	11,8	20	40	60	68,2
B	0,418	0,5	0,7	0,9	0,982

Tabela 12 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo modelo Gompertz Modificado aplicado às curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* em meios com glicose em diferentes concentrações como fonte de carbono.

S	N	A	λ	$\mu_{\text{máx}}$
40	0,7	4,48	1,20	0,49
40	1,4	4,69	1,60	0,49
80	0,7	4,60	2,20	0,29
80	1,4	4,55	2,60	0,41

Onde S é a concentração de glicose g.L^{-1} e N é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} . A: aumento logarítmico da população; λ : duração da fase lag (h); $\mu_{\text{máx}}$: velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}).

A Tabela 13 apresenta a concentração de alginato no meio após 48 horas. A maior concentração foi $14,56 \text{ g.L}^{-1}$, obtida utilizando concentrações de 80 g.L^{-1} de glicose e $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Tabela 13 - Resumo dos dados obtidos nas culturas realizadas com glicose como fonte de substrato para a produção de alginato.

S	N	pH inicial	pH final	C
40	0,7	7,2	5,9	$11,26 \pm 0,25$
40	1,4	7,2	6,2	$8,73 \pm 0,21$
80	0,7	7,2	5,3	$14,56 \pm 0,59$
80	1,4	7,3	6,0	$11,66 \pm 1,19$

Onde S é a concentração inicial de glicose em g.L^{-1} , N é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} e C é a concentração de alginato em g.L^{-1} .

4.2.2 Ensaios utilizando glicerol como substrato

A quantificação do glicerol presente no meio de cultura foi realizada de acordo com o item 3.4.2.3. A Figura 16 apresenta as curvas de concentração de glicerol no meio de cultura em um período de 48 h, variando a concentração de substrato e de nitrogênio. A concentração de nitrogênio não influenciou no consumo de substrato.

Comparando os modelos Gompertz Modificado, Logístico, Logístico Modificado e Baranyi através dos índices estatísticos, parâmetros obtidos e visualmente, O modelo que melhor descreveu o crescimento de *Pseudomonas mendocina* utilizando glicose como substrato foi Gompertz Modificado.

Os índices estatísticos para o ajuste do Modelo Gompertz Modificado às curvas de crescimento, estão apresentados na Tabela 11. Os coeficientes de correlação (R^2) foram superiores a 0,98, os valores para o MSE foram próximos a zero e os valores para o fator Bias e Exatidão foram próximos a 1, apresentando um bom ajuste às curvas de crescimento.

Tabela 11 - Valores dos índices estatísticos para o modelo Gompertz Modificado aplicado às curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* em meios com glicose como fonte de carbono, onde S é a concentração de glicose g.L^{-1} e N é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} .

S	N	R^2	MSE	Fator Bias	Fator Exatidão
40	0,7	0,98	0,033	1,009	1,053
40	1,4	0,98	0,043	0,992	1,021
80	0,7	0,98	0,033	1,023	1,062
80	1,4	0,96	0,106	1,018	1,094

MSE: Erro médio Quadrático; R^2 : coeficiente de correlação.

A partir das curvas ajustadas pelo modelo Gompertz Modificado (Figura 15) obtiveram-se os parâmetros de crescimento λ , μ e A, apresentados na Tabela 12.

A partir dos valores dos parâmetros descritos na Tabela 12, pode-se observar que não houve diferença no aumento populacional máximo devido ao uso de diferentes concentrações de glicose ou de nitrogênio. A fase lag foi maior para meios de cultivo com maiores concentrações de substrato. A velocidade específica máxima de crescimento foi menor para ensaios utilizando 80 g.L^{-1} de glicose e $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.4.1 Determinação da concentração de biomassa

A concentração de biomassa das amostras foi determinada através da leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm, em um espectrofotômetro SP-1105 Spectrum.

3.4.1.1 Modelagem do crescimento microbiano

Os modelos primários utilizados para o ajuste das curvas de crescimento foram: modelo de Gompertz Modificado, modelo Logístico, modelo Logístico Modificado e modelo de Baranyi.

Os modelos foram utilizados para derivar uma expressão para as grandezas biológicas de formação de biomassa e foram comparados estatisticamente. As grandezas, velocidade específica máxima de crescimento [$\mu_{\text{máx}}(\text{h}^{-1})$], duração da fase lag [$\lambda(\text{h})$] e o aumento logarítmico da população (A), foram apresentados para o modelo que melhor se ajustou às curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina*.

3.4.1.1.1 Modelo de Gompertz Modificado

O modelo de Gompertz Modificado é a reparametrização do modelo de Gompertz e é expresso pela Equação 1 (ERKMEN, 2000):

$$\text{Ln}\left(\frac{X}{X_0}\right) = A \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{\text{máx}} \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: $\text{Ln}\left(\frac{X}{X_0}\right)$ é o logaritmo neperiano do aumento da densidade celular no tempo t, t é o tempo em horas, sendo que X_0 é a concentração celular no tempo 0 em g.L^{-1} e X é a concentração celular no tempo t, A é $\text{Ln}\left(\frac{X_{\infty}}{X_0}\right)$ onde X_{∞} é a concentração máxima atingida no tempo $t = \infty$ em g.L^{-1} , $\mu_{\text{máx}}$ é a velocidade máxima específica de crescimento (h^{-1}) e λ é a duração da fase lag (h). Os dados experimentais

foram ajustados segundo o modelo de Gompertz Modificado pelo programa Matlab 7.0.

3.4.1.1.2 Modelo Logístico

A Equação 2 é utilizada para descrever o modelo Logístico (ERKMEN, 2000):

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \frac{A}{1 + \exp(M - B \cdot t)} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: $\ln\left(\frac{X}{X_0}\right)$ e A possuem o mesmo significado que os apresentados no modelo de Gompertz Modificado, B é um parâmetro adimensional e M é o crescimento relativo na metade do tempo da fase exponencial (h^{-1}). Estes parâmetros estão relacionados com os parâmetros μ (Equação 3) e λ (Equação 4).

$$\mu = \frac{A \cdot B}{4} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\lambda = \frac{M - 2}{B} \quad (\text{Equação 4})$$

3.4.1.1.3 Modelo Logístico Modificado

Uma nova versão do modelo Logístico foi proposta por Corradini e Peleg (2005), conhecido como modelo Logístico Modificado (Equação 5).

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \frac{A}{1 + \exp(M - B \cdot t)} - \frac{A}{1 + \exp(M \cdot B)} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde o segundo termo no lado direito da equação foi introduzido para considerar por definição $Y(0)=0$, por exemplo, para normalizar que o início da curva de crescimento é a partir do ponto de origem (0,0). Pelas Equações 3 e 4 obtêm-se os parâmetros de crescimento μ e λ .

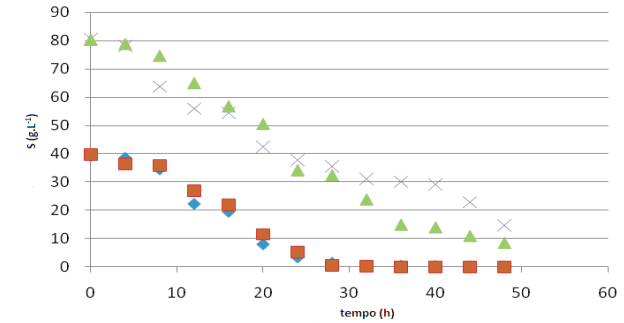


Figura 14 - Curva de consumo do substrato, onde S é a concentração de glicose em g.L^{-1} e N é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} \blacklozenge S= 40 g.L^{-1} com N= 0,7 g.L^{-1} \blacksquare S= 40 g.L^{-1} com N=1,4 g.L^{-1} \blacktriangle S= 80 g.L^{-1} com N=0,7 g.L^{-1} e \times S= 80 g.L^{-1} com N=1,4 g.L^{-1} .

Através das curvas de crescimento microbiano apresentadas na Figura 15 pode-se observar que não houve influência das concentrações estudadas de nitrogênio sobre o crescimento do micro-organismo. Comparando-se os resultados obtidos (Figura 14 e Figura 15), observa-se um maior consumo de substrato durante a fase exponencial de crescimento e início da fase estacionária.

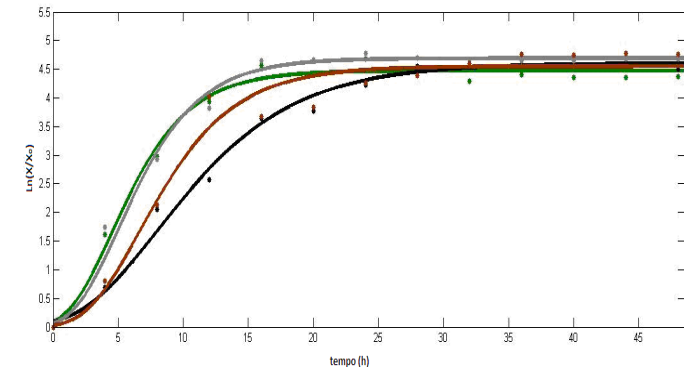


Figura 15 - Curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs tempo onde S é a concentração de glicose em g.L^{-1} e N tempo(h) é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L^{-1} : — S = 40 g.L^{-1} com N= 0,7 g.L^{-1} — S = 40 g.L^{-1} com N= 1,4 g.L^{-1} — S= 80 g.L^{-1} com N= 0,7 g.L^{-1} — S= 80 g.L^{-1} com N= 1,4 g.L^{-1} . As linhas representam os dados experimentais ajustados ao Modelo Gompertz Modificado, com auxílio do software Matlab 7.0.

Após a avaliação dos resultados obtidos nos experimentos, as condições escolhidas para a primeira etapa do planejamento fatorial, para todos os substratos, foram: temperatura de 30 °C, concentrações de substrato de 80 g.L⁻¹ e 40 g.L⁻¹ em um tempo de cultivo fixo de 48 h. A concentração de nitrogênio também foi escolhida como um fator a ser estudado.

4.2 ACOMPANHAMENTO DA SÍNTESE DO BIOPOLÍMERO

Durante os experimentos da primeira etapa do planejamento fatorial, realizada com os níveis (+) e (-), foram acompanhados o crescimento do micro-organismo através da medida da absorbância e o consumo do substrato, conforme descrito nos itens 3.4.1 e 3.4.2 de material e métodos, respectivamente. As análises foram realizadas a cada 4 horas em um tempo total de cultivo de 48 h e em duplicata.

Para melhor descrever o crescimento de *Pseudomonas mendocina* em meios utilizando diferentes substratos, concentrações de substrato e concentrações de sulfato de amônio (utilizado como fonte de nitrogênio), foram testados os modelos Gompertz Modificado (GM), Logístico (LO), Logístico Modificado (LM) e Baranyi (BA). Os seguintes índices estatísticos foram utilizados para comparação dos modelos conforme descrito no item 3.4.1.1, sendo erro médio quadrático (MSE), coeficiente de correlação R², fator bias e fator de exatidão.

4.2.1 Ensaios utilizando glicose como substrato

Pode-se observar na Figura 14 que após 30 h de cultivo, para ensaios com a concentração de glicose de 40 g.L⁻¹, todo o substrato já havia sido consumido. Para as concentrações de 80 g.L⁻¹ de glicose, após 48 h de cultivo, a concentração de substrato no meio era aproximadamente 15 % da concentração inicial. O aumento da concentração de nitrogênio não influenciou o consumo do substrato.

3.4.1.1.4 Modelo de Baranyi

O modelo de Baranyi é representado pela Equação 6 e pela Equação 7 (BARANYI e ROBERTS, 1994).

$$y(t) = y_0 + \mu \cdot A(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{(\mu \cdot A(t))} - 1}{e^{(y_{max} - y_0)}}\right) \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu} \ln\left(e^{(\mu \cdot t)} + e^{(-\mu \cdot t)} - e^{(-\mu(t+\lambda))}\right) \quad (\text{Equação 7})$$

Este modelo inclui uma fase de crescimento exponencial linear e uma fase lag determinada por uma função de ajuste, A(t).

Os seguintes índices foram utilizados para comparação dos modelos conforme apresentado por Sutherland e Bayliss (1994): erro médio quadrático (MSE), coeficiente de correlação R², fator bias e fator de exatidão.

O erro médio quadrático (MSE) pode ser calculado através da equação 8:

$$MSE = \frac{RSS}{n} = \frac{\sum (Valor_{observado} - Valor_{predito})^2}{n} \quad (\text{Equação 8})$$

Onde RSS é a soma dos quadrados residuais e n é o número de graus de liberdade (número de pontos experimentais – número de parâmetros do modelo).

Quanto menor o valor de MSE melhor é o ajuste do modelo aos dados experimentais.

O fator bias representa a diferença média entre os valores observados e preditos. Pode ser calculado através da Equação 9 :

$$fatorbias = 10^{\left(\sum \frac{\log\left(\frac{Valor_{observado}}{Valor_{predito}}\right)}{n}\right)} \quad (\text{Equação 9})$$

O fator bias procura dar o mesmo peso na média dos valores que sobreestimam e subestimam a média, ou seja, é um desvio relativo médio. Se bias é igual a 1, a resposta observada é igual à resposta predita. No entanto, quando bias é maior que 1, significa que o valor predito é maior que o observado. Quando bias menor que 1, significa que o valor predito é menor que o observado.

O fator de exatidão (Equação 10) é uma medida da diferença média absoluta entre os valores preditos e observados.

$$fatorexatidão = 10^{\left(\frac{\sum \log \left(\left| \frac{Valor_{observado}}{Valor_{predito}} \right| \right)}{n} \right)} \quad (\text{Equação 10})$$

Conforme aumenta o valor deste fator, o modelo é menos exato na média, ou seja, no cálculo do fator bias como se obtém uma média dos valores, os com sinais opostos, tendem a se cancelar, já no cálculo do fator de exatidão, por se tratar de valores absolutos será sempre maior que 1. Quanto maior seu valor, menor a exatidão da estimativa da média.

3.4.2 Determinação do consumo de substrato

3.4.2.1 Determinação do consumo de glicose

O consumo de glicose foi medido através do kit Gold Analisa para a quantificação da glicose por metodologia enzimática-colorimétrica.

A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipiridina e fenol, formando um complexo de coloração vermelha (quinoneimina), cuja absorbância medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.

Foram colocados 2 mL do reagente misturado com 20 µL da amostra e medida a absorbância a 500 nm. A curva de calibração expressa à concentração de glicose g.L⁻¹ versus absorbância em uma escala compreendida entre 0 e 2 g.L⁻¹ de glicose. A curva de calibração é apresentada no Anexo A – Figura A.1.

carbono dentre todas as testadas. Quanto ao efeito de diferentes concentrações de sacarose como fonte de carbono, foram investigadas concentrações de 2% de sacarose como padrão e meios similares contendo 1, 4 e 8% de sacarose. Os resultados mostraram que, enquanto a massa celular seca aumentou juntamente com o aumento da concentração de sacarose a produção de polissacarídeo se comportou de maneira inversa. Desta forma, 1% foi considerada a melhor concentração para sacarose como fonte de carbono (concentração de 1,5 g.L⁻¹ de alginato no meio de cultivo).

Neste estudo, com *Pseudomonas mendocina*, observa-se um comportamento contrário, ou seja, aumentando a concentração de sacarose no meio, maiores concentrações de alginato foram obtidas. Isso pode ocorrer devido ao fato de cultivos com *Azotobacter vinelandii* serem mais sensíveis a mudanças nas características do meio, por exemplo, aumento considerável da viscosidade e conseqüente diminuição da aeração.

A Tabela 10 apresenta resultados obtidos por Vermani et al. (1995), para influência da fonte de carbono na produção de alginato por *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460. Observa-se maiores concentrações de biopolímero utilizando concentrações de 20 g.L⁻¹ de sacarose ou 20 g.L⁻¹ de glicose como fonte de carbono.

Tabela 10 - Efeito do substrato na produção de alginato em frascos agitados.

S	t	T	S ₀	C
Sacarose	48	30	5	1.0
Sacarose	48	30	10	1.3
Sacarose	48	30	20	1.4
Sacarose	48	30	50	1.4
Glicose	48	30	5	0,7
Glicose	48	30	10	1.1
Glicose	48	30	20	1.5
Glicose	48	30	50	1.4
Lactose	48	30	5	0,7
Lactose	48	30	10	0,6
Lactose	48	30	20	1.1
Lactose	48	30	50	1.3

Onde S é o substrato (g.L⁻¹), S₀ é a concentração inicial de substrato (g.L⁻¹), t é o tempo em horas (h), T é a temperatura em (°C), C é a concentração final de alginato no meio (g.L⁻¹).
Fonte: Adaptado de Vermani et al (1995).

inicias de sacarose de 20 e 40 g.L⁻¹. Para a concentração inicial de 80 g.L⁻¹, ao final de 72 horas ainda havia no meio 12,19 g.L⁻¹ de substrato. Quanto maior foi a concentração inicial de substrato, maior foi a quantidade de alginato produzido. Sendo de 12,58 g.L⁻¹ para concentração inicial de 80 g.L⁻¹, 10,99 g.L⁻¹ para concentração inicial de 40 g.L⁻¹ e 7,89 g.L⁻¹ para concentração inicial de 20 g.L⁻¹.

Tabela 9 - Dados obtidos nas culturas realizadas com sacarose como fonte de substrato para a produção de alginato.

T	S _o	S _f	t	pH _i	pH _f	C	P	Y _{ps}
30	20	0,65 ± 0,03	72	7,4	7,0	7,89 ± 0,61	0,11 ± 0,01	0,41 ± 0,03
30	40	2,36 ± 0,44	72	7,3	6,8	10,99 ± 1,23	0,15 ± 0,02	0,29 ± 0,04
30	80	12,19 ± 1,05	72	7,3	6,0	12,58 ± 1,81	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,02

Onde S_o é a concentração inicial de sacarose g.L⁻¹, S_f é a concentração final de sacarose no meio em g.L⁻¹, T é a temperatura (°C) t é o tempo final de cultivo em horas (h), C é a concentração de alginato no meio em g.L⁻¹, P é a produtividade em g.L⁻¹h⁻¹ e Y_{ps} é o fator de bioconversão (gP.gS⁻¹).

Horan et al. (1981), em seus estudos de produção de alginato por *Azotobacter vinelandii*, observaram que durante o crescimento do micro-organismo em meio com limitação de fosfato e com sacarose (20 g.L⁻¹) como única fonte de carbono, a produção de ácido algínico começou logo no início da fase de crescimento exponencial. O alginato era produzido numa quantidade extremamente baixa até que o crescimento cessou devido à exaustão do fosfato, então, a produção de ácido algínico aumentou significativamente e continuou por 40 h. O fim da produção de ácido algínico não pode ser atribuído à exaustão da fonte de carbono, uma vez que havia ainda no sobrenadante da cultura 6,0 g.L⁻¹ de sacarose. A concentração de alginato no meio de cultivo foi de 5,6 g.L⁻¹ ao final do experimento.

Okabe et al. (1981), investigaram a influência de diferentes fontes de carbono e de fósforo no crescimento celular e na produção de alginato sintetizado por *Azotobacter vinelandii* (N-II-1-2). Glicose, manitol, maltose, frutose, sorbitol, sacarose, rafinose e glicerol foram utilizados como fonte de carbono. A produção de polissacarídeo foi maior para 1% de sacarose, glicose, manitol e maltose, ou 0,5% de rafinose quando comparada com as demais fontes de carbono testadas, enquanto que a produção de massa celular foi maior para frutose, sorbitol e sacarose. A sacarose demonstrou ser a melhor fonte de

3.4.2.2 Determinação do consumo de sacarose

O consumo de sacarose foi determinado pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), que determina a concentração de açúcares redutores.

A amostra foi previamente hidrolisada seguindo a metodologia de Carvalho (2002), sendo 200 µL da amostra hidrolisados com 100 µL de HCl 0,75M em banho térmico a 60 °C por 1 h seguindo de neutralização com 100 µL de NaOH 0,75M.

A um volume de 400 µL da amostra hidrolisada, foi adicionado 400 µL de reagente DNS em banho térmico a 100 °C por 5 minutos seguido de resfriamento em banho de gelo. Foram adicionados 4 mL de água destilada e após 15 minutos para estabilização foi medida a absorbância a 540 nm contra um branco de água destilada que passou pela mesma reação. A curva de calibração expressa à concentração de sacarose (g.L⁻¹) versus absorbância em uma escala compreendida entre 0 e 1,4 g.L⁻¹ de sacarose. A curva de calibração é apresentada no Anexo A – Figura A.2.

3.4.2.3 Determinação do consumo de glicerol

O consumo de glicerol foi medido através do kit Gold Analisa para quantificação de triglicérides por metodologia enzimática-colorimétrica.

O glicerol é fosforilado pela glicerolquinase formando glicerolfosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona e água oxigenada por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Através da reação catalisada pela peroxidase, a água oxigenada reage com o a 4-aminoantipirina (4-AMP) e 4-clorofenol, produzindo a quinoneimina (vermelha) cuja absorbância, medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de glicerol.

Foram colocados 2 mL do reagente misturado com 20 µL da amostra e medida a absorbância a 500 nm. A curva de calibração expressa à concentração de glicerol g.L⁻¹ versus absorbância em uma escala compreendida entre 0 e 0,5 g.L⁻¹ de glicerol. A curva de calibração é apresentada no Anexo A – Figura A.3.

3.4.3 Determinação da concentração do biopolímero

A determinação da concentração do biopolímero foi efetuada pelo

método gravimétrico adaptado de MÜLLER (1997). A amostra (15 mL) foi centrifugada para a remoção de células em duas etapas. Na primeira etapa, a amostra foi centrifugada a 15000 rpm, por 20 minutos a 4 °C e na segunda etapa o sobrenadante foi novamente centrifugado nas mesmas condições por 10 minutos para completa remoção de células. Foram utilizados 10 mL do sobrenadante para a precipitação, aos quais foram adicionados três volumes de etanol. O precipitado foi lavado em etanol para remoção das impurezas e posteriormente seco em estufa a 80 °C até peso constante.

3.4.4 pH

Para medição do pH foi utilizado pHmetro Analion 2000.

3.4.5 Cálculo da Produtividade de Biopolímero

A produtividade foi calculada pela concentração de biopolímero ao final do cultivo (Equação 11).

$$P = \frac{m_f}{V \cdot t_f} \quad (\text{Equação 11})$$

Onde: P é a produtividade em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, m_f é a massa (em gramas) de alginato precipitado do instante final do cultivo, V (em litros) é o volume da amostra e t_f é o tempo final (em horas).

3.4.6 Fator de conversão

O fator de conversão substrato em produto foi obtido conforme a equação abaixo (Equação 12).

$$Y_{p/s} = \frac{C_f - C_i}{S_i - S_f} \quad (\text{Equação 12})$$

Onde: $Y_{p/s}$ é o fator de bioconversão de substrato em produto em

organismo nos ensaios utilizando 20, 40 e 80 g.L^{-1} de sacarose. A fase exponencial de crescimento leva em torno de 25 h para todas as concentrações iniciais de substrato.

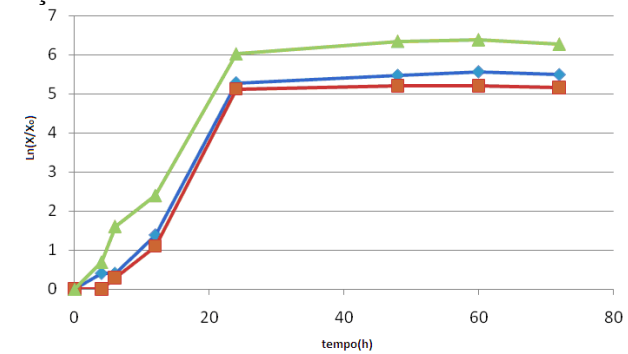


Figura 12 - Curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs tempo para meios com concentrações iniciais de sacarose de 20 g.L^{-1} (círculos azuis), 40 g.L^{-1} (quadrados vermelhos) e 80 g.L^{-1} (triângulos verdes) a 30°C.

O consumo de sacarose ao longo do cultivo é apresentado na Figura 13.

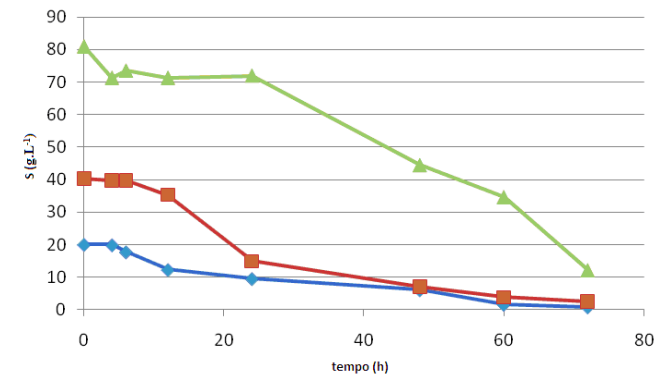


Figura 13 - Curva de consumo de sacarose vs o tempo para os meios com concentrações iniciais de substrato de 20 g.L^{-1} (círculos azuis), 40 g.L^{-1} (quadrados vermelhos) e 80 g.L^{-1} (triângulos verdes) a 30°C, onde S representa a concentração de sacarose no meio em g.L^{-1} .

A Tabela 9 apresenta os dados obtidos nos experimentos. Após 72 horas, as concentrações finais de sacarose no meio de cultura foram 0,65 e 2,32, respectivamente para experimentos com concentrações

Tabela 8 - Dados obtidos nas culturas realizadas com glicerol como fonte de carbono para a produção de alginato.

<i>T</i>	<i>S</i> ₀	<i>S</i> _f	<i>T</i>	<i>pH</i> _i	<i>pH</i> _f	<i>C</i>	<i>P</i>	<i>Y</i> _{p/s}
30	20	0,11 ± 0,01	144	7,1	5,6	10,87 ± 0,69	0,08 ± 0,01	0,55 ± 0,03
30	40	0,08 ± 0,04	192	7,2	4,6	11,39 ± 1,37	0,06 ± 0,01	0,29 ± 0,03
30	80	12,94 ± 0,69	192	7,1	4,5	8,47 ± 1,40	0,04 ± 0,01	0,13 ± 0,02
35	20	2,70 ± 1,06	156	7,2	4,5	10,71 ± 0,24	0,07 ± 0,01	0,62 ± 0,05
35	40	6,20 ± 0,41	170	7,2	4,6	11,72 ± 0,37	0,07 ± 0,01	0,35 ± 0,01
35	80	27,88 ± 2,29	170	7,1	5,2	9,79 ± 0,32	0,06 ± 0,01	0,19 ± 0,01

Onde *S*₀ é a concentração inicial de substrato g.L⁻¹, *S*_f é a concentração final de substrato no meio em g.L⁻¹, *T* é a temperatura (°C), *t* é o tempo final de cultivo em horas (h), *C* é a concentração de alginato no meio em g.L⁻¹, *P* é a produtividade em g.L⁻¹h⁻¹ e *Y*_{p/s} é o fator de bioconversão (gP.gS⁻¹).

Estudos de Freitas et al. (2009), para a produção de um exopolissacarídeo por *Pseudomonas oleovorans*, relatam que a produção de EPS utilizando glicerol como fonte de carbono leva em torno de 96 - 144 h, com uma produção final entre 7 -18 g.L⁻¹ de EPS e máxima produtividade de 0,1 - 0,2 g.L⁻¹h⁻¹. Glicerol, obtido de resíduo do processamento de biodiesel também tem sido utilizado como fonte de carbono, produzindo EPS com propriedades químicas e físicas idênticas as obtidas de glicerol comercial (FREITAS et al., 2009).

Nas condições estudadas, o aumento da temperatura não favoreceu a produção de alginato e prolongou o tempo de cultivo, confirmando o resultado descrito no item 4.1.2.1, quando se utilizou glicose como substrato. A temperatura escolhida para os próximos ensaios foi 30 °C.

Vermani et al. (1995), obtiveram para produção de alginato por *Azotobacter vinelandii* em frascos agitados, utilizando diferentes substratos (glicose, lactose e sacarose), a melhor temperatura para crescimento do micro-organismo 25 °C e para produção de alginato 30 °C, temperatura usualmente utilizada para produção de EPS por *Azotobacter vinelandii*.

4.1.2.3 Ensaios utilizando sacarose como fonte de carbono

A Figura 12 apresenta a curva de crescimento do micro-

(gP.gS⁻¹), *C*_f é a concentração de alginato precipitado no tempo final (g.L⁻¹), *C*_i é a concentração de alginato no tempo inicial (g.L⁻¹), *S*_i é a concentração de substrato no tempo inicial (g.L⁻¹) e *S*_f a concentração de substrato no tempo final (g.L⁻¹).

3.4.7 Caracterização Reológica do biopolímero

As análises de viscosidade aparente foram realizadas com amostras do meio de cultura ao final do cultivo para os diferentes substratos cuja concentração inicial de substrato no meio foi 20, 40 e 80 g.L⁻¹.

Foram retiradas amostras no tempo final para análise da viscosidade aparente, realizadas nas temperaturas de 30 °C e 60 °C.

Para as análises de viscosidade aparente (η) foi utilizado o reômetro digital Brookfield, LVDV III+, acoplado a um banho termostático, Micro Química MQBTZ-99; utilizando-se o adaptador para pequenas amostras, spindle 52. As leituras foram realizadas a intervalos de 10 s por 10 minutos variando-se a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) na faixa de 28-340 s⁻¹.

3.4.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

As amostras para a análise NMR foram preparadas similar ao descrito por Gimmetad et al. (2006). As etapas de preparo da amostra foram as seguintes;

1. Centrifugação para remoção das células.
2. Desacetilação com NaOH 0,75 M e pH 12 sob agitação por 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Neutralização com HCl 0,75 M até pH 7,0.
 - Diálise em com NaCl 0,05 M e água destilada
 - Hidrólise em pH 3,8 a 100 oC por uma hora.
 - Neutralização e liofilização da amostra.

Após a liofilização a amostra foi encaminhada para a Central de Análises no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, para a caracterização por espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

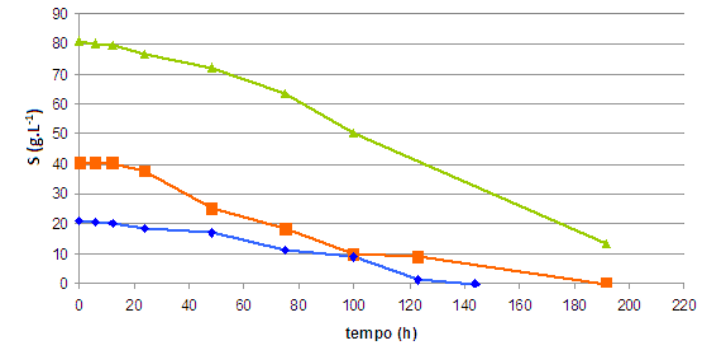


Figura 10 - Curva de consumo de glicerol vs o tempo para os meios com concentrações iniciais de substrato de 20 g.L^{-1} 40 g.L^{-1} e 80 g.L^{-1} a 30°C , onde S representa a concentração de glicerol no meio em g.L^{-1} .

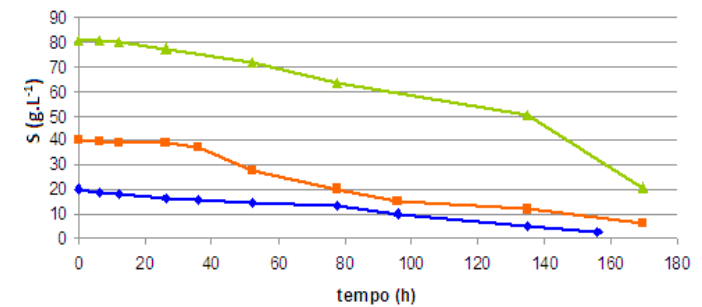


Figura 11 - Curva de consumo de glicerol vs o tempo para os meios com concentrações iniciais de substrato de 20 g.L^{-1} 40 g.L^{-1} e 80 g.L^{-1} a 35°C , onde S representa a concentração de glicerol no meio em g.L^{-1} .

Comparando a Figura 10 e a Figura 11, observa-se que o substrato é consumido mais rapidamente para ensaios a 30°C .

A Tabela 8 apresenta os dados obtidos para os experimentos utilizando glicerol como substrato.

Para a concentração inicial de 80 g.L^{-1} de glicerol a quantidade de alginato produzido foi um pouco inferior, $8,47 \text{ g.L}^{-1}$ na temperatura de 30°C e $9,79 \text{ g.L}^{-1}$ na temperatura de 35°C . Observa-se que após 192 h, para a temperatura de 30°C e 170 h para a temperatura de 35°C , ainda havia uma grande quantidade de substrato presente no meio de cultura, que apesar do maior tempo de cultivo, não foram obtidos maiores rendimentos.

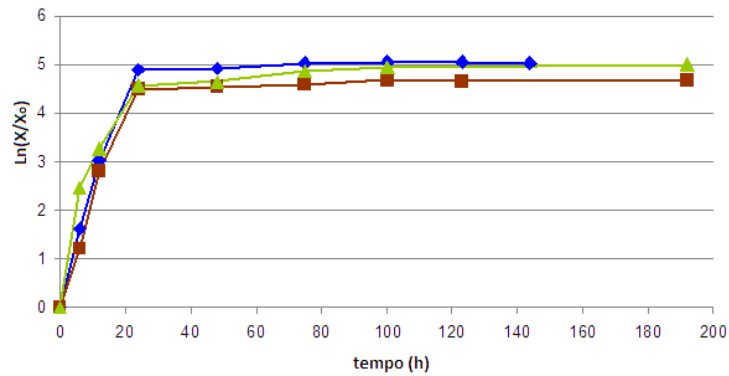


Figura 8 – Curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs tempo para meios com concentrações de iniciais de glicerol de 20 g.L⁻¹, 40 g.L⁻¹ e 80 g.L⁻¹ a 30 °C.

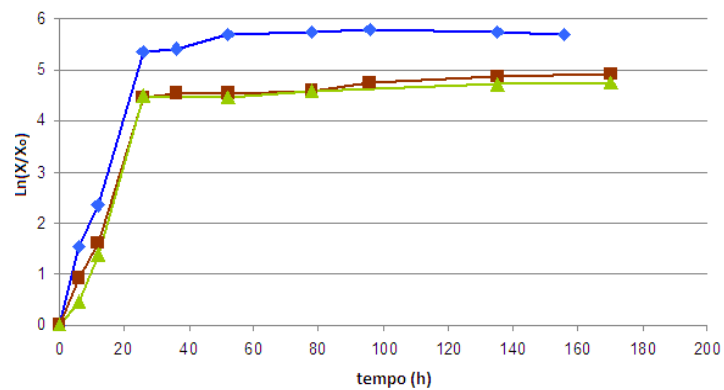


Figura 9 - Curvas de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs tempo para meios com concentrações iniciais de glicerol de 20 g.L⁻¹, 40 g.L⁻¹ e 80 g.L⁻¹ a 35 °C.

O consumo do substrato ao longo do cultivo é apresentado na Figura 10 para as diferentes concentrações de glicerol a 30 °C e na Figura 11 para as diferentes concentrações de glicerol a 35 °C.

CAPÍTULO IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 7 - Dados obtidos nas culturas realizadas com glicose como fonte de carbono para a produção de alginato.

<i>T</i>	<i>S_o</i>	<i>S_f</i>	<i>T</i>	<i>pH_i</i>	<i>pH_f</i>	<i>C</i>	<i>P</i>	<i>Y_{p/s}</i>
30	20	0,13 ± 0,01	28	7,6	5,6	8,80 ± 1,05	0,31 ± 0,04	0,44 ± 0,08
30	40	0,16 ± 0,01	38	7,2	4,6	11,35 ± 0,41	0,30 ± 0,01	0,28 ± 0,01
30	80	4,83 ± 1,24	84	7,0	4,5	13,28 ± 1,00	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,01
35	20	0,27 ± 0,01	32	7,2	4,5	7,97 ± 0,68	0,25 ± 0,02	0,40 ± 0,06
35	40	0,91 ± 0,18	54	7,3	4,7	10,15 ± 0,45	0,19 ± 0,01	0,25 ± 0,01
35	80	3,70 ± 3,59	84	7,2	5,2	13,54 ± 0,73	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01

Onde: *S_o* é a concentração inicial de glicose, em $g.L^{-1}$, *S_f* é a concentração final de glicose, em $g.L^{-1}$, *T* é a temperatura ($^{\circ}C$), *t* é o tempo final de cultivo em horas (h), *C* é a concentração de alginato no meio em $g.L^{-1}$, *P* é a produtividade em $g.L^{-1}h^{-1}$ e *Y_{p/s}* é o fator de bioconversão ($gP.gS^{-1}$).

Estudos de Müller (1997) relatam uma produtividade de $0,53 g.L^{-1}h^{-1}$ em condições otimizadas para a produção de alginato por *Pseudomonas mendocina*, utilizando $20 g.L^{-1}$ de glicose como substrato em um tempo de 30 h de cultivo a $30^{\circ}C$.

No entanto, Clementi et al. (1995), em estudos da síntese de alginato por *Azotobacter vinelandii* utilizando como fonte de carbono glicose na concentração de $20 g.L^{-1}$ obtiveram após 36 h de cultivo a $35^{\circ}C$ e concentração de $1,5 g.L^{-1}$ de alginato no meio, valores consideravelmente inferiores aos obtidos em cultivos com *Pseudomonas mendocina*.

Nas condições estudadas, o aumento da temperatura não favoreceu a produção de alginato, porém causou um aumento no tempo necessário para o consumo do substrato.

4.1.2.2 Ensaios utilizando glicerol como substrato

A Figura 8 apresenta a curva de crescimento do micro-organismo nos ensaios utilizando $20, 40$ e $80 g.L^{-1}$ de glicerol na temperatura de $30^{\circ}C$ e a Figura 9 apresenta a curva de crescimento à temperatura de $35^{\circ}C$. A fase exponencial de crescimento levou em torno de 20 horas, para os dois experimentos. O aumento da temperatura não favoreceu o crescimento do micro-organismo.

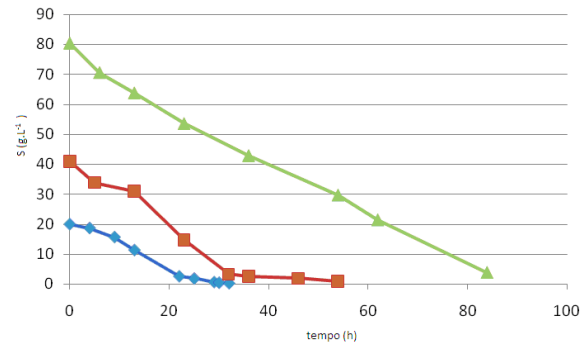


Figura 7 - Curva de consumo de glicose vs o tempo para os meios com concentrações iniciais de substrato de 20 g.L^{-1} 40 g.L^{-1} e 80 g.L^{-1} a $35 \text{ }^\circ\text{C}$, onde S representa a concentração de glicose no meio em g.L^{-1} .

Avaliando os resultados obtidos para o consumo de substrato, observa-se que em concentrações de 20 g.L^{-1} e 40 g.L^{-1} o maior consumo corresponde ao final da fase exponencial de crescimento e início da fase estacionária.

Na concentração inicial de 20 g.L^{-1} de substrato foi obtido o menor tempo de cultivo necessário para que o substrato fosse consumido, 28 horas para temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 32 horas para temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$. A quantidade de alginato produzido também foi menor do que nas outras concentrações, $8,80 \text{ g.L}^{-1}$ para temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e $7,97 \text{ g.L}^{-1}$ para temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para a concentração de 40 g.L^{-1} o tempo necessário para o substrato presente ser totalmente consumido foi de 38 h para a temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 54 h, para ensaios realizados a temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$. A concentração de alginato no meio foi $11,35 \text{ g.L}^{-1}$ e $10,15 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente.

Para concentrações iniciais de 80 g.L^{-1} , o tempo para a concentração de glicose no meio cair para $4,83 \text{ g.L}^{-1}$ (em ensaios a $30 \text{ }^\circ\text{C}$) e $3,70 \text{ g.L}^{-1}$ (em ensaios a $35 \text{ }^\circ\text{C}$) foi 84 h com uma produção de $13,28 \text{ g.L}^{-1}$ (em ensaios a $30 \text{ }^\circ\text{C}$) e $13,54 \text{ g.L}^{-1}$ (em ensaios a $35 \text{ }^\circ\text{C}$).

A Tabela 7 apresenta os dados obtidos para os experimentos utilizando glicose como substrato. A maior produtividade foi $0,31 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ utilizando concentração inicial de 20 g.L^{-1} de glicose, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, onde se obteve também o maior fator de bioconversão 0,44. Nessas condições, todo o substrato foi consumido em um período de 28 h.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

4.1.1 Curva de crescimento do micro-organismo

As curvas de crescimento microbiano na pré-cultura foram realizadas a fim de determinar o momento final da fase exponencial de crescimento, onde a concentração celular atinge o seu valor máximo. Esta informação é importante para que se padronize a concentração celular inicial em todos os experimentos subsequentes, com o inóculo na mesma faixa de concentração celular quando transferido para o meio de produção de biopolímero.

O comportamento do micro-organismo a partir dos repiques de células realizado nos experimentos iniciais e nos experimentos finais permaneceu constante, como se pode observar pela semelhança entre as curvas apresentadas na Figura 3. Os ensaios foram realizados em duplicata, os pontos apresentados nas curvas representam a média dos valores observados.

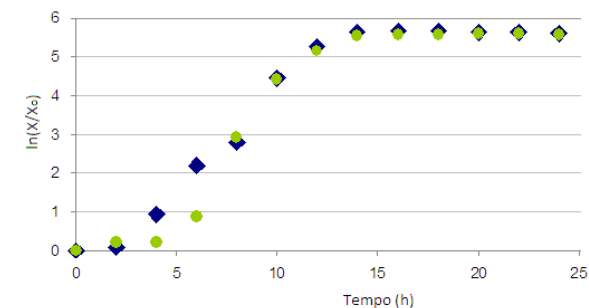


Figura 3 - Acompanhamento do crescimento de *Pseudomonas mendocina*, expressado em $\text{Ln}(X/X_0)$ vs tempo, onde X_0 é o valor da absorbância no tempo inicial \blacklozenge Curva do repique inicial \bullet Curva do repique final.

A partir da curva de crescimento microbiano foi estabelecido o tempo de cultivo adequado para que o inóculo fosse transferido para o meio de produção de biopolímero. Escolheu-se o final da fase exponencial de crescimento, onde a absorbância era aproximadamente de 2,8, a qual ocorreu, para os dois experimentos realizados (repique inicial e repique final), em média, a 14 h de incubação, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e agitação de 240 rpm.

4.1.2 Ensaios iniciais para meio com glicose, glicerol e sacarose

Estes ensaios foram realizados com a finalidade de definir as condições de cultivo a serem estudadas.

Durante estes ensaios foi utilizado o meio padrão descrito no item 3.2 com cada um dos substratos (glicose, glicerol e sacarose) nas concentrações de 20, 40 e 80 g.L⁻¹, em um volume de 125 mL, em frascos erlenmeyer de 500 mL. Foram retiradas amostras ao longo do bioprocessamento visando o acompanhamento da concentração de substrato remanescente e crescimento celular (Abs_{600}). Quando a concentração remanescente de substrato atingia valores menores de 15 % do valor inicial, os frascos eram retirados do agitador e realizava-se a quantificação da concentração de alginato no meio por precipitação, como descrito no item 3.4.3. Os experimentos foram realizados em duplicatas.

Estes ensaios tiveram como objetivo determinar o tempo de cultivo em que ocorreu a maior conversão do substrato disponível no meio em biopolímero, sob as condições definidas.

4.1.2.1 Ensaios utilizando glicose como substrato

A Figura 4 apresenta a curva de crescimento do micro-organismo nos ensaios utilizando 20, 40 e 80 g.L⁻¹ de glicose à temperatura de 30 °C, e a Figura 5 apresenta a curva de crescimento nos ensaios utilizando 20, 40 e 80 g.L⁻¹ de glicose à temperatura de 35 °C.

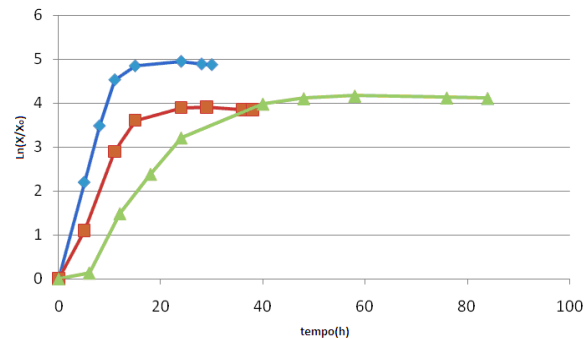


Figura 4 - Curva de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs o tempo para os meios com concentrações iniciais de glicose de 20 g.L⁻¹, 40 g.L⁻¹ e 80 g.L⁻¹ a 30°C.

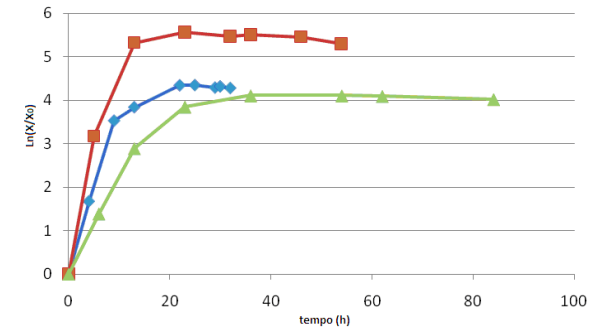


Figura 5 - Curva de crescimento de *Pseudomonas mendocina* para a produção de alginato expressa em $\ln(X/X_0)$ vs o tempo para os meios com concentrações iniciais de glicose de 20 g.L⁻¹, 40 g.L⁻¹ e 80 g.L⁻¹ a 35°C.

Avaliando as curvas de crescimento, observa-se um período mais longo de fase exponencial para concentrações iniciais de substrato de 80 g.L⁻¹. O aumento da temperatura não favoreceu o crescimento do micro-organismo.

O consumo do substrato durante o cultivo é apresentado na Figura 6 para as diferentes concentrações de glicose a 30 °C e na Figura 7 para as diferentes concentrações de glicose a 35 °C.

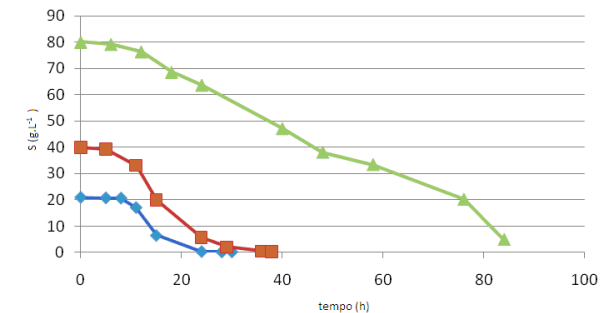


Figura 6 - Curva de consumo de glicose vs o tempo para os meios com concentrações iniciais de substrato de 20 g.L⁻¹, 40 g.L⁻¹ e 80 g.L⁻¹ a 30 °C, onde S representa a concentração de glicose no meio em g.L⁻¹.