



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

**PROPRIEDADES REOLÓGICAS DE  
EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS  
POR BACTÉRIAS DOS GÊNEROS  
*Rhizobium* E *Mesorhizobium***

GABRIEL ARANDA SELVERIO

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-SP  
2009



GABRIEL ARANDA SELVERIO

**PROPRIEDADES REOLÓGICAS DE  
EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS  
POR BACTÉRIAS DOS GÊNEROS  
*Rhizobium* E *Mesorhizobium***

*Orientadora:*

Profa. Dra. Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva  
(UNESP/FCT - Presidente Prudente/SP)

*Co-orientadora:*

Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna  
(UNESP/IBILCE – São José do Rio Preto/SP)

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-SP  
2009

Aranda-Selverio, Gabriel.

Propriedades reológicas de exopolissacarídeos produzidos por bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium* / Gabriel Aranda Selverio. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2008.

110 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva

Co-orientador: Ana Lúcia Barretto Penna

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Exopolissacarídeos. 2. Polissacarídeos microbianos. 3. *Rhizobium*. 4. *Mesorhizobium*. 5. Análises reológicas. 6. Solução pseudoplástica. 7. Comportamento viscoelástico. I. Silva, Maria de Lourdes Corradi Custódio da. II. Penna, Ana Lúcia Barretto. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 577.124.5

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

GABRIEL ARANDA SELVERIO

**PROPRIEDADES REOLÓGICAS DE  
EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS  
POR BACTÉRIAS DOS GÊNEROS  
*Rhizobium* E *Mesorhizobium***

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva  
Professor Assistente Doutor  
UNESP/FCT - Presidente Prudente/SP  
Orientadora

Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos  
Professor Titular  
UNESP/FCAV – Jaboticabal/SP

Prof. Dr. Javier Telis Romero  
Professor Assistente Doutor  
UNESP/FCT - Presidente Prudente/SP

São José do Rio Preto, 21 de agosto de 2009

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, sempre presente na minha vida me guiando e iluminando, permitindo, assim, a concretização de mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, Festo e Odete, por apoiar sempre e proporcionar a realização de meus projetos de vida e, sobretudo, pelos exemplos de conduta moral, força e paciência, que certamente me transformaram na pessoa que sou.

Aos meus irmãos Cacá, Dadá, André e Vitor, minha cunhada Liliane e ao Tavinho, por participarem de cada momento. Em especial a Dadá, por ter lido atentamente a versão final bem como corrigido as referências. Seu companheirismo e descontração são fundamentais sempre.

À todos mais da minha família, pelas alegrias, auxílio e incentivo em todos os momentos. Sem o apoio da família não somos nada!

Agradecimentos especiais aos meus avós, Felix e Maria, ao Tio e amigo Cláudio, pelo constante incentivo e apoio em todas as etapas desta caminhada.

À minha namorada e amiga Tamaya, a qual sempre participou de minha carreira acadêmica. Muito obrigado pela paciência (principalmente na reta final) e por compartilhar bons momentos juntos.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva pela confiança, dedicação e por ter me ensinado como se faz pesquisa. E, também, pelos exemplos de profissionalismo e companheirismo.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Flora Dalberto Vasconcelos pelo auxílio durante todos os momentos desse trabalho, e por estar sempre por perto dando aquela força. Principalmente quando a química apertava. Um biólogo entende o outro!!!

À técnica Marilsa de Stefani Cardoso (UNESP-Presidente Prudente) pelas orientações durante minha permanência no laboratório e auxílio nas aulas práticas.

Aos colegas do Laboratório de Química de Carboidratos da Unesp de Presidente Prudente Luciana, Nilson, Junior e Simone pelas aulas de química e ajuda na realização dos experimentos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Barretto Penna pela Co-orientação deste trabalho.

À todos os amigos, em especial ao Hector, que me acolheu em Rio Preto e me apresentou à Rep. Pré-Tcheca, onde passei momentos importantes e sempre arrumando um tempinho pra tomar “duas”. Ao Ghai, Darly, Elô, Tigrão, Linguíça e outros não menos importantes. Muito obrigado pelo apoio!

Ao amigo Freedman por ter me recebido em sua casa em Curitiba.

Aos amigos do Curso de pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, em especial a Gisele e Adriana pela amizade e companheirismo em todos os momentos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Joana Léa Meira Silveira, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração na realização das análises reológicas.

Aos colegas do Depto de Física, Química e Biologia da Unesp– Presidente Prudente, em especial as funcionárias Juvanir R. de Mello e Ana Maria Dundi, pela convivência, auxílio e cafezinho sempre presentes.

Ao programa de Pós-Graduação da Unesp - São José do Rio Preto.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos Unesp - São José do Rio Preto.

À todos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná - UFPR, que se mostraram dispostos a me ajudar durante os experimentos, principalmente ao Ricardo pelo auxílio nas análises reológicas.

À Cnpq pela bolsa de mestrado.

À todos que, de uma forma ou de outra, foram importantes para a realização deste trabalho e para meu amadurecimento científico, o meu muito obrigado!

**“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano”**

*Isaac Newton*

## RESUMO

Exopolissacarídeos (EPS) são polímeros produzidos por uma grande variedade de microrganismos e possuem diferentes propriedades estruturais, físicas e químicas. A investigação das propriedades reológicas de suas soluções é importante devido ao crescente interesse na aplicação comercial de polissacarídeos, principalmente na indústria de alimentos. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar as características reológicas dos exopolissacarídeos R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub> produzidos por diferentes linhagens de *Rhizobium* e *Mesorhizobium*. Análises quantitativas mostraram que o teor de ácido urônico encontrado em R<sub>3</sub> (8,4 %) foi maior que em R<sub>1</sub> (2,4 %), R<sub>2</sub> (1,7 %) e R<sub>4</sub> (0,8 %). A cromatografia de filtração em gel mostrou que R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> são mais homogêneos e menos polidispersos. Hidrólise ácida total e análise por HPAEC/PAD mostrou glucose como constituinte básico majoritário dos EPS, além de galactose e manose. Todos os polissacarídeos apresentaram comportamento não-Newtoniano, com características de soluções pseudoplásticas nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L. O modelo reológico de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) foi utilizado para representar os dados experimentais de tensão de cisalhamento versus taxa de deformação. Os EPS R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>4</sub> demonstraram pequeno aumento na viscosidade em presença de NaCl, e apresentaram comportamento viscoelástico de gel, sendo R<sub>1</sub> o que apresenta características de gel mais forte. O EPS R<sub>3</sub> manteve-se como o menos viscoso, tanto em meio aquoso quanto em solução salina, provavelmente devido ao maior percentual de ácidos urônicos em sua estrutura. Além disso, R<sub>3</sub> exibiu comportamento de solução diluída a baixas concentrações, e viscoelástico de gel fraco em concentrações mais elevadas. A análise da influência da temperatura sobre o comportamento viscoelástico das soluções polissacarídicas mostrou que os EPS R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>4</sub> apresentaram características de gel forte, na concentração de 5 g/L.

**Palavras-chaves:** Exopolissacarídeo; *Rhizobium*; *Mesorhizobium*; Análises Reológicas; Solução Pseudoplástica; Comportamento viscoelástico.



## ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) are polymers produced by a great variety of microorganisms and possess different structural, physical and chemical properties. Investigation of rheological properties of these solutions is important due to an increasing interest in polysaccharides commercial applications, mainly in food sectors. The objective of this work was investigate rheological characteristics of exopolysaccharides R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> produced by different *Rhizobium* and *Mesorhizobium* strains. Quantitative analysis showed that uronic acid component found in R<sub>3</sub> (8,4 %) was higher than R<sub>1</sub> (2,4 %), R<sub>2</sub> (1,7 %) and R<sub>4</sub> (0,8 %). Gel filtration chromatography indicated that EPS R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> are more homogeneous and less polidisperse. Acid hydrolysis and HPAEC/PAD analysis revealed that glucose was the main monosaccharide, beyond galactose and mannose. All exopolysaccharides had non-Newtonian behavior, with pseudoplastic characteristics at concentrations of 2, 5 and 10 g/L. The Ostwald-de-Waele (Power Law) was the rheological model used to represent the experimental data of the shear stress versus shear rate. EPS R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>4</sub> demonstrated a slight increase in viscosity in presence of NaCl, and viscoelastic behavior, R<sub>1</sub> had strong gelling characteristics. The EPS R<sub>3</sub> was less viscous, in water solutions and presence of salt, probably due to a high percentual of uronic acids on its structure. Moreover, R<sub>3</sub> exhibited diluted solution behavior at low concentration, and viscoelastic weak gelling at high concentrations. Analysis of temperature influence over polysaccharide solutions viscoelastic behavior showed that EPS R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>4</sub> had strong gelling characteristics, at concentrations of 5 g/L.

**Keywords:** Exopolysaccharides; *Rhizobium*; *Mesorhizobium*; Rheological analyses; Pseudoplastic solution; Viscoelastic behavior.

## LISTA DE FIGURAS

|                    |  |    |
|--------------------|--|----|
| <b>Figura 01 -</b> | Fluxo entre duas placas paralelas.....   | 28 |
| <b>Figura 02 -</b> | Vários tipos de comportamento de fluxo.....  | 30 |
| <b>Figura 03 -</b> | Esquema de classificação do comportamento reológico de fluidos.....  | 30 |
| <b>Figura 04 -</b> | Reograma idealizado para um fluido pseudoplástico.....   | 32 |
| <b>Figura 05 -</b> | Representação gráfica genérica de sistemas polissacarídicos submetidos a medidas reológicas dinâmicas. a) gel forte, b) solução concentrada ou gel fraco, e c) solução diluída.....                      | 35 |
| <b>Figura 06 -</b> | A) Reômetro HAAKE RS75 Rheostress; B) Sensor cone-placa (C60/2Ti°) ; C) Amostra sobre a placa estacionária do reômetro; D) Exopolissacarídeo R <sub>3</sub> após varredura, a 25 °C.....                 | 46 |
| <b>Figura 07 -</b> | Soluções aquosas do EPS R <sub>2</sub> à temperatura de 25 °C. (a) 5 g/L e (b) 10 g/L.....   | 47 |
| <b>Figura 08 -</b> | (A) Ilustração do EPS R <sub>1</sub> seco e moído; (B) EPS R <sub>1</sub> dialisado e liofilizado.....   | 51 |
| <b>Figura 09 -</b> | Perfil de eluição por HPSEC para os EPS R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> e R <sub>4</sub> .....  | 54 |
| <b>Figura 10 -</b> | Análise dos monossacarídeos provenientes da hidrólise ácida dos EPS R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> e R <sub>4</sub> por HPAEC/PAD.....   | 56 |
| <b>Figura 11 -</b> | Reograma (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS R <sub>1</sub> nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C..... | 58 |
| <b>Figura 12 -</b> | Reograma (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS R <sub>2</sub> nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C..... | 58 |
| <b>Figura 13 -</b> | Reograma (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS R <sub>3</sub> nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C..... | 59 |

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| <b>Figura 14 -</b> | Reograma (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS R <sub>4</sub> nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C.....  | 59 |
| <b>Figura 15 -</b> | Viscosidade absoluta ( $\eta$ ) em função da taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) das soluções polissacarídicas do EPS R <sub>1</sub> nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C.....    | 63 |
| <b>Figura 16 -</b> | Viscosidade absoluta ( $\eta$ ) em função da taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) das soluções polissacarídicas do EPS R <sub>2</sub> nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C.....    | 64 |
| <b>Figura 17 -</b> | Viscosidade absoluta ( $\eta$ ) em função da taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) das soluções polissacarídicas do EPS R <sub>3</sub> nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C.....    | 64 |
| <b>Figura 18 -</b> | Viscosidade absoluta ( $\eta$ ) em função da taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) das soluções polissacarídicas do EPS R <sub>4</sub> nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C.....    | 65 |
| <b>Figura 19 -</b> | Curva de Histerese (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS R <sub>1</sub> na concentração de 10 g/L, à temperatura de 25 °C..... | 68 |
| <b>Figura 20 -</b> | Curva de Histerese (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS R <sub>2</sub> na concentração de 10 g/L, à temperatura de 25 °C..... | 69 |
| <b>Figura 21 -</b> | Curva de Histerese (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS R <sub>3</sub> na concentração de 10 g/L, à temperatura de 25 °C..... | 69 |
| <b>Figura 22 -</b> | Curva de Histerese (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS R <sub>4</sub> na concentração de 10 g/L, à temperatura de 25 °C..... | 70 |

- Figura 23** - Análise do comportamento viscoelástico das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>1</sub> nas concentrações de 2 g/L (A), 5 g/L (B) e (C) e 10 g/L (D), à temperatura de 25 °C - (A), (B), (D) em solução aquosa; (C) em solução aquosa de NaCl 0,2 M.. 72
- Figura 24** - Análise do comportamento viscoelástico das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>2</sub> nas concentrações de 2 g/L (A), 5 g/L (B) e (C) e 10 g/L (D), à temperatura de 25 °C - (A), (B), (D) em solução aquosa; (C) em solução aquosa de NaCl 0,2 M.. 73
- Figura 25** - Análise do comportamento viscoelástico das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>3</sub> nas concentrações de 2 g/L (A), 5 g/L (B) e (C) e 10 g/L (D), à temperatura de 25 °C - (A), (B), (D) em solução aquosa; (C) em solução aquosa de NaCl 0,2 M.. 74
- Figura 26** - Análise do comportamento viscoelástico das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>4</sub> nas concentrações de 2 g/L (A), 5 g/L (B) e (C) e 10 g/L (D), à temperatura de 25 °C - (A), (B), (D) em solução aquosa; (C) em solução aquosa de NaCl 0,2 M.. 75
- Figura 27** - Rampa de temperatura das soluções polissacarídicas (5 g/L) do EPS R<sub>1</sub>. Curva ascendente (5 a 95 °C) e descendente (95 a 5 °C), com aumento de 1,5 °C/min....79
- Figura 28** - Rampa de temperatura das soluções polissacarídicas (5 g/L) do EPS R<sub>2</sub>. Curva ascendente (5 a 95 °C) e descendente (95 a 5 °C), com aumento de 1,5 °C/min..... 80
- Figura 29** - Rampa de temperatura das soluções polissacarídicas (5 g/L) do EPS R<sub>3</sub>. Curva ascendente (5 a 95 °C) e descendente (95 a 5 °C), com aumento de 1,5 °C/min..... 80
- Figura 30** - Rampa de temperatura das soluções polissacarídicas (5 g/L) do EPS R<sub>4</sub>. Curva ascendente (5 a 95 °C) e descendente (95 a 5 °C), com aumento de 1,5 °C/min..... 81

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 01</b> - Organismos produtores de polissacarídeos bacterianos e suas aplicações.....   | 22 |
| <b>Tabela 02</b> - Modelos ajustados e suas equações.....  | 48 |
| <b>Tabela 03</b> - Quantificações de açúcares totais e redutores, proteínas e ácido urônico dos exopolissacarídeos produzidos por diferentes linhagens de bactérias do gênero <i>Rhizobium</i> e <i>Mesorhizobium</i> .....  | 52 |
| <b>Tabela 04</b> - Parâmetros reológicos obtidos pela análise das soluções exopolissacarídicas pela aplicação do modelo da Lei da Potência.....  | 61 |
| <b>Tabela 05</b> - Viscosidade absoluta ( $\eta$ ) das soluções aquosa e salina dos EPS R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> e R <sub>4</sub> , 5 g/L, nas taxas de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) 10; 50 e 100 (s <sup>-1</sup> ).....                                   | 66 |
| <b>Tabela 06</b> - Valores do módulo G' nas varreduras de frequências dos EPS R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> e R <sub>4</sub> , nas frequências (f) 10 <sup>-1</sup> e 10 <sup>0</sup> (Hz), à temperatura de 25 °C e 5 °C; valor do ponto de cruzamento (Hz)..... | 77 |

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

|                    |   |
|--------------------|---|
| °C                 | - Temperatura em graus celsius  |
| BSA                | - Soroalbumina bovina   |
| DMSO               | - Dimetilsulfóxido  |
| EPS                | - Exopolissacarídeos  |
| EPS R <sub>1</sub> | - Exopolissacarídeo produzido por <i>Rhizobium tropici</i> (condições de cultivo específicas) |
| EPS R <sub>2</sub> | - Exopolissacarídeo produzido por <i>Rhizobium tropici</i> (condições de cultivo específicas) |
| EPS R <sub>3</sub> | - Exopolissacarídeo produzido por <i>Mesorhizobium</i>  |
| EPS R <sub>4</sub> | - Exopolissacarídeo produzido por <i>Rhizobium</i> sp.  |
| f                  | - Frequência  |
| g/L                | - Gramas por litro  |
| G*                 | - Módulo de cisalhamento dinâmico complexo  |
| G'                 | - Módulo de cisalhamento dinâmico elástico  |
| G''                | - Módulo de cisalhamento dinâmico viscoso   |
| HPSEC              | - Cromatografia líquida de filtração em gel   |
| HPAEC              | - Cromatografia líquida de alta pressão e coluna de troca iônica                              |
| Hz                 | - Hertz   |
| K                  | - Coeficiente ou Índice de consistência   |
| M                  | - Molar   |
| mg                 | - Miligrama   |
| mL                 | - Mililitros  |
| m/v                | - Massa/volume  |
| n                  | - Índice de comportamento   |
| nm                 | - Nanômetros  |
| nmol               | - Nanomol   |
| Pa                 | - Pascal  |
| R <sup>2</sup>     | - Coeficiente de regressão  |
| η                  | - Viscosidade absoluta (Pa.s)   |
| η*                 | - Viscosidade complexa (Pa.s)   |
| τ                  | - Tensão de cisalhamento (Pa)   |
| γ̇                 | - Taxa de cisalhamento ou deformação (1/s)  |

|               |                            |
|---------------|----------------------------|
| kDa           | - Kilodaltons              |
| pH            | - Potencial hidrogeniônico |
| rpm           | - Rotações por minuto      |
| TFA           | - Ácido trifluoracético    |
| v/v           | - Volume/volume            |
| $\alpha$      | - Alfa                     |
| $\beta$       | - Beta                     |
| $\mu\text{g}$ | - Micrograma               |
| $\mu\text{L}$ | - Microlitro               |
| $\mu\text{m}$ | - Micrometro               |
| $\chi^2$      | - Chi-quadrado             |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>  | <b>18</b> |
| <b>2. OBJETIVOS</b>   | <b>19</b> |
| 2.1 Objetivos gerais  | 19        |
| 2.2 Objetivos específicos   | 19        |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>   | <b>20</b> |
| 3.1 Polissacarídeos   | 20        |
| 3.2 Exopolissacarídeos  | 21        |
| 3.3 Exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero <i>Rhizobium</i>  | 24        |
| 3.4 Reologia  | 26        |
| 3.4.1 Propriedades dos fluidos  | 27        |
| 3.4.2 Líquidos Newtonianos  | 29        |
| 3.4.3 Líquidos não-Newtonianos  | 29        |
| 3.4.4 Modelando o comportamento reológico de fluidos  | 32        |
| 3.4.4.1 Modelo de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência):   | 33        |
| 3.4.4.2 Modelo de Herschel-Bulkley:   | 33        |
| 3.4.4.3 Modelo de Casson:   | 34        |
| 3.4.5 Viscoelasticidade e soluções poliméricas  | 34        |
| 3.5 Algumas características reológicas de polissacarídeos ácidos  | 36        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>   | <b>40</b> |
| 4.1 Materiais   | 40        |
| 4.1.1 Microrganismos  | 40        |
| 4.1.2 Reagentes   | 40        |
| 4.1.3 Equipamentos  | 40        |
| 4.2 Métodos gerais  | 41        |
| 4.2.1 Preparo das amostras para análises  | 41        |
| 4.2.2 Análises quantitativas nos EPS R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> e R <sub>4</sub>                    | 41        |
| 4.2.2.1 Determinação de açúcares totais - método do fenol - ácido sulfúrico   | 41        |
| 4.2.2.2 Determinação dos açúcares redutores - método de Somogyi – Nelson  | 42        |
| 4.2.2.3 Determinação de proteínas - método de Bradford  | 42        |
| 4.2.2.4 Determinação de ácidos urônicos - método de Blumenkrants modificado   | 43        |
| 4.2.3 Análise da homogeneidade por cromatografia de filtração em gel (HPSEC)  | 43        |
| 4.2.4 Hidrólise Ácida Total   | 44        |
| 4.2.5 Análise da composição de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta pressão e coluna de troca iônica (HPAEC) | 44        |
| 4.3 Análises reológicas   | 45        |
| 4.3.1 Métodos reológicos  | 45        |
| 4.3.2 Preparo das soluções dos exopolissacarídeos   | 46        |
| 4.3.2.1 Determinação das Viscosidades Absolutas   | 47        |
| 4.3.2.2 Curvas de Fluxo   | 48        |
| 4.3.3 Determinação da Tixotropia em sensor cone-placa   | 49        |
| 4.3.4 Análise Oscilatória em Sistema Dinâmico - Varredura de Tensão e Varredura de Frequência                             | 49        |
| 4.3.5 Varredura de Temperatura  | 50        |



|   |           |
|---|-----------|
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>  | <b>51</b> |
| 5.1 Quantificação dos exopolissacarídeos  | 51        |
| 5.2 Análise da homogeneidade dos exopolissacarídeos por cromatografia de filtração em gel (HPSEC)           | 53        |
| 5.3 Hidrólise ácida total e análise por HPAEC/PAD dos exopolissacarídeos                                    | 55        |
| 5.4 Comportamento reológico das soluções formadas pelos exopolissacarídeos produzidos pelo <i>Rhizobium</i> | 57        |
| 5.4.1 Curvas de fluxo   | 57        |
| 5.4.2 Modelos reológicos  | 60        |
| 5.4.3 Curvas de viscosidade   | 62        |
| 5.4.4 Tixotropia  | 67        |
| 5.4.5 Análise em sistema dinâmico   | 70        |
| 5.4.6 Varredura de temperatura  | 79        |
| <b>6. CONCLUSÕES</b>  | <b>83</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | <b>84</b> |
| <b>ANEXO</b>  | <b>93</b> |
| Carta de aceite de submissão de manuscrito  | 95        |
| Artigo encaminhado a Revista Química Nova   | 95        |

## 1. INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares produzidos por alguns fungos e bactérias, podendo ser secretados no meio de cultivo ou ligados à superfície das células. A crescente demanda por polímeros naturais para diversas aplicações industriais impulsionou o interesse pela procura de exopolissacarídeos de microrganismos. Os polissacarídeos de origem microbiana vêm substituindo aqueles obtidos a partir de fontes convencionais, como plantas e animais, e estão fornecendo a mesma rentabilidade econômica que as gomas naturais. A maioria das aplicações práticas dessas macromoléculas envolve a propriedade de alterar as propriedades físicas do meio onde se encontram, seja por conferir alta viscosidade às soluções ou por criar redes intermoleculares coesivas.

Os polissacarídeos podem atuar como estabilizantes, espessantes, gelificantes, agentes modificadores de textura e crioprotetores, e têm sido aplicados nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética, têxtil e biomédica. Além disso, os EPS podem formar soluções aquosas altamente viscosas, mesmo em baixas concentrações, o que é considerado um atrativo para aplicação industrial dessas macromoléculas.

Muitas bactérias gram-negativas são produtoras de polissacarídeos extracelulares, entre elas as do gênero *Rhizobium* e *Mesorhizobium*, que são capazes de produzir grandes quantidades de EPS que fazem parte do processo de fixação biológica de nitrogênio em plantas leguminosas. Bactérias deste grupo infectam as raízes das plantas desenvolvendo uma relação simbiótica, na qual o microrganismo utiliza os carboidratos, como fonte de energia, obtidos a partir da fotossíntese efetuada pelo hospedeiro e, em troca, realiza a fixação de nitrogênio atmosférico que será utilizado pelo vegetal.

Considerando que o foco principal deste grupo de pesquisa é o estudo químico, reológico e biotecnológico de exopolissacarídeos, este trabalho propõe-se a realizar análises reológicas dos exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium* e *Mesorhizobium*. Acreditamos que esses dados fornecerão resultados consistentes que permitirão futuras aplicações tecnológicas e industriais destas moléculas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

O presente estudo tem por objetivo geral avaliar algumas propriedades reológicas de exopolissacarídeos produzidos por três diferentes estirpes de bactérias do gênero *Rhizobium* e uma de *Mesorhizobium*.

### 2.2 Objetivos específicos

Para cada polissacarídeo a ser estudado:

- a) Quantificar os açúcares totais e redutores, as proteínas e os ácidos urônicos;
- b) Analisar a composição monossacarídica, por cromatografia líquida de alta pressão, em coluna de troca iônica (HPAEC);
- c) Verificar a homogeneidade por cromatografia líquida de filtração em gel (HPSEC);
- d) Efetuar alguns estudos do comportamento reológico em sistemas estático e dinâmico;

Para as análises em sistema estático, determinar:

Viscosidades absolutas;

Curvas de Fluxo;

Tixotropia.

Para as análises em sistema dinâmico, efetuar:

Varreduras de Tensão e de Frequência;

Varredura de Temperatura.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Polissacarídeos

A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeos solúveis em água, iônicos ou não-iônicos. Podem ser extraídos de raízes, tubérculos, caules e sementes de vegetais, nos quais atuam como reserva de energia, como é o caso do amido e da inulina; outras vezes, podem ser encontrados na estrutura celular de tecidos vegetais, onde contribuem para a integridade estrutural e para a força mecânica, como é o caso das pectinas, em plantas terrestres, e das carragenanas, agar e alginatos, em plantas marinhas (TONELI; MURR; PARK, 2005).

Os polissacarídeos possuem massa molecular relativamente alta, são formados por monossacarídeos unidos por ligações covalentes, denominadas de ligações glicosídicas, podem ou não ser ramificados e ter comprimento variável de suas cadeias. São classificados como homo- ou heteropolímeros, se formados por iguais ou diferentes unidades monossacarídicas e, quando ligados covalentemente a outras moléculas orgânicas como proteínas ou lipídios, formam os glicoconjugados. Os homopolímeros são, geralmente, produzidos por uma só enzima ou por um sistema simples de enzimas, entretanto, os heteropolímeros por conterem duas ou mais unidades monoméricas diferentes são sintetizados por sistemas enzimáticos mais complexos (PAZUR, 1994; NELSON; COX, 2000).

Os polissacarídeos são matérias renováveis, de fonte biológica, biodegradáveis e, geralmente, não tóxicos. Pela capacidade de retenção de água, de formar filmes e propriedades reológicas específicas essas moléculas têm sido aplicadas na indústria (KUMAR et al., 2004; FREITAS et al., 2009), especialmente nos ramos alimentício e farmacêutico (KUMAR; MODY; JHA, 2007; VIJAYENDRA et al., 2008). Na indústria de alimentos podem ser utilizados como espessantes, estabilizantes, emulsificantes, coagulantes, formadores de filmes, gelificantes, agentes de suspensão e dispersantes (LOPES; ANDRADE; MANO, 1991; MAIA; PORTE; SOUZA, 2000; ARAÚJO; ALVES, 2003; CUNHA et al., 2004; GÓMEZ et al., 2007).

Há um interesse crescente na produção de alimentos com baixas calorias e com pouco aditivos, se saudáveis e atrativos. Neste contexto, a indústria de alimentos procura por novos componentes que possam melhorar a textura e o “*mouthfeel*”, além de promover uma alimentação saudável (PIERMARIA; CANAL; ABRAHAM, 2008).

Dessa forma, a exploração industrial necessita que os polissacarídeos sejam sintetizados como moléculas com composição química e propriedades físicas constantes e em quantidade suficiente para atender a demanda comercial (CANILHA et al., 2006).

### 3.2 Exopolissacarídeos

Há na natureza plantas e microrganismos que secretam polissacarídeos, denominados exopolissacarídeos (EPS). Polissacarídeos sintetizados por bactérias podem, de acordo com sua localização celular, 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). São classificados como homopolissacarídeos (ex. dextrana) e heteropolissacarídeos (ex. gelana, xantana) (KUMAR et al., 2004; SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004; CANILHA et al., 2006;).

Os EPS mais estudados são os de origem microbiana devido algumas vantagens de obtenção em relação às outras gomas, tais como: produção independente de condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e necessidade de espaço relativamente pequeno. Além disso, apresentam maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas devido à especificidade do microrganismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de fermentação, como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo de fermentação e composição do meio de cultivo (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

Várias bactérias são isoladas e cultivadas para a produção comercial desses polímeros, principalmente devido ao elevado grau de viscosidade das soluções poliméricas (SUTHERLAND, 2001; BARBOSA et al., 2003), que têm sido utilizadas como aditivos alimentares tais como a goma xantana, produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris*, gelana de *Sphingomonas paucimobilis* (PIERMARIA; CANAL; ABRAHAM, 2008), alginatos bacterianos secretados por espécies de *Pseudomonas* e de *Azotobacter chroococcum*, celulose bacteriana de *Acetobacter xylinium*, ácido hialurônico de *Streptococcus equi* e succinoglucanas de *Rhizobium* (KUMAR et al., 2004; SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008). Alguns desses exopolissacarídeos microbianos, com suas respectivas aplicações, são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Organismos produtores de polissacarídeos bacterianos e suas aplicações.

| Organismo  | Polissacarídeo    | Aplicações  |
|--|-------------------|---|
| <i>Xanthomonas</i>   | Xantana           | Agente estabilizante e espessante em alimentos, tintas, pesticidas, detergentes, cosméticos e fármacos.   |
| <i>Sphingomonas paucimobilis</i>                                 | Gelana            | Agente gelificante em alimentos, principalmente em produtos à base de frutas.   |
| <i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>Myxogenes</i>                | Curdiana          | Modificação de textura, agente gelificante, aumento da viscosidade e na produção de alimentos com reduzido valor calórico.  |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i>                                 | Dextrana          | Indústria de alimentos como estabilizante e agente de viscosidade. Medicina humana e veterinária como hipocolesterolêmico.  |
| <i>Zymomonas mobilis</i>   | Levana            | Indústrias de alimentos por suas propriedades estabilizantes e espessantes e indústria farmacêutica como imunomodulador, anticarcinogênico e hipocolesterolêmico. |
| <i>Rhizobium meliloti</i> e <i>Agrobacterium radiobacter</i>     | Succinoglucana    | Nas indústrias de alimentos e farmacêutica como agente gelificante e matriz imobilizadora de drogas, respectivamente.   |
| <i>Acetobacter</i>   | Celulose          | Fibras naturais não-digeríveis e na medicina humana como pele artificial temporária.  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Azobacter vinelandii</i>      | Alginatos         | Matriz imobilizadora para células viáveis e enzimas. Matriz encapsulante para fertilizantes, pesticidas e nutrientes em plantas.                                  |
| <i>Streptococcus equii</i> e <i>Streptococcus zooepidermicus</i> | Ácido hialurônico | Indústrias de cosméticos como loções e cremes hidratantes.  |

Adaptado de KUMAR, A.S.; MODY, K.; JHA, B., 2007.

Segundo García-Ochoa e colaboradores (2000), a xantana é um polímero cuja cadeia principal é formada por unidades  $\beta$ -D-glucopiranosídicas 4-O ligadas. Quatro unidades de glucose não substituídas são alternadas por uma unidade de glucose ramificada em 3-O por manose: ácido glucurônico: manose, constituindo unidades pentassacarídicas repetitivas. É produzida pelo cultivo de *Xanthomonas campestris* em meio contendo carboidratos e recebeu permissão de uso em alimentos pelo “Food and Drug Administration”- FDA em 1969. No Brasil, a adição de xantana aos alimentos é permitida

desde 1965, pelo Decreto Lei nº 55.871, da Legislação Brasileira de Alimentos (CRUZ PRADELLA, 2006). Comercialmente é o polissacarídeo microbiano mais utilizado, com produção mundial anual de cerca de 30.000 toneladas, movimentando um mercado de aproximadamente 408 milhões de dólares. As principais indústrias produtoras de goma xantana são Kelco (EUA), Rhône-Poulenc (França), Pfizer (EUA) e Mero-Rousselot-Santia (França) (CANILHA et al., 2006). A xantana é solúvel em água fria, produz soluções de elevada viscosidade em baixas concentrações e suas soluções apresentam excelente estabilidade à variação de temperatura (0 a 100 °C), mantendo as características de gel em ampla faixa de pH (1 a 13) e presença de sais (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004; LÓPEZ et al., 2004).

Na indústria de alimentos a goma xantana é utilizada nos molhos, coberturas para saladas, catchup, produtos de confeitarias, produtos dietéticos, sucos de frutas, sopas e caldos, entre outros, atuando como agente espessante, estabilizante, suspensor e auxiliar de emulsificação, possibilitando a criação de novos produtos de diferentes texturas (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004).

O termo dextrana descreve uma grande classe de polímeros bacterianos extracelulares, constituído por unidades  $\alpha$ -D-glucopiranosídicas 6-O ligadas (CANILHA et al., 2006). A enzima dextrana-sacarase é responsável pela síntese de dextrana em meio contendo sacarose como fonte de carbono (HONORATO et al., 2005) e muitos microrganismos sintetizam dextrana a partir de sacarose, entre eles várias bactérias, especialmente *Leuconostoc mesenteroides*. O polímero de dextrana é metabolizado naturalmente, não é tóxico e não provoca reações adversas no organismo; é utilizado na indústria de alimentos como estabilizante e agente de viscosidade (CANILHA et al., 2006; CRUZ PRADELLA, 2006).

Levana, um homopolímero constituído por unidades  $\beta$ -D-frutofuranosídicas 6-O ligadas (BAE et al., 2008), é sintetizado por diferentes tipos de bactérias durante a assimilação da sacarose, entre elas a *Zymomonas mobilis*. É obtido pela transfrutossilacção em meio fermentativo à base de sacarose, extrato de levedura e sais minerais. O levana é utilizado nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005).

Gelana é um polissacarídeo complexo com estrutura molecular consistindo de unidades tetrassacarídicas repetitivas dispostas na sequência [ $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucose- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucuronato- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucose- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-L-ramnose]. É produzido pela bactéria *Sphingomonas paucimobilis*, anteriormente denominada de *Pseudomonas*

*elodea*, gram-negativa, aeróbia e de pigmentação amarela (BANIK; KANARI; UPADHYAY, 2000). Segundo Yamamoto e Cunha (2007) o gelana possui boa estabilidade em ampla faixa de pH, produzindo um gel termorreversível que vem substituindo o ágar (SUTHERLAND, 1998). Devido à estabilidade em pH ácido, a goma gelana vem sendo utilizada pela indústria de alimentos, principalmente em produtos a base de frutas (CANILHA et al., 2006; FREITAS et al., 2006). Tais características proporcionam sua aplicação como estabilizante, emulsificante, texturizante e agente gelificante. Além disso, oferece diversas vantagens sobre outras gomas, pois soluções com concentrações entre 0,1 a 0,3 % são suficientes para formação de géis (AROCKIASAMY; BANIK, 2008).

Outros tipos de bactérias podem sintetizar diferentes EPS sob condições fisiológicas apropriadas, como a curdulana, de peso molecular relativamente baixo (VILLAIN-SIMONNET, 2000).

O curdulana é um homopolímero neutro, produzido pelas bactérias *Alcaligenes faecalis* variedade *myxogenes*, formado por unidades  $\beta$ -D-glucopiranosídicas 3-O ligadas (FUNAMI; NISHINARI, 2007). A goma curdulana possui a propriedade de formar dois diferentes tipos de géis de acordo com a temperatura de aquecimento: um termorreversível, denominado “*low-set*”, é formado quando suspensões aquosas do polímero são aquecidas em temperaturas entre 50 °C e 60 °C e resfriadas a temperaturas inferiores a 40 °C, o outro, denominado “*high-set*”, se forma quando suspensão aquosa de curdulana é aquecida em temperaturas superiores a 80 °C, se caracterizando como um gel firme, resistente, não termorreversível e bastante estável em uma ampla faixa de temperatura de congelamento (FUNAMI et al., 1999; CUNHA et al., 2004).

Segundo Cunha e colaboradores (2004), curdulana é um hidrocolóide microbiano que apresenta propriedades físico-químicas interessantes do ponto de vista industrial, tendo potencial para ser utilizado como aditivo alimentar, contribuindo para a melhoria da estabilidade e da qualidade de inúmeros produtos alimentícios.

### **3.3 Exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium***

Na natureza, algumas espécies microbianas são capazes de secretar polissacarídeos para o meio ambiente que podem, por exemplo, auxiliar na aderência do microrganismo patogênico durante a infecção em uma planta ou animal (SUTHERLAND, 1998). Dentre essas, bactérias do gênero *Rhizobium* infectam as raízes de plantas



leguminosas desenvolvendo uma relação simbiótica com o hospedeiro, formando nódulos onde realizam a fixação de nitrogênio, um processo pelo qual o nitrogênio molecular inorgânico da atmosfera ( $N_2$ ) é incorporado inicialmente como amônia e depois, em compostos orgânicos de uso dos organismos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Neste processo grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares são sintetizados pelos rizóbios; essas moléculas têm diferentes funções biológicas (MARCZAK et al., 2008), tais como sinais moleculares durante a invasão nodular da planta. A espessa camada hidratada de EPS que reveste a bactéria oferece proteção contra dessecação e impede a remoção mecânica do microrganismo. Os exopolissacarídeos também participam da formação de estruturas celulares que facilitam o contato entre os organismos e auxiliam o processo de infecção na planta (SERRATO et al., 2008).

Um exemplo típico dessa interação envolve a bactéria gram-negativa do solo *Sinorhizobium meliloti* e seu hospedeiro, alfafa. O microrganismo secreta diferentes substâncias e, entre elas, dois grupos de exopolissacarídeos denominados succinoglucana e galactoglucana que são necessários para a invasão da bactéria e para formação do nódulo fixador de nitrogênio (SHARYPOVA et al., 2006; SERRATO et al., 2008).

Isolados de *Rhizobium huakuii* retirados de nódulos de raízes de *Astragalus sinicus* produziram um EPS composto de glucose, galactose, ribose e ácido glucurônico na proporção de 5:1:1:1. Os resultados de experimentos de degradação com enzimas capazes de hidrolisar succinoglucanas e análises de metilação sugeriram que a cadeia principal desse EPS tem estrutura química comum aos exopolissacarídeos produzidos por *Agrobacterium* sp e *Rhizobium meliloti* (HISAMATSU et al., 1997). Succinoglucana é um polissacarídeo extracelular secretado por isolados de *Rhizobium*, *Agrobacterium* e espécies relacionadas a microrganismos de solo (RIDOUT et al., 1997).

Pesquisas mostram que a invasão nodular por *Rhizobium meliloti* está relacionada à presença do exopolissacarídeo (LEIGH et al., 1987; LYNNE et al., 1993). *Rhizobium meliloti* e *Agrobacterium* sp produzem polissacarídeos (succinoglucana), denominada tipo I, com cadeia principal comum contendo unidades de glucose e galactose (HISAMATSU et al., 1980). Já linhagens de *Rhizobium leguminosarium* produziram polissacarídeos denominados tipo II com cadeia principal formada de unidades de glucose e ácido glucurônico (AMEMURA et al., 1983). Espécies de *Rhizobium* e *Agrobacterium* também produzem glucanas cíclicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 2), cuja função biológica parece estar relacionada com a interação de plantas e bactérias (BREEDVELD et al., 1994).

Leverly e colaboradores (1991) mostraram que linhagens normais de *R. meliloti* produzem um EPS (succinoglucana) formado por unidades repetitivas octassacarídicas, com algumas substituições por acetil e succinil. Mutantes de *R. meliloti* secretaram um outro exopolissacarídeo, denominado EPSb, capaz de formar nódulos para fixação de nitrogênio em alfafa, entretanto foram incapazes de produzir succinoglucana. Evidenciaram também que o EPSb pode executar a mesma função biológica natural que a succinoglucana de *R. meliloti*, consideravelmente mais complexo que o EPSb. Entretanto, as duas estruturas têm uma característica comum que é a presença do dissacarídeo  $\beta$ -Glc-(1 $\rightarrow$ 3)-Gal, o qual poderia representar o ponto de reconhecimento no processo de invasão nodular.

Castellane e Lemos (2007) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono na composição dos exopolissacarídeos produzidos por *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e SEMIA 4080 e observaram predominância de unidades de glucose e galactose com variações nas proporções dos monossacarídeos encontrados. Também foram observados traços de manose, ramnose, ácido glucurônico e ácido galacturônico.

Guentas e colaboradores (2001) avaliaram a estrutura molecular do exopolissacarídeo produzido por uma estirpe de *Rhizobium* sp. B. isolada de nódulos de alfafa. Glucose e ramnose (1:2) foram os principais constituintes, com traços de ácido 2-deoxi-D-arabino hexurônico, caracterizando-se como um EPS diferente daqueles produzidos por outras estirpes de *Rhizobium*. A estrutura química da unidade repetitiva do EPS produzido pelo *Rhizobium* sp. B é semelhante à cadeia principal dos polissacarídeos pertencentes à família das gomas gelanas, conhecidas como bons agentes espessantes.

Considerando que grande parte dos exopolissacarídeos apresenta características físico-químicas que permitem as suas aplicações nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica, as etapas seguintes dessa revisão mostrarão como determinar as características reológicas dessas moléculas, principalmente de exopolissacarídeos bacterianos, enfoque deste trabalho.

### 3.4 Reologia

A reologia é a ciência que estuda a deformação e o fluxo dos materiais sob influência de tensões. Dentro deste contexto, a matéria pode estar no estado líquido, sólido ou gasoso (BRETAS; D'ÁVILA, 2005; DAK; VERMA; JAAFFREY, 2007). Segundo Schramm (2006), sólidos ideais deformam-se elasticamente e a energia necessária

para a deformação é completamente recuperada quando a tensão é removida. Fluidos ideais como líquidos e gases deformam-se irreversivelmente, eles escoam e, neste caso, a energia requerida para a deformação é dissipada dentro do fluido na forma de calor e não pode ser recuperada simplesmente pela remoção das tensões.

A reologia considera dois materiais como ideais: o sólido elástico e o líquido viscoso. No sólido elástico a propriedade de maior interesse é a elasticidade, ou seja, um material com forma definida quando deformado por uma força externa, dentro de certos limites, retornará à sua forma e dimensões originais, após a remoção dessa força. Já no líquido viscoso a propriedade de maior interesse é a viscosidade, que tem como característica não possuir forma definida, escoando irreversivelmente com a aplicação de uma força externa (BRETAS; D'ÁVILA, 2005).

### 3.4.1 Propriedades dos fluidos

Isaac Newton foi o primeiro cientista a expressar a lei básica da viscosimetria, descrevendo o comportamento de fluxo de um líquido ideal (Equação 1) no qual  $\tau$  é a *tensão de cisalhamento*,  $\eta$  é a *viscosidade dinâmica ou aparente* e  $\dot{\gamma}$  é a *taxa de cisalhamento ou deformação*.

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{Equação 1})$$

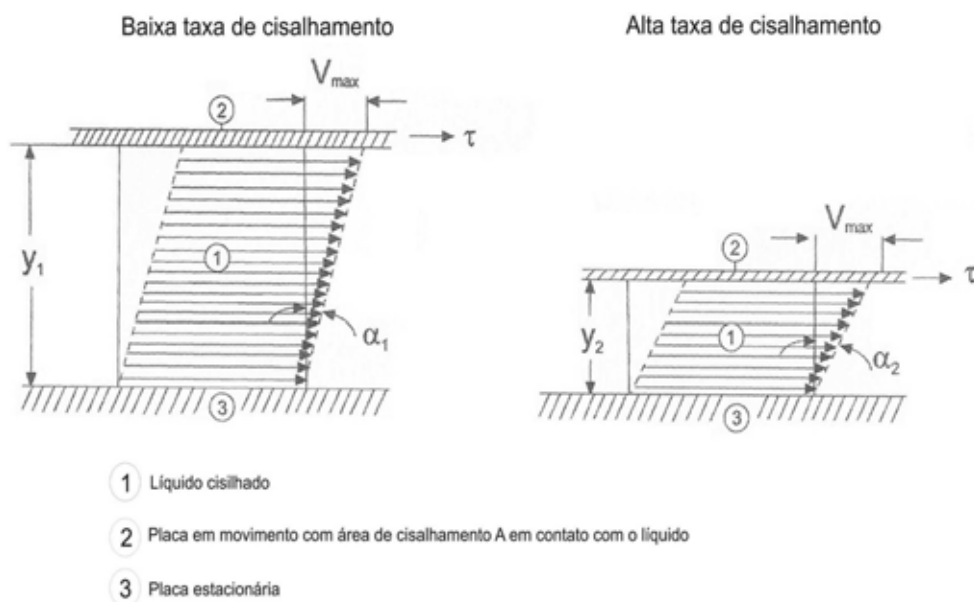
A deformação dos fluidos pode ser estudada a partir da realização de uma força contínua a uma taxa constante. Essa condição pode ser idealizada com a utilização de duas placas paralelas com o fluido colocado no espaço entre elas, como mostra a figura 1. A placa inferior é fixa e a superior se move a uma velocidade constante.

A tensão de cisalhamento refere-se à força aplicada tangencialmente sobre uma área e sua unidade é o Pascal ( $\text{Pa} = \text{N/m}^2$ ). Considerando-se o modelo no qual um fluido é mantido entre duas placas paralelas, onde a superior é móvel e a inferior estacionária, ao se aplicar paralelamente uma força  $F$  na placa superior, a velocidade do fluxo gerado é máxima na camada ligada diretamente à placa móvel e decresce paralelamente através das camadas adjacentes do fluido, até chegar a zero na camada ligada à placa estacionária. Isso ocorre devido à resistência interna do fluido, ou seja, sua viscosidade (SCHRAMM, 2006).

O fluxo de líquidos em camadas paralelas infinitamente finas que deslizam umas sobre as outras, arrastando consigo as camadas adjacentes, é chamado de fluxo laminar. Com o tempo, as camadas líquidas sofrem deformação e a velocidade com a qual a deformação aumenta em relação ao tempo é chamada de taxa de deformação ou cisalhamento e sua unidade é  $s^{-1}$ . Matematicamente, a taxa de deformação é definida pela velocidade relativa das camadas líquidas dividida pela distância entre elas, indicando a rapidez com que o líquido flui ao se aplicar uma tensão de cisalhamento sobre ele (NAVARRO, 1997).

A propriedade física de um líquido de resistir ao fluxo induzido pela tensão aplicada (cisalhamento) é descrita pela viscosidade. Ela é dependente da natureza físico-química da substância, da temperatura, da pressão, da taxa de deformação e do tempo (SCHRAMM, 2006). Fluidos altamente viscosos requerem maior força para se mover do que materiais menos viscosos (BRETAS; D'ÁVILA, 2005). A viscosidade pode ser medida pela fórmula matemática apresentada na equação 2, na qual  $\eta$  é a viscosidade dinâmica ou aparente,  $\tau$  é a tensão de cisalhamento e  $\dot{\gamma}$  é a taxa de cisalhamento ou deformação, tendo como unidade  $N/m^2.s$ , que equivale à Pa.s.

$$\eta = \tau / \dot{\gamma} \quad (\text{Equação 2})$$



**Figura 1** – Fluxo entre duas placas paralelas (SCHRAMM, 2006).

### 3.4.2 Líquidos Newtonianos

Para fluidos que seguem a lei de Newton da viscosimetria, a viscosidade não varia com as mudanças na taxa de deformação, ou seja, a viscosidade é uma constante da relação entre a tensão e a taxa de deformação. Esses líquidos são conhecidos como líquidos Newtonianos e a água é um deles (TOSIN, 2008).

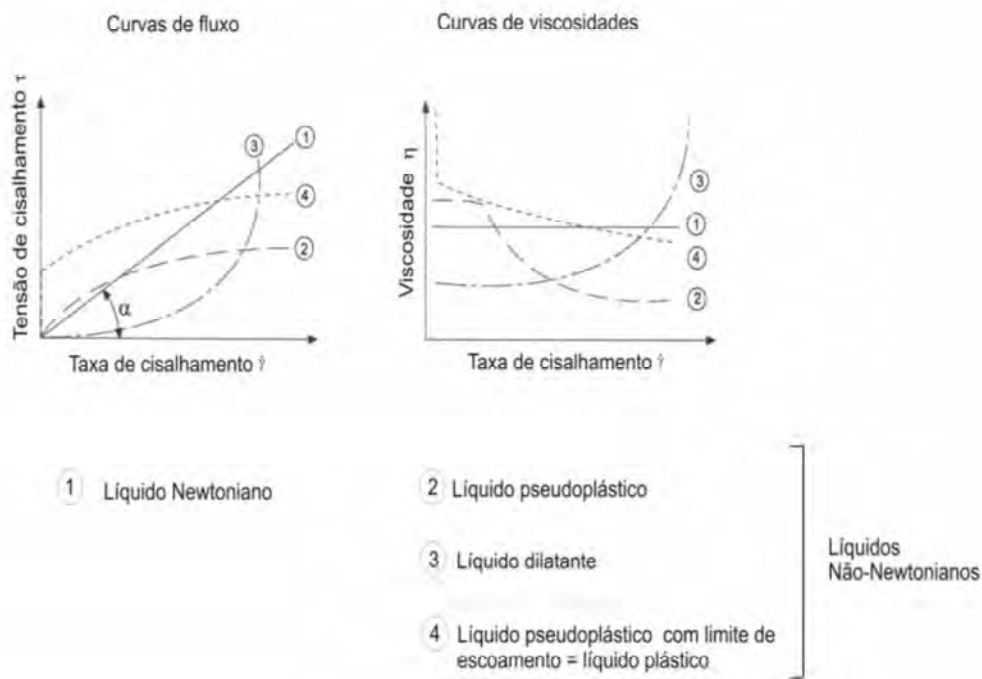
Newton assumiu que o gráfico equivalente à equação 1 para um líquido ideal seria uma linha reta, com início na origem da curva de fluxo ( $\tau$  x  $\dot{\gamma}$ ), e que esta reta subiria com uma inclinação de ângulo  $\alpha$  (Figura 2). Qualquer ponto desta reta define pares de valores para  $\tau$  e  $\dot{\gamma}$ . Dividindo um pelo outro se obtém o valor de  $\eta$  (Equação 2). Como a curva de fluxo para um líquido ideal é uma reta, a razão de todos os pares de valores de  $\tau$  e  $\dot{\gamma}$  pertencentes a essa reta é constante (Figura 2). Isso significa que a viscosidade ( $\eta$ ) não é afetada por mudanças na taxa de deformação. Todos os líquidos para os quais essa afirmativa é verdadeira são chamados de líquidos Newtonianos, é o caso de líquidos puros, soluções verdadeiras diluídas e poucos sistemas coloidais. Ex: água, óleo mineral, etc. (SCHRAMM, 2006).

### 3.4.3 Líquidos não-Newtonianos

Todos os outros líquidos que não exibem comportamento de fluxo “ideal” são chamados de não-Newtonianos (Figura 2).

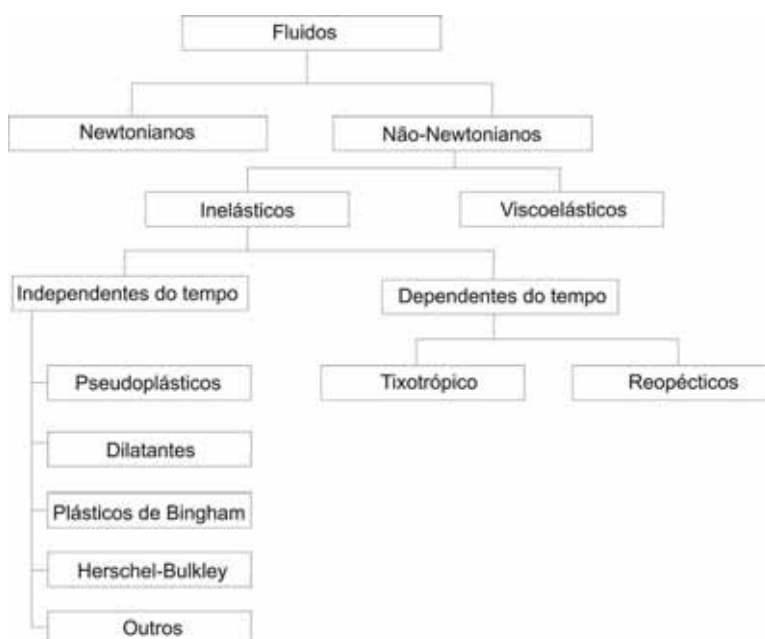
Fluidos não-Newtonianos viscoelásticos podem ser descritos como aqueles que apresentam, simultaneamente, propriedades de fluidos (viscosas) e de sólidos (elásticas). Já os fluidos não-Newtonianos inelásticos são todos aqueles que, de alguma maneira não se comportam de acordo com a relação descrita pela Equação 1, quando são submetidos a uma deformação (TONELI; MURR; PARK, 2005).

Os líquidos não-Newtonianos, sob certas condições de tensão e taxa de deformação, independentemente do tempo (a viscosidade não depende da duração da taxa de deformação), podem ter comportamento de fluxo pseudoplástico (*shear thinning*), dilatante (*shear thickening*) ou plástico, conforme Figura 2.



**Figura 2** – Vários tipos de comportamento de fluxo (SCHRAMM, 2006).

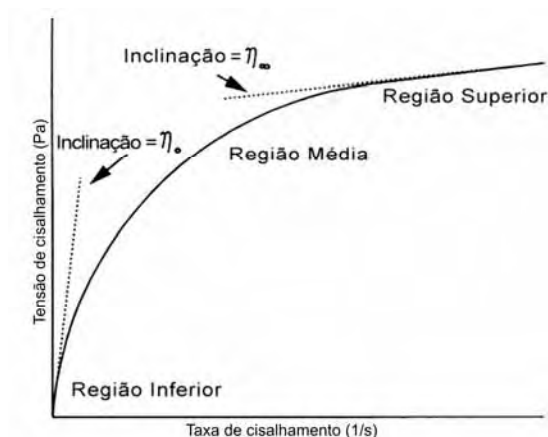
As propriedades físico-químicas de exopolissacarídeos microbianos são explicadas em termos de diferentes comportamentos reológicos (Figura 3) os quais incluem comportamento de fluxo pseudoplástico, elasticidade, tixotropia e viscoelasticidade (KUMAR; MODY; JHA, 2007).



**Figura 3** – Esquema de classificação do comportamento reológico de fluidos (TONELI; MURR; PARK, 2005).

Os líquidos pseudoplásticos apresentam uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de deformação, que depende principalmente da orientação/alinhamento de moléculas ou partículas na direção do fluxo, superando o movimento Browniano de moléculas. Em taxas de deformação muito baixas, o movimento Browniano das moléculas as mantêm em uma ordem interna irregular, sem alteração significativa da estrutura tridimensional, apesar dos efeitos iniciais da orientação de cisalhamento. Deste modo, o líquido apresenta um comportamento semelhante ao dos líquidos Newtonianos, com a viscosidade independente da taxa de deformação. Quando o cisalhamento excede o efeito aleatório do movimento Browniano, a viscosidade cai drasticamente pela indução do alinhamento das moléculas na direção do fluxo. Em taxas de deformação extremamente altas, a viscosidade se aproxima de um nível finito constante. Taxas de deformação ainda maiores não são mais capazes de reduzir a viscosidade, pois o ótimo da orientação/alinhamento das moléculas foi alcançado. Este alinhamento se perde quando o cisalhamento diminui ou é interrompido. Dentre os líquidos pseudoplásticos estão diversas substâncias de alta importância técnica e comercial, tais como soluções poliméricas, emulsões, suspensões ou dispersões (VRIESMANN, 2008).

Os fluidos pseudoplásticos, durante o escoamento, podem apresentar três regiões distintas de taxas de deformação: baixa, média e alta, como mostra a figura 4. Na região newtoniana ou de baixas taxas de deformação, a viscosidade aparente ( $\eta_0$ ), 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 ( $\eta$ ) diminui com o aumento da taxa de deformação (comportamento pseudoplástico) e, na região de altas taxas de deformação, a viscosidade aparente ( $\eta_\infty$ ) volta a ficar constante e é chamada de viscosidade limitante a taxas de deformação infinitas (TONELI; MURR; PARK, 2005).



**Figura 4:** Reograma idealizado para um fluido pseudoplástico (adaptado de TONELI; MURR; PARK, 2005).

Os líquidos dilatantes mostram um aumento da viscosidade quando a taxa de deformação aumenta, pois as partículas exigem um espaço maior para o movimento e, havendo líquido disponível para ocupar os novos espaços, o fluido se dilata (TONELI, MURR, PARK, 2005).

Os fluidos plásticos não fluem até que uma tensão de cisalhamento crítica (*yield point*) seja excedida. O sistema em repouso apresenta um caráter sólido, com uma viscosidade extremamente alta em razão das forças das ligações intermoleculares, as quais restringem mudanças de posição de elementos de volume, e impedem o fluxo. Quando a força externa excede as forças das ligações, verifica-se um ponto de ruptura, no qual a estrutura entra em colapso, os elementos de volume podem mudar de posição irreversivelmente, o sólido se torna líquido e começa a fluir. Em outras palavras, a plasticidade descreve líquidos pseudoplásticos com limite de escoamento, tais como graxa, massas para batom, pasta de dentes e borrachas naturais (SCHRAMM, 2006; TOSIN, 2008).

#### 3.4.4 Modelando o comportamento reológico de fluidos

A modelagem provê meios para representar uma larga quantidade de dados reológicos em termos de uma simples expressão matemática. Muitas formas de equações são possíveis, no entanto, um modelo geral que se aplique a todas as situações não existe. Normalmente utilizam-se modelos de dois e três parâmetros para o ajuste de



dados reológicos, sendo os mais utilizados Lei da Potência (Ostwald-de-Waele) e Casson de dois parâmetros e Herschel-Bulkley de três parâmetros (PELEGRINE et al. 2002).

#### 3.4.4.1 Modelo de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência):

A equação 3 representa a chamada Lei da Potência, na qual  $K$  é o coeficiente de consistência e  $n$  é o índice de comportamento de fluxo. O valor de  $n$  é uma medida da “pseudoplasticidade” do polímero (BRETAS; D’ÁVILA, 2005). 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 (TONELI; MURR; PARK, 2005)

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{Equação 3})$$

$K$  = Coeficiente de consistência (Pa.s)

$n$  = Índice de comportamento (adimensional)

$\dot{\gamma}$  = Taxa de deformação ( $s^{-1}$ )

$\tau$  = Tensão de cisalhamento (Pa)

Este modelo tem sido adotado como ideal para interpretar o comportamento do purê de pêssego (TORALLES; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2006) e polpa de manga (VIDAL et al., 2006).

#### 3.4.4.2 Modelo de Herschel-Bulkley:

É uma forma modificada do modelo proposto por Ostwald-de-Waele, conforme ilustra a equação 4. Como é possível observar, esse modelo difere da Lei da Potência apenas pela existência da tensão de cisalhamento inicial ( $\tau_0$ ) (FERREIRA; GUIMARÃES; MAIA, 2008), ou seja, uma vez que a tensão aplicada ao fluido ultrapasse o valor da tensão inicial, o material passa a se comportar de acordo com o modelo da Lei da Potência.

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{Equação 4})$$

$K$  = Coeficiente de consistência (Pa.s)  
 $n$  = Índice de comportamento (adimensional)  
 $\dot{\gamma}$  = Taxa de deformação ( $s^{-1}$ )  
 $\tau$  = Tensão de cisalhamento (Pa)  
 $\tau_0$  = Tensão de cisalhamento inicial (Pa)

Segundo Cabral e colaboradores (2002) este modelo descreve os melhores parâmetros estatísticos para polpa de cupuaçu.

#### 3.4.4.3 Modelo de Casson:

Casson (1959) elaborou esse modelo para uma suspensão de partículas interagindo num meio newtoniano, obtendo expressão matemática correspondente à equação 5. É usado para fluidos que só iniciam o processo de escoamento quando a tensão de cisalhamento aplicada supera uma tensão inicial, que é própria de cada material (HAMINIUK, 2007). Tem sido adotado como método ideal para interpretar o comportamento do chocolate pelo “*International Office of Cocoa and Chocolate*” (BRANCO; GASPARETTO, 2005).

$$\tau^{1/2} = K_{oc} + K_c \dot{\gamma}^{1/2} \quad (\text{Equação 5})$$

$\tau$  = Tensão de cisalhamento (Pa)  
 $\dot{\gamma}$  = Taxa de deformação ( $s^{-1}$ )  
 $K_{oc}$  = Tensão inicial do modelo de Casson (Pa)  
 $K_c$  = Viscosidade plástica de Casson (mPa.s)

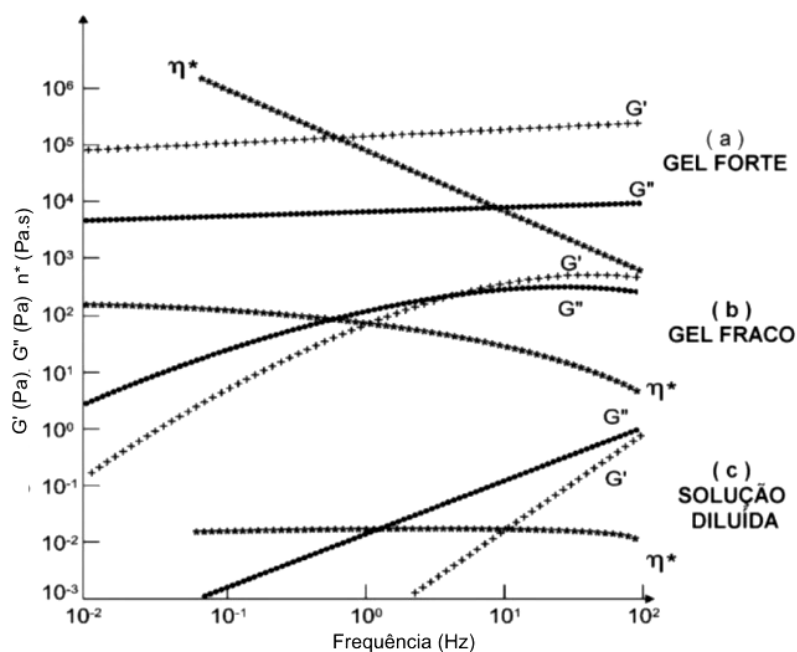
#### 3.4.5 Viscoelasticidade e soluções poliméricas

A grande maioria dos fluidos apresenta um comportamento reológico que os classifica entre os líquidos e sólidos: eles são chamados de viscoelásticos. Deste modo, a viscosidade e a elasticidade são duas possibilidades de resposta à tensão a que são submetidos. O comportamento sólido (distensão) ou líquido (fluxo) vai depender das características relacionadas ao tempo natural de relaxação e ao tempo de duração do experimento (SCHRAMM, 2006).

No estudo do comportamento viscoelástico dos sistemas reais de polissacarídeos, os caracteres sólido e líquido podem ser quantificados, respectivamente, através dos módulos de armazenamento ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ), em função da frequência, ambos expressos em Pascal (Pa), e que são componentes do módulo complexo ( $G^*$ ), que representa a resistência total à deformação.

O módulo de armazenamento,  $G'$ , também denominado módulo elástico, é a razão entre a tensão aplicada e a deformação provocada em fase e indica que a energia de tensão é armazenada temporariamente durante o teste e pode ser recuperada mais tarde. O módulo de perda,  $G''$ , também denominado módulo viscoso, é a razão entre a tensão aplicada e a deformação provocada fora de fase; faz alusão ao fato de que a energia usada para iniciar o fluxo é irreversivelmente dissipada ou perdida, sendo transformada em calor de cisalhamento. O módulo complexo ( $G^*$ ), por sua vez, pode definir uma viscosidade dinâmica complexa  $\eta^*$ , considerada análoga da viscosidade absoluta  $\eta$ , sendo a razão entre o  $G^*$  e a frequência ( $f$ ). A frequência, expressa em *Hertz* (Hz), pode ser considerada como análoga da taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) (SCHRAMM, 2006; TORRES et al., 2006).

Em uma varredura de frequência, a deformação é aumentada passo a passo. A figura 5 ilustra a representação gráfica para sistemas polissacarídicos submetidos a medidas reológicas dinâmicas.



**Figura 5** - Representação gráfica genérica de sistemas polissacarídicos submetidos a medidas reológicas dinâmicas. a) gel forte b) solução concentrada ou gel fraco e c) solução diluída (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; SCHRAMM, 2006).

Quando o módulo  $G'$  é maior que  $G''$ , em toda faixa de frequência utilizada no experimento (Figura 5a), apresenta uma resposta predominantemente sólida, e ambos os módulos  $G'$  e  $G''$  são essencialmente independentes da frequência na região de viscoelasticidade, como esperado para uma rede elástica. Quanto maior o valor de  $G'$ , maior é o caráter sólido do gel e as deformações serão elásticas ou recuperáveis. A viscosidade dinâmica complexa  $\eta^*$  diminui linearmente com o aumento da frequência (TORRES et al., 2006; ZHANG et al, 2008), tratando-se, portanto, de um gel forte.

Soluções concentradas de polímeros ou géis fracos apresentam comportamento de fluxo semelhante ao de um líquido, em baixas frequências, onde há predomínio de  $G''$  devido a reorganização da rede (Figura 5b). Quando a frequência vai aumentando em relação à reorganização molecular, ocorre distorção da rede, com  $G'$  aumentando mais rapidamente que  $G''$ . Desta forma, os módulos tornam-se praticamente iguais e se cruzam em determinado ponto, chamado de ponto de gelificação, a partir do qual  $G'$  torna-se maior que  $G''$  e há predomínio do caráter sólido (XU; LIU; ZHANG, 2006).

O comportamento típico de uma solução polimérica diluída é demonstrado na figura 5c, na qual o módulo  $G'$  é significativamente mais baixo que o módulo  $G''$ , e ambos tendem a zero quando a frequência tende a zero. A viscosidade dinâmica complexa  $\eta^*$  apresenta um comportamento essencialmente linear com o aumento de frequência (CHAMBERLAIN; RAO, 1999).

O estudo do acompanhamento das variações de  $G'$  e  $G''$  e  $\eta^*$  com a variação da frequência permite caracterizar o comportamento viscoelástico dos sistemas polissacarídicos e essas informações são importantes para se conhecer a força de um gel.

### 3.5 Algumas características reológicas de polissacarídeos ácidos

As características físico-químicas de polissacarídeos são dependentes da seqüência em que os açúcares estão dispostos na molécula, da forma como suas cadeias interagem e da presença de resíduos iônicos carregados encontrados nas ramificações. As cargas existentes nos grupos funcionais ácidos, presentes na estrutura, atuam na conformação molecular e aumentam a solubilidade do biopolímero (KUMAR; MODY; JHA, 2007).

Kaci e colaboradores (2005) isolaram e identificaram um EPS produzido por uma estirpe de *Rhizobium*, de solos áridos, como um polímero formado por glucose,

galactose e ácido manurônico na proporção molar de 2:1:1. Análises reológicas mostraram que as soluções do polissacarídeo têm comportamento de fluido pseudoplástico, sendo utilizado como agente espessante, com propriedades polieletrólíticas.

Segundo Beyer e colaboradores (1987), soluções a 1 % do EPS produzido por *Rhizobium* CB744 quando submetidas à temperatura de 65 °C e elevadas taxas de deformação, apresentam um decréscimo da viscosidade. A diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de deformação e temperatura é uma característica comum aos biopolímeros bacterianos (SHIMADA; NAKATA; NAKAMURA, 1997).

Shimada e colaboradores (1997) avaliaram o efeito da concentração de NaCl na viscosidade intrínseca do exopolissacarídeo ácido produzido por *Enterobacter* sp. Observaram uma diminuição nos valores da viscosidade intrínseca com o aumento da concentração de NaCl, o que é característico de polieletrólitos. Polissacarídeos ácidos como as gomas xantana, gelana e karaya são típicos polieletrólitos.

PINTO e colaboradores (2002) também estudaram a viscosidade do biopolímero ácido produzido pela bactéria *Beijerinckia* sp em solução de CaCO<sub>3</sub> e KCl, em diferentes valores de pH. Na maior parte dos resultados houve uma diminuição da viscosidade das suspensões aquosas analisadas.

Árvores do gênero *Sterculia* secretam polissacarídeos ácidos que formam soluções de alta viscosidade e com características gelificantes. O polímero de *Sterculia striata* é acetilado e tem como principais constituintes galactose e ramnose, além de ácidos glucurônico e galacturônico. A adição de NaCl às soluções polissacarídicas de *S. striata* em diferentes concentrações, resulta na diminuição da viscosidade intrínseca com o aumento da força iônica. Assim como observado para a gelana, a diminuição nos valores da viscosidade intrínseca com o aumento da concentração de NaCl confirma o comportamento de polieletrólito do polissacarídeo de *S. striata* e a cadeia torna-se mais flexível com o aumento da concentração de sal (BRITO et al., 2004).

BRITO e colaboradores (2005) estudaram o comportamento reológico, em sistema dinâmico, do polissacarídeo chichá, produzido por *Sterculia striata*, e da goma karaya. Observaram que a goma karaya forma géis mais fortes e com pequenas variações conformacionais com o aumento da temperatura, entretanto, a adição de NaCl diminui a força dos géis de ambos os polissacarídeos.

Yamazaki, Kurita e Matsumura (2009) avaliaram o hidrocolóide ácido extraído de folhas de *Corchorus olerius* L., o qual demonstrou um caráter de gel em concentrações acima de 5 g/L. A viscosidade deste polímero foi maior do que a das gomas

guar e locuste, nas mesmas condições. Sob aquecimento, acima de 60 °C houve aumento irreversível da viscosidade, sugerindo mudança conformacional nas moléculas deste polissacarídeo.

A adição de sais inorgânicos às soluções polissacarídicas pode promover modificações, aumentando ou diminuindo a viscosidade das soluções (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004).

As propriedades reológicas das soluções de xantana são dependentes da concentração do polímero e de qualquer eletrólito adicionado (MARTÍNEZ-RUVALCABA; CHORNET; RODRIGUE, 2007). A adição de eletrólito reduz o valor do módulo elástico quando comparado com medidas de solução aquosa de xantana. Este comportamento é típico de polieletrólitos e pode ser atribuído ao resultado da mudança na conformação, causando uma diminuição no volume hidrodinâmico e decrescendo os valores dos parâmetros reológicos. Acima da concentração crítica, a adição de eletrólito pode induzir a um aumento nos valores dos parâmetros reológicos por associações intermoleculares, facilitadas pela redução das repulsões eletrostáticas e ordenação das cadeias, conduzindo a uma rede tridimensional (PELLETIER et al., 2001). A exploração da goma xantana pela indústria de alimentos se deve, principalmente, ao seu comportamento não-Newtoniano e formação de soluções pseudoplásticas em baixas concentrações (SHOBHA; THARANATHAN, 2009).

As propriedades das soluções de polissacarídeos podem ser modificadas por interação com outros polissacarídeos, alterando assim as propriedades reológicas das soluções. A goma xantana, por si só, não é capaz de formar um gel forte, mas forma um gel termorreversível quando em presença de outro polissacarídeo, como galactomananas (BRESSOLIN et al., 1998) e a quitosana a qual o gel resultante apresenta uma boa textura, é elástico e resistente (MARTÍNEZ-RUVALCABA; CHORNET; RODRIGUE, 2007).

A maioria das aplicações práticas dos polissacarídeos envolve a habilidade dessas moléculas em alterar as propriedades físicas do meio onde se encontram, seja por conferir alta viscosidade às soluções ou por criar redes intermoleculares coesivas. A formação de géis é um processo muito importante, pois a estrutura do gel influencia o processamento dos mais diversos produtos (VRIESMANN, 2008).

Nas áreas da ciência dos alimentos, a reologia possui grande importância. Segundo Haminiuk (2007), muitas das propriedades texturais que os humanos percebem quando consomem alimentos são basicamente de natureza reológica, isto é, cremosidade,

suculência, maciez, suavidade e dureza e, segundo Toneli e colaboradores (2005) os dados reológicos em alimentos são essenciais para:

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

De acordo com Saude e colaboradores (2002), para que os polissacarídeos possam ser aplicados na indústria há necessidade que algumas informações sobre estrutura química e características físico-químicas, tais como o comportamento reológico, sejam previamente conhecidos. Neste contexto, este trabalho teve como principal objetivo realizar alguns estudos para determinar o comportamento reológico das soluções formadas pelos exopolissacarídeos produzidos pelas diferentes estirpes de bactérias do gênero *Rhizobium* e *Mesorhizobium* acreditando na possibilidade de aplicação futura desta família de polímeros na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Microrganismos

Os exopolissacarídeos utilizados para as análises foram fornecidos pela Professora Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal. Detalhes das condições de cultivo dos microorganismos produtores dos EPS estão sob sigilo de patente com registro PI0304053-4.

Três diferentes linhagens de bactérias do gênero *Rhizobium* foram utilizadas para a produção dos exopolissacarídeos utilizados neste trabalho. Os EPS, denominados R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>, foram produzidos a partir da mesma estirpe, *Rhizobium tropici*, com diferenças nas condições de cultivo (dados não disponíveis), o que pode acarretar diferenças na constituição química e, conseqüentemente, em suas propriedades físico-químicas. O EPS R<sub>3</sub> foi produzido a partir de uma linhagem denominada *Mesorhizobium* e o EPS R<sub>4</sub> a partir de uma estirpe selecionada conhecida como *Rhizobium* sp.

#### 4.1.2 Reagentes

Os principais reagentes químicos utilizados para o preparo das soluções e os experimentos foram de grau analítico, obtidos da Merck, Fluka ou Sigma.

#### 4.1.3 Equipamentos

Balanças Analíticas Mettler Toledo AB204, Micronal e balanças semianalíticas Gehaka BG-440 e Gehaka BG-2000

Cromatógrafo Líquido de Troca Iônica (HPAEC) com detector Eletroquímico modelo ED 40, Bomba Gradiente modelo GP 40 e Integrador modelo 4600 da Dionex

Liofilizador modelo E.C, Edwards

Estufa incubadora Nova Ética 411D

Evaporador Rotativo Buchi, modelo R-114, e banho-maria Buchi, modelo B-480



Microcentrífuga Beckman

Espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-VIS 1601

Destilador marca Quimis

Deionizador Water Pro PS, Labconco

Cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) SHIMADZU, equipado com um detector de índice de refração diferencial SHIMADZU modelo RID 10A

Reômetro HAAKE RS75 Rheostress acoplado a um banho termostaticado HAAKE K15, a um termocirculador de água DC5B3 e sistema Peltier (TC81).

## **4.2 Métodos gerais**

### **4.2.1 Preparo das amostras para análises**

Os polissacarídeos foram disponibilizados secos e moídos (Figura 8). Em seguida solubilizados em água deionizada e dialisados contra água corrente por 48 horas e contra água destilada por 24 horas, para a retirada de sais provenientes do meio de cultivo. Após diálise exaustiva (72 horas) os EPS foram liofilizados. Alíquotas de 5 mg foram retiradas, solubilizadas em água destilada e submetidas às análises descritas a seguir.

### **4.2.2 Análises quantitativas nos EPS R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>**

#### **4.2.2.1 Determinação de açúcares totais - método do fenol - ácido sulfúrico**

O método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS; GILLES; HAMILTON, 1956) foi utilizado para determinar a concentração de carboidrato total nos respectivos EPS (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>). O método consiste na formação do derivado furfural, na presença de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, que reage com o fenol formando um complexo de cor alaranjada. Foi seguido o protocolo original do método, conforme descrito:

Reagentes: Solução de fenol 5 % (m/v), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

Procedimento: foi adicionado 0,5 mL da solução de fenol a 0,5 mL da amostra e, em um único jato, foram adicionados 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Após 10 minutos em repouso, foi feita a leitura espectrofotométrica a 480 nm.

Para calcular a concentração de carboidratos, foi realizada uma curva padrão de glucose (0,1 %), com faixa de sensibilidade de 10 a 100 µg.

#### **4.2.2.2 Determinação dos açúcares redutores - método de Somogyi – Nelson**

A presença de açúcar redutor nas amostras foi determinada pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944). Neste método, os açúcares redutores reduzem o reativo cupro-alcálico de Somogyi formando óxido cuproso, que na presença do reativo arseno-molibdico de Nelson forma um complexo de óxido de molibdênio de cor azul estável.

Reagentes: reativo arseno-molibdico de Nelson (NELSON, 1944) e reativo de Somogyi (SOMOGYI, 1945).

Procedimento: a 0,5 mL da amostra contendo de 10 a 80 µg de açúcares redutores foram acrescentados 0,5 mL do reativo de Somogyi. Os tubos foram cobertos com pérolas de vidro, para evitar a evaporação do solvente, e levados ao aquecimento em banho fervente por 10 minutos. Em seguida, foram resfriados e adicionados 0,5 mL do reagente de Nelson e acrescentados 3,5 mL de água destilada. Os tubos foram agitados e lidos em espectrofotômetro em 540 nm.

Para calcular a concentração de açúcares redutores nas amostras foi usada uma curva padrão de glucose a 0,1%. A curva de calibração foi desenvolvida na faixa de concentração de 10 a 100 µg, de acordo com a estimativa do teor de carboidratos da amostra.

#### **4.2.2.3 Determinação de proteínas - método de Bradford**

A determinação da concentração de proteínas nas amostras foi realizada pelo método de Bradford (1976) que se baseia na ligação do corante (*Coomassie Blue G-250*) com a proteína, formando um complexo de cor azul. O corante reage preferencialmente com resíduos de arginina e, em menor extensão, com resíduos de histidina, lisina, tirosina, triptofano e fenilalanina.

Solução estoque: 40 mg de *Coomassie Blue G-250* foram dissolvidos em 20 mL de etanol absoluto. Foram adicionados 40 mL de ácido fosfórico 85 % e água destilada para completar 100 mL de solução.

Solução de uso: foi feita uma diluição (1:4, v/v) da solução estoque em água e, em seguida, filtrada em papel de filtro.

Procedimento: foi adicionado 1 mL da solução com o corante a 100 µL da amostra e em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

A concentração de proteína foi calculada através de uma curva de calibração com albumina bovina (BSA), na faixa de concentração de 10 a 50 µg.

#### **4.2.2.4 Determinação de ácidos urônicos - método de Blumenkrants modificado**

A dosagem de ácido urônico foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Em 400 µL de amostra (100 µg/mL) foram adicionados 40 µL de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M (pH 1,6) e 2,4 mL de solução de tetraborato de sódio 75 mM, em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Após aquecimento em banho com H<sub>2</sub>O fervente por 20 min, esta mistura foi resfriada e adicionados 80 µL da solução de m-hidroxi-bifenil (Sigma) a 0,15 % em NaOH 0,5 %, para a produção do complexo colorido.

A coloração, estável até 1 hora após sua formação, foi lida em 525 nm. A quantificação foi realizada com o auxílio de uma curva padrão de ácido glucurônico (Sigma) dentro da sensibilidade do método (0,97 a 38,8 µg de ácido urônico).

#### **4.2.3 Análise da homogeneidade por cromatografia de filtração em gel (HPSEC)**

Para análise de homogeneidade foi preparada uma solução de 1mg de amostra em 1mL de solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9 %). As soluções obtidas foram filtradas em membranas *MILLIPORE* (acetato de celulose) 0,22 µm.

As análises de homogeneidade foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) *SHIMADZU*, equipado com um detector de índice de refração diferencial *SHIMADZU* modelo RID 10A. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação *WATERS*, com limites de exclusão de  $1 \cdot 10^6$ ,  $4 \cdot 10^5$ ,  $8 \cdot 10^4$  e  $5 \cdot 10^3$ , dispostas em série. O eluente utilizado foi uma solução de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub> 0,1 M) contendo azida sódica (0,03 %), pressão de 1422 Psi a 37 °C e fluxo de 0,6 mL/min. Foi utilizado o programa LC Solution (*SHIMADZU CORPORATION*) para analisar os dados obtidos.

#### **4.2.4 Hidrólise ácida total**

Preparo da amostra: alíquotas das amostras, contendo 50 µg de açúcares totais, foram distribuídas em tubos próprios para hidrólise, congeladas e liofilizadas.

Hidrólise: a hidrólise ácida foi efetuada pela adição de 300 µL de ácido trifluoracético (TFA) 5 M à amostra seca, a seguir cada amostra foi solubilizada, o tubo selado e aquecido a 100 °C por 12 horas (VASCONCELOS et al., 2008). O ácido foi removido por evaporação em evaporador rotativo (BUCHI – R 114), com consecutivas trocas de H<sub>2</sub>O deionizada até a evaporação total do ácido. As amostras foram solubilizadas em 500 µL de H<sub>2</sub>O deionizada, sendo posteriormente analisadas no cromatógrafo líquido de alta pressão (HPAEC). As condições da análise cromatográfica foram efetuadas como descrito por Mendes e colaboradores (2009).

#### **4.2.5 Análise da composição de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta pressão e coluna de troca iônica (HPAEC)**

Para análise dos monossacarídeos foi utilizado um sistema Dionex DX500 (cromatografia líquida de íons) com detector de amperometria integrada (IAD). Os cromatogramas foram registrados em um integrador modelo 4600. Os açúcares neutros foram separados isocraticamente, usando uma coluna analítica CarboPac PA1 (4x250 mm) equipada com guarda coluna PA1, e fluxo de 1 mL/min. As condições de eluição foram produzidas utilizando H<sub>2</sub>O deionizada (eluyente 1) e NaOH 200 mM (eluyente 2) preparada a partir de uma solução de NaOH 50 %.

A coluna foi regenerada após 25 min de corrida com 100% do eluyente 2, por 10 minutos. Em seguida retornou às condições iniciais da corrida por cerca de 15 minutos (para equilibrar a coluna), antes da injeção da amostra.

Procedimento: 25 µL da solução em estudo, contendo 1 µg de açúcares totais, foram injetados no Dionex.

Padrões: foi utilizada como padrão uma mistura de açúcares neutros contendo 200 ng/25 µL de cada um dos seguintes monossacarídeos: L-fucose, L-ramnose, D-galactose, D-glucose e D-manose totalizando 1 µg/25 µL de açúcares totais.

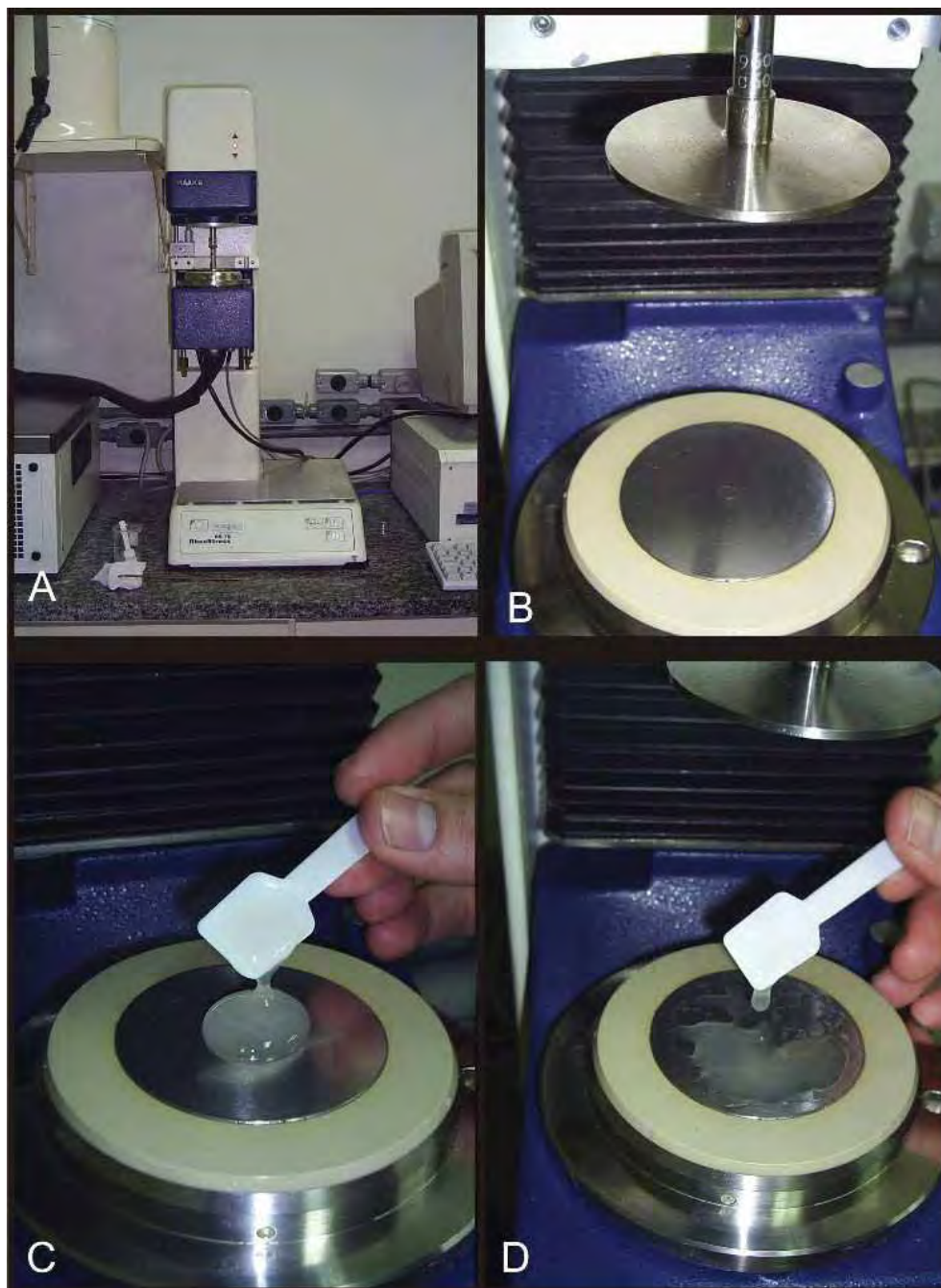
### **4.3 Análises reológicas**

As análises reológicas foram efetuadas em colaboração com a Professora Dra. Joana Léa Meira Silveira do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

#### **4.3.1 Métodos reológicos**

Foi utilizado um reômetro HAAKE RS75 Rheostress acoplado a um banho termostaticado HAAKE K15 e termocirculador de água DC5B3 e a um sistema controlador de temperatura, denominado sistema Peltier (TC81) (Figura 6). Os testes foram conduzidos à temperatura de 25 °C para as análises em sistema estático e 5 °C e 25 °C para as análises em sistema dinâmico; o sensor utilizado foi o cone-placa (C60/2Ti°).

Antecedendo as análises reológicas, foi efetuada a determinação da inércia do aparelho com o sensor em posição de análise, a fim de descontar os valores das forças centrífuga e centrípeta, geradas durante os experimentos. Este procedimento se repetiu a cada troca de amostra. Os testes foram executados em duplicata, sendo efetuado a triplicata quando os valores da duplicata se mostravam muito diferentes. Durante as análises a temperatura ambiente foi mantida entre 20 e 21 °C.

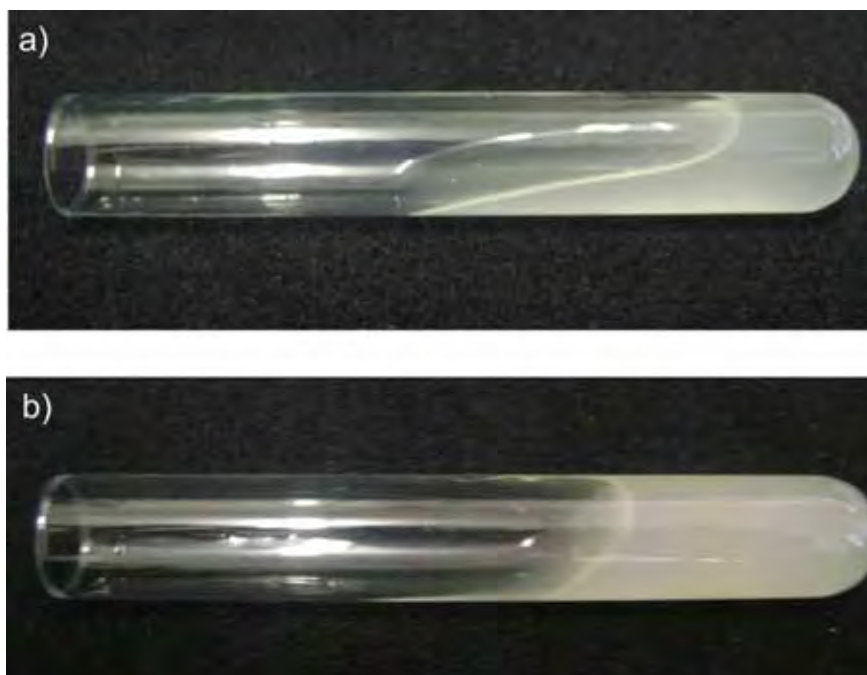


**Figura 6** – A) Reômetro HAAKE RS75 Rheostress; B) Sensor cone-placa (C60/2Ti°) ; C) Amostra sobre a placa estacionária do reômetro; D) Exopolissacarídeo R<sub>3</sub> após varredura, a 25 °C.

#### 4.3.2 Preparo das soluções dos exopolissacarídeos

Para os experimentos de reologia, os exopolissacarídeos (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>) foram individualmente solubilizados em água deionizada à temperatura de  $\pm 20$  °C, nas concentrações de 2 g/L, 5 g/L e 10 g/L (Figura 7). As amostras foram mantidas sob agitação mecânica constante, à temperatura de  $\pm 20$  °C por 18 horas. Com o objetivo de

avaliar o comportamento reológico dos biopolímeros na presença de sais, os mesmos foram solubilizados em NaCl 0,2 M na concentração de 5 g/L.



**Figura 7.** Soluções aquosas do EPS R<sub>2</sub> à temperatura de 25 °C. (a) 5 g/L e (b) 10 g/L.

#### 4.3.2.1 Determinação das viscosidades absolutas

O sensor cone-placa (C60/2Ti°) foi utilizado para analisar as soluções poliméricas em concentrações de 2, 5 e 10 g/L. Este instrumento consiste de uma placa plana inferior estacionária e um cone rotatório superior com diâmetro de 60 mm e ângulo de 2°. O fluido permanece entre a placa e o cone, sem espalhar-se, devido à tensão superficial, preenchendo inteiramente o espaço entre eles, de modo que as medições não sejam alteradas. O cone atua em velocidades de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) controladas, e o arraste viscoso sob o cone rotativo exerce uma força de rotação que é proporcional à tensão de cisalhamento ( $\tau$ ).

### 4.3.2.2 Curvas de fluxo

As curvas de fluxo (tensão de cisalhamento x taxa de deformação) foram realizadas em modo CR (*Controlled Rate Rheometers*) a 25 °C, com variação da taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) de 0 até 200,0 s<sup>-1</sup>, no intervalo de tempo de 300 s para concentrações de 2, 5 e 10 g/L, com aquisição de 200 pontos em escala logarítmica. As amostragens foram realizadas em duplicata à temperatura de 25 °C. Quando os valores encontrados para as duplicatas eram muito díspares, procedia-se a terceira análise ou a triplicata. Os reogramas, para cada uma das seis concentrações de cada EPS, foram gerados utilizando software *RheoWin* (versão 3.20).

### Modelos de fluxo e parâmetros reológicos

Os modelos testados para estudar o comportamento de fluxo estão resumidos na tabela 2.

**Tabela 2** – Modelos ajustados e suas equações.

| Modelo           | Equação  | Eqs. |
|------------------|--|------|
| Lei da Potência  | $\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$                | (1)  |
| Herschel-Bulkley | $\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n$       | (2)  |
| Casson           | $\tau^{1/2} = K_{oc} + K_c \dot{\gamma}^{1/2}$ | (3)  |

Onde:

$\tau$  = Tensão de cisalhamento (Pa)

$\dot{\gamma}$  = Taxa de deformação (s<sup>-1</sup>)

$\tau_0$  = Tensão de cisalhamento inicial (Pa)

K = Coeficiente de consistência (Pa.s)

n = Índice de comportamento (adimensional)

$K_{oc}$  = Tensão inicial do modelo de Casson (Pa)

$K_c$  = Viscosidade plástica de Casson (mPa.s)

Os parâmetros das Equações (1), (2) e (3) apresentados na tabela 2 foram estimados a partir do ajuste dos reogramas experimentais aos modelos da Lei da Potência, Herschel- Bulkley e Casson.



A escolha do modelo adequado foi baseada em parâmetros estatísticos do Coeficiente de regressão ou determinação ( $R^2$ ) e Chi-quadrado ( $\chi^2$ ). O modelo considerado mais apropriado é aquele com maiores valores de Coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e menores valores Chi-quadrado ( $\chi^2$ ) (HAMINIUK et al., 2006).

#### **4.3.3 Determinação da tixotropia em sensor cone-placa**

A determinação da tixotropia foi efetuada em sensor cone-placa (C60/2Ti°) nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, para cada EPS. Foi realizada a curva de histerese ( $\tau \times \dot{\gamma}$ ) na qual se verificou a subida (ascendente) da curva durante 300 s, e a descida (descendente) também por 300 s, com taxa de deformação de 0 até 200,0  $s^{-1}$ , à temperatura de 25 °C.

#### **4.3.4 Análise oscilatória em sistema Dinâmico - Varredura de tensão e varredura de frequência**

Esta análise foi realizada com a solução polissacarídica nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, sensor do tipo cone-placa (C60/2Ti°) em modo CS (*Controlled Stress Rheometers*), com variação da amplitude da tensão de 0,01 Pa até 100,0 Pa.

Devido à faixa de viscoelasticidade linear ser dependente da frequência, inicialmente o teste foi realizado com a frequência fixada em 1 Hz a fim de se determinar a região viscoelástica linear das amostras, isto é, a região em que os módulos elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) permanecem lineares e paralelos, sem variação com o aumento da deformação ( $\dot{\gamma}$ ).

Após determinar a deformação dentro da região viscoelástica linear das amostras, foram realizadas as análises oscilatórias dinâmicas, por varredura de frequência, numa amplitude de  $10^{-2}$  a  $10^2$  Hz. Foram medidos os valores dos módulos elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) em função da frequência ( $f$ ). Todas as análises foram efetuadas em duplicatas na temperatura de 25 °C. Quando os valores encontrados para as duplicatas eram muito díspares, procedia-se a terceira análise ou a triplicata.

### **4.3.5 Varredura de temperatura**

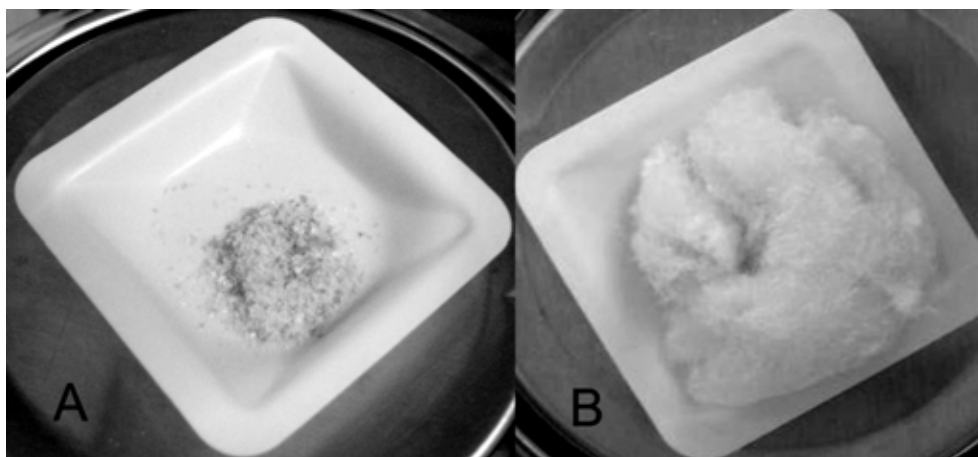
Para conhecer a influência da temperatura sobre o comportamento reológico das amostras, foram realizadas medidas no sistema oscilatório, com variações de temperatura entre 5 a 95 °C (1,5 °C/min) por 60 minutos e de 95 °C para 5 °C, também por 60 minutos, frequência de 1 Hz e tensão de 0,6 Pa. Para essa análise utilizou-se o reômetro citado no item 4.3.1, acoplado a um sistema controlador de temperatura, denominado sistema Peltier (TC81). Todas as análises foram realizadas em duplicatas na concentração de 5 g/L, para cada EPS. Quando os valores encontrados para as duplicatas eram muito díspares, procedia-se a terceira análise ou a triplicata. Para prevenir a evaporação do solvente foi aplicada uma camada de óleo mineral ao redor da placa de análise.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Quantificação dos exopolissacarídeos

No processo de obtenção dos exopolissacarídeos (EPS) a determinação dos parâmetros de fermentação (composição do meio de cultivo, o pH e a temperatura de incubação) influencia na síntese, no rendimento e na composição das moléculas. Cada cepa bacteriana difere em sua resposta ao efeito das mudanças ambientais e à fonte de carbono utilizada que tem parte convertida pela célula microbiana em biopolímero (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

Os EPS utilizados neste trabalho foram fornecidos pela Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos conforme descrito no item 4.1.1. Antes de todas as análises os exopolissacarídeos foram, individualmente, dialisados (72 horas) em tubos de 12 KDa, concentrados a baixa temperatura (38 °C) e liofilizados (Figura 8). Foram mantidos desta forma até o momento do uso.



**Figura 8:** (A) Ilustração do EPS R<sub>1</sub> seco e moído; (B) EPS R<sub>1</sub> dialisado e liofilizado.

Os exopolissacarídeos R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub> foram quantificados para açúcares totais e redutores, proteínas e ácidos urônicos. Os resultados das análises quantitativas são mostrados na tabela 3.

**Tabela 3** – Quantificações de açúcares totais e redutores, proteínas e ácido urônico dos exopolissacarídeos produzidos por diferentes linhagens de bactérias do gênero *Rhizobium* e *Mesorhizobium*.

| <b>Exopolissacarídeos/<br/>Microrganismos<br/>produtores</b> | <b>Açúcar<br/>total (%)</b> | <b>Açúcar<br/>reduzor (%)</b> | <b>Proteína (%)</b> | <b>Ácido<br/>urônico (%)</b> |
|--|-----------------------------|-------------------------------|---------------------|------------------------------|
| <b>R<sub>1</sub></b><br>( <i>Rhizobium tropici</i> )         | 94,6                        | 0,10                          | 3,0                 | 2,4                          |
| <b>R<sub>2</sub></b><br>( <i>Rhizobium tropici</i> )         | 94,1                        | 0,11                          | 4,2                 | 1,7                          |
| <b>R<sub>3</sub></b><br>( <i>Mesorhizobium</i> )             | 87,1                        | 0,12                          | 4,5                 | 8,4                          |
| <b>R<sub>4</sub></b><br>( <i>Rhizobium sp.</i> )             | 95,1                        | 0,10                          | 4,1                 | 0,8                          |

O teor de açúcares totais dos EPS ficou compreendido entre 87 % e 95 %. Os EPS R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> foram obtidos a partir do mesmo microrganismo (*Rhizobium tropici*) com variações no método de produção que pode acarretar diferenças na estrutura química fina e, provavelmente, nas propriedades físico-químicas. Os baixos valores encontrados na quantificação de açúcares redutores sinalizam que os carboidratos presentes em solução estão, principalmente, na forma de polissacarídeos e o elevado teor de ácido urônico (8,4 %) presente no polissacarídeo produzido pelo *Mesorhizobium* (R<sub>3</sub>) indica um polímero aniônico. No preparo das soluções polissacarídicas para as reações de quantificação o R<sub>3</sub> apresentou-se menos viscoso e, de acordo com a literatura, o comportamento reológico de polímeros acídicos é diferente daquele apresentado pelos polímeros neutros. A presença de ácidos glucurônico e pirúvico na goma xantana, confere ionicidade à mesma, promovendo alterações na conformação molecular e aumentando a solubilidade de suas soluções (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004).

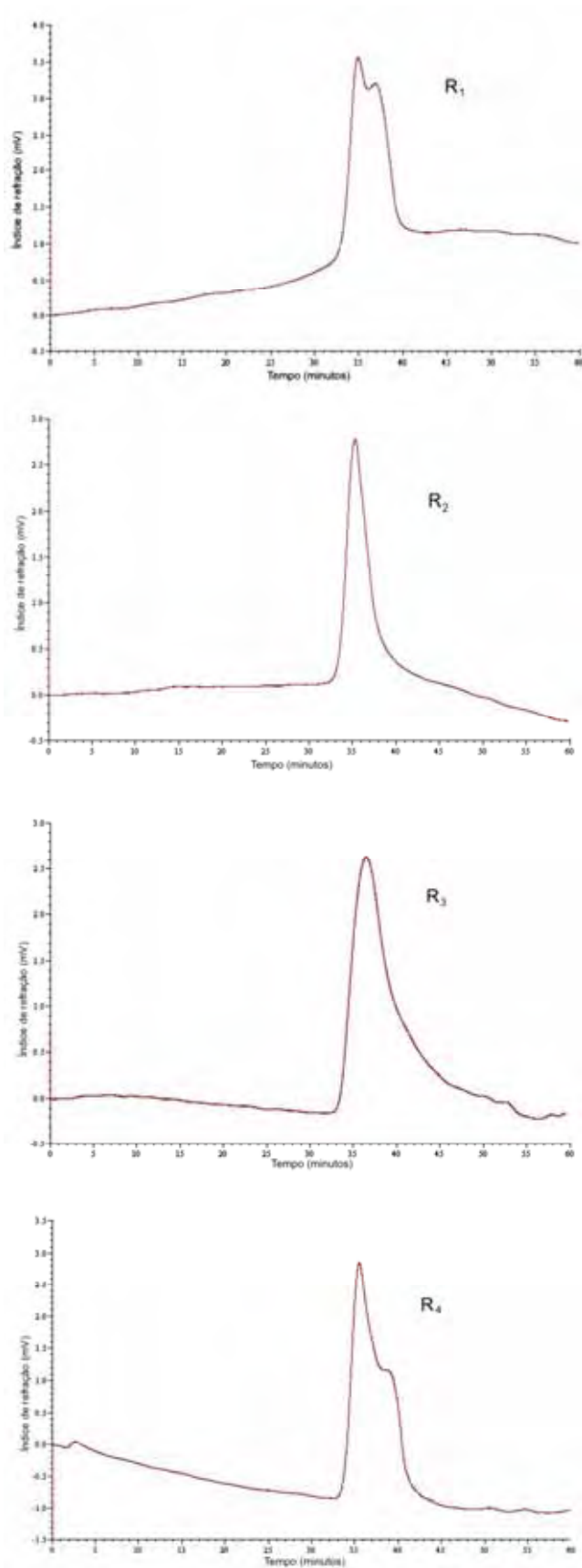
## 5.2 Análise da homogeneidade dos exopolissacarídeos por cromatografia de filtração em gel (HPSEC)

Para que os resultados das análises, inclusive reológicas, sejam atribuídos exclusivamente à solução polissacarídica, é necessário se estabelecer o grau de pureza do material estudado. Os métodos cromatográficos são os mais utilizados para esse fim e, em particular, a cromatografia de filtração em gel (BOYER, 1993). O comportamento dos polissacarídeos na filtração em gel informa sobre a pureza da macromolécula. Uma forma apropriada para determinar o grau de homogeneidade e polidispersividade é a utilização da cromatografia de filtração em gel a alta pressão denominada GPC (*gel permeation chromatography*) acoplada a detectores de índice de refração e espalhamento de luz a laser (*light scattering*). A utilização de colunas sequenciadas com géis de diferentes porosidades, pressão elevada e detectores sensíveis permitem, pela mudança da fase móvel (H<sub>2</sub>O; solução de NaCl; solução diluída de NaOH e dimetil sulfóxido), se chegar ao peso molecular absoluto, bem como, a soluções poliméricas de menor grau de polidispersividade (WYATT, 1993).

Para os polissacarídeos, podemos inferir sobre o grau de pureza da amostra (homogeneidade) pelo número de picos e sobre a polidispersividade do material, através da forma do pico. A simetria no pico de eluição é um forte indicativo de homogeneidade (PAZUR, 1994). Todos os EPS em estudo foram submetidos a esta análise (Figura 9).

Sabendo-se que os exopolissacarídeos R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> foram produzidos pelo mesmo microrganismo (*Rhizobium tropici*), nota-se que as condições de cultivo utilizadas para a produção do R<sub>2</sub> forneceram um polissacarídeo mais homogêneo e com menor polidispersividade, assim como para o EPS R<sub>3</sub>. A polidispersividade deve-se provavelmente ao processo de síntese dos polissacarídeos, cujas unidades monossacarídicas são aleatoriamente dispostas na molécula, diferentemente das proteínas que seguem um molde molecular. Essa situação de síntese, sem um molde prévio, gera moléculas semelhantes com diferentes massas moleculares (CORRADI DA SILVA et al., 2006).

Os exopolissacarídeos R<sub>1</sub> e R<sub>4</sub> apresentaram um perfil heterogêneo, com um pequeno ombro junto ao pico principal, o que pode sugerir à existência de mais de um polissacarídeo com massas moleculares distintas.



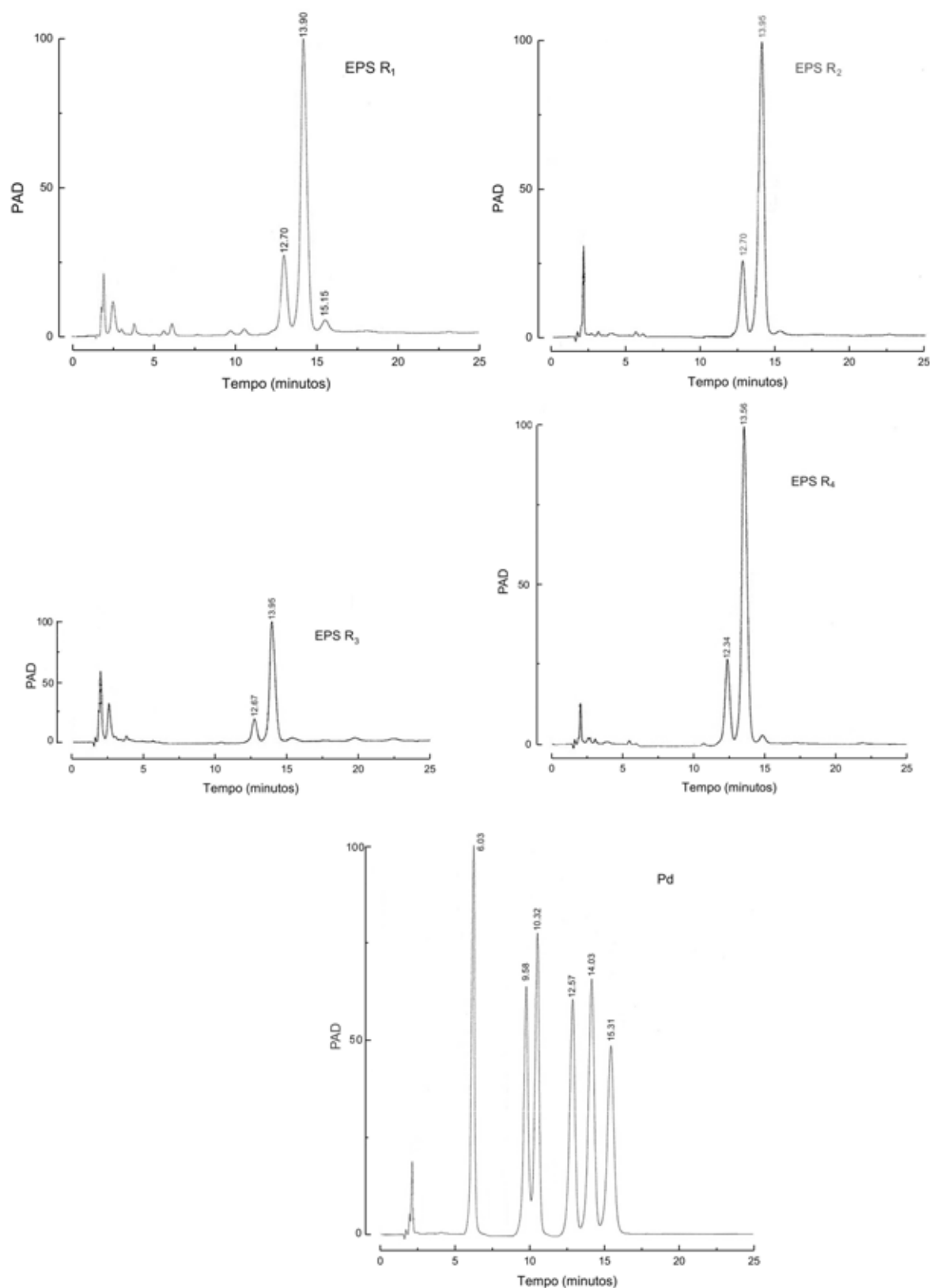
**Figura 9:** Perfil de eluição para os EPS R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub> por HPSEC equipado com um detector de índice de refração diferencial. Colunas de gel permeação dispostas em série, com limites de exclusão de  $1 \cdot 10^6$ ,  $4 \cdot 10^5$ ,  $8 \cdot 10^4$  e  $5 \cdot 10^3$ . Total de EPS aplicado: 200  $\mu$ g; fluxo: 0,6 mL/min. Eluente: NaNO<sub>3</sub> 0,1M contendo azida sódica 0,03%, pressão de 1422 Psi a 37 °C.

### 5.3 Hidrólise ácida total e análise por HPAEC/PAD dos exopolissacarídeos

A estrutura química primária de um EPS é definida por sua composição monossacarídica, configuração e posição da ligação glicosídica, entre outras características (PAZUR, 1994). A determinação da estrutura primária consiste na despolimerização total ou parcial, por hidrólise ácida, com diferentes tipos de ácidos, temperaturas e tempos. Estes tratamentos produzem monossacarídeos ou oligossacarídeos que são posteriormente analisados por cromatografia líquida de íons em alta pressão (*HPAEC – high performance anionic exchange chromatography*) acoplada a um detector de óxido redução (*PAD – pulsed amperometric detector*) (BONGIOVANI, 2008). O HPAEC/PAD é uma poderosa ferramenta para a análise e separação dos carboidratos, não derivatizados, em níveis de nanomoles (nmol). As colunas empregadas devem ser específicas para a separação e análise de mono-, oligo- e polissacarídeos de baixa massa molecular. Portanto, a primeira medida a ser tomada a respeito da análise estrutural de um polissacarídeo é conhecer suas unidades monossacarídicas (NELSON; COX, 2000; CORRADI DA SILVA et al., 2006).

As condições de hidrólise ácida utilizadas neste trabalho foram capazes de liberar apenas os monossacarídeos neutros, embora os resultados positivos encontrados na quantificação de ácidos urônicos (Tabela 3) mostrem que monossacarídeos ácidos fazem parte da estrutura química desses polímeros. A análise da composição monossacarídica dos EPS, por cromatografia líquida de íons (Figura 10), mostrou a presença de glucose como componente majoritário em todos os EPS estudados, além de galactose e traços de manose. De acordo com a literatura microrganismos de linhagens diferentes ou com diferenças apenas nas condições de cultivos, produzem polissacarídeos semelhantes nos quais a cadeia principal, normalmente, é a mesma, com variações no grau de ramificação. Esses resultados também foram, parcialmente, demonstrados por Castellane e Lemos (2007).

Segundo Hisamatsu e colaboradores (1997) o ácido glucurônico presente nos polissacarídeos de *Rhizobium* necessita de condições severas de hidrólise para sua liberação do polímero. Portanto neste trabalho os ácidos urônicos foram quantificados por métodos colorimétricos, como mostrado no Item 5.1, Tabela 3.



**Figura 10** - Análise dos monossacarídeos provenientes da hidrólise ácida dos EPS R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub> por HPAEC/PAD. Padrões de açúcares neutros (**Pd**), com tempos de retenção em minutos: fucose (6.03); arabinose (9.58) ramnose (10.32); galactose (12.57); glucose (14.03); manose (15.31). Condições da corrida: isocrática (NaOH 14 mM, 25 minutos). Coluna: CarboPac PA1. Condições de hidrólise: TFA 5 M, 12 horas, 100 °C. Quantidade de material hidrolisado: 50 µg.



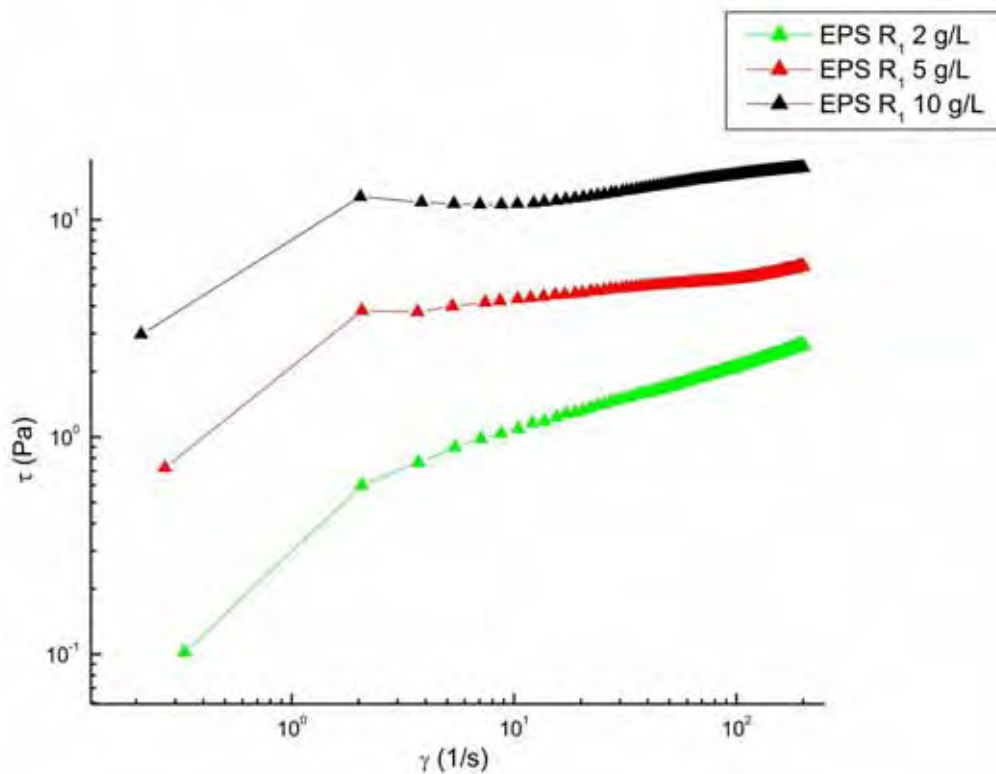
## 5.4 Comportamento reológico das soluções formadas pelos exopolissacarídeos produzidos pelo *Rhizobium*

As medidas reológicas possibilitam a caracterização de polímeros em soluções e géis, fornecendo dados importantes para o desenvolvimento dos processos tecnológicos, para o controle de qualidade das matérias-primas e produtos padronizados, e para a determinação de dados na pesquisa e desenvolvimento de um material específico (TOSIN, 2008). Após a caracterização química prévia das moléculas as soluções de cada polissacarídeo foram submetidas às análises reológicas, que tem como um dos primeiros experimentos as Curvas de Fluxo.

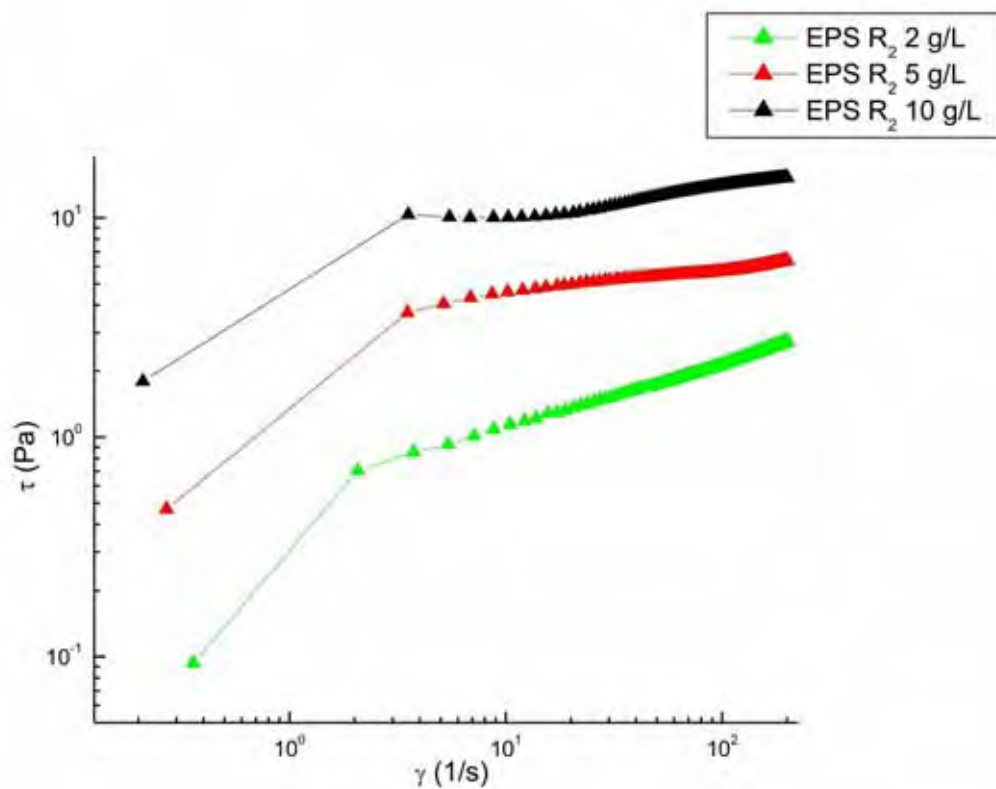
### 5.4.1 Curvas de fluxo

A curva de fluxo, definida a partir das medidas de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) permite verificar o comportamento de fluxo das soluções polissacarídicas. A partir da construção do reograma é possível estabelecer se um líquido apresenta um comportamento de fluxo Newtoniano ou não Newtoniano, em determinadas condições de tensão ou taxa de deformação (BONGIOVANI et al., 2009).

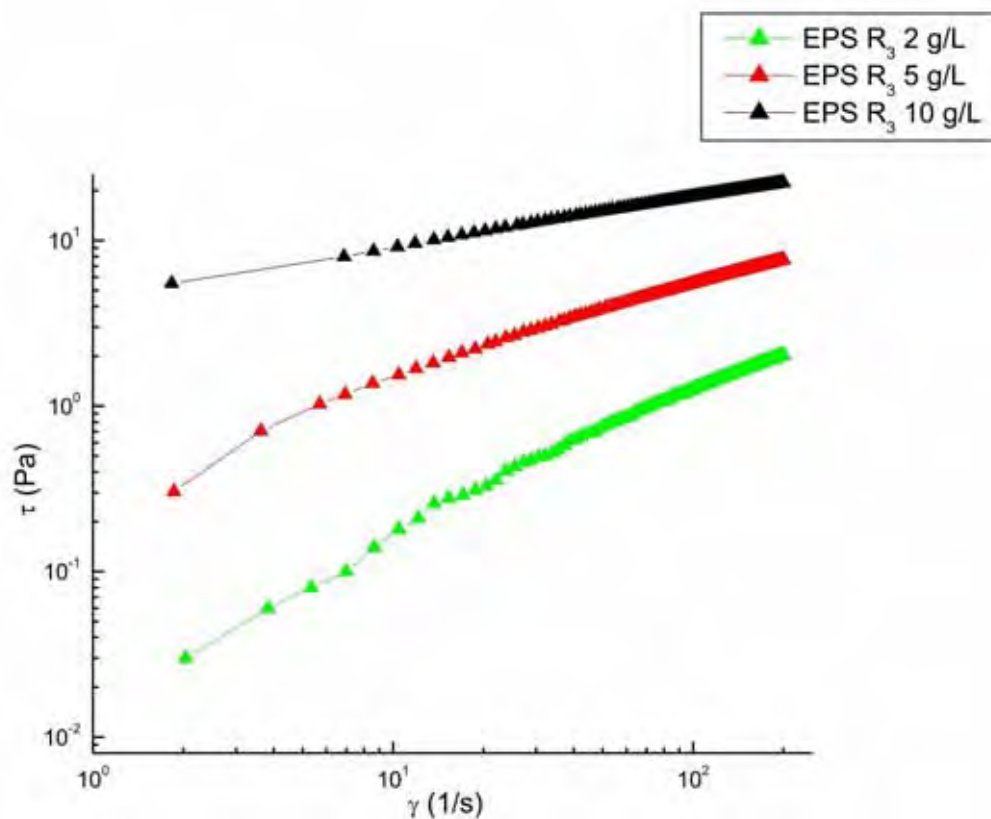
Os resultados apresentados nas Figuras 11, 12, 13 e 14 evidenciam um comportamento de fluxo de líquidos não-Newtonianos para os quatro exopolissacarídeos estudados. O aumento da tensão de cisalhamento a partir do aumento da taxa de deformação, caracteriza-os como fluidos pseudoplásticos. Soluções formadas pelo EPS 450, produzido pelo *Bacillus* sp, também apresentam comportamento pseudoplástico, assim como outras soluções de polissacarídeos microbianos (KUMAR et al., 2004; ROTTAVA, 2005).



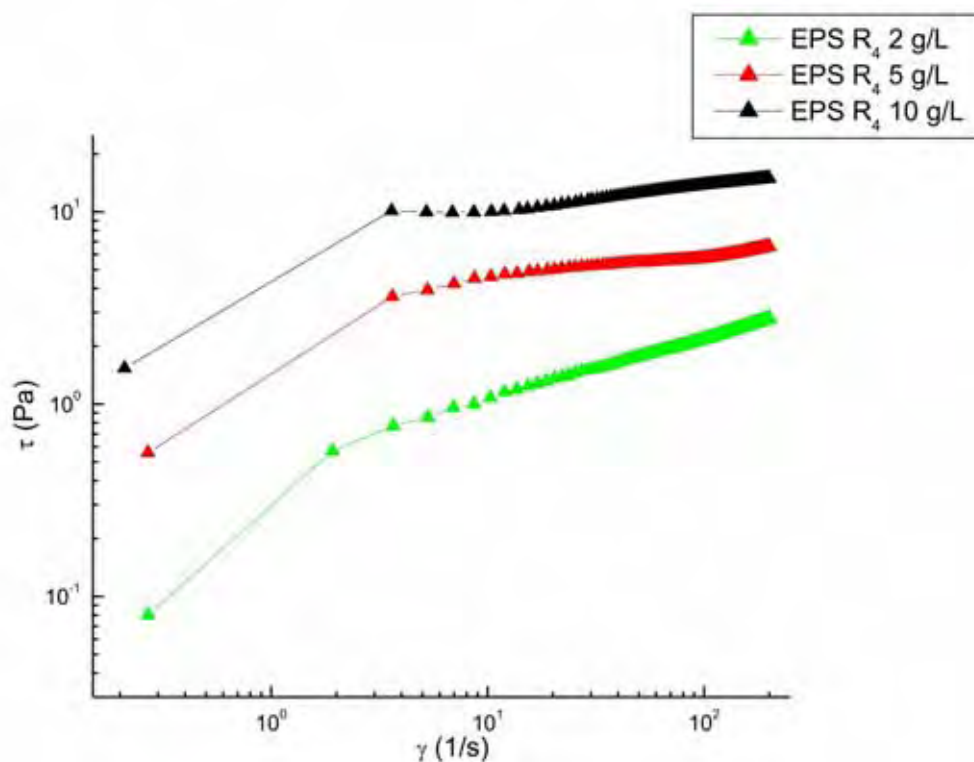
**Figura 11** – Reograma (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>1</sub> nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C.



**Figura 12** – Reograma (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>2</sub> nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C.



**Figura 13** – Reograma (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS  $R_3$  nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C.



**Figura 14** – Reograma (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS  $R_4$  nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C.

### 5.4.2 Modelos reológicos

A descrição do comportamento reológico dos materiais pode ser 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 utilizados para os sistemas de alimentos são Ostwald-de-Waele (Lei da Potência), Casson, Herschel-Bulkley e Mizrahi-Berki. Os dois primeiros utilizam equações matemáticas com dois parâmetros e os demais com três parâmetros (HAMINIUK et al., 2006).

Há diferentes fatores que influenciam na escolha do modelo reológico ideal para descrever o comportamento de escoamento de um fluido em particular. Muitos modelos, além dos acima apresentados, são utilizados para representar o comportamento de fluidos não-Newtonianos (BRANCO; GASPARETTO, 2005; BRETAS; D'ÁVILA, 2005; FERREIRA; GUIMARÃES; MAIA, 2008). Os modelos matemáticos também podem relacionar as propriedades reológicas de um fluido com grandezas práticas como concentração e temperatura, principalmente. Esse conhecimento é indispensável no controle de qualidade, no controle intermediário em linhas de produção, no projeto e dimensionamento dos processos (TONELI; MURR; PARK, 2005).

Para as soluções formadas pelos exopolissacarídeos produzidos pelas diferentes linhagens de *Rhizobium* e *Mesorhizobium*, nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L o modelo de Ostwald-de-Waele proporcionou os melhores ajustes, com maiores valores do coeficiente de regressão ou de determinação ( $R^2$ ) e menores valores para  $\chi^2$  (Tabela 4), o qual expressa a diferença entre os valores previstos pelo modelo e os valores obtidos experimentalmente.

O desvio do índice de comportamento de fluxo ( $n$ ) da unidade indica o grau de desvio do comportamento newtoniano. Valores de  $n < 1$  definem comportamento pseudoplástico. As soluções polissacarídicas estudadas neste trabalho apresentaram  $n < 1$ , caracterizando-as com comportamento pseudoplástico em todas as concentrações analisadas, conforme mostrado na tabela 4.

É possível, ainda, observar a partir do índice de consistência ( $K$ ) (Tabela 4) um aumento progressivo da viscosidade com o aumento da concentração das soluções de todos EPS. Nota-se uma tendência da solução do exopolissacarídeo  $R_1$  ser mais viscosa do que as soluções de  $R_2$ ,  $R_3$  e  $R_4$ , principalmente em concentrações maiores (10 g/L).  $R_3$  apresenta menores valores de  $K$ , em qualquer uma das concentrações analisadas, em comparação aos demais EPS.

**Tabela 4** - Parâmetros reológicos obtidos pela análise das soluções exopolissacarídicas pela aplicação do modelo da Lei da Potência.

| Amostra            | Concentração (g/L) | Índice de Consistência (K) | Índice de Comportamento de Fluxo (n) | Coefficiente de Regressão (R <sup>2</sup> ) | $\chi^2$ |
|--------------------|--------------------|----------------------------|--------------------------------------|---|----------|
| EPS R <sub>1</sub> | 2                  | 0.51                       | 0.30                                 | 0,99  | 0,05     |
|                    | 5                  | 3.14                       | 0.11                                 | 0,98  | 0,08     |
|                    | 5 em NaCl*         | 3.36                       | 0.19                                 | 0,99  | 0,04     |
|                    | 10                 | 9.30                       | 0.12                                 | 0,99  | 0,05     |
| EPS R <sub>2</sub> | 2                  | 0.52                       | 0.30                                 | 0,99  | 0,09     |
|                    | 5                  | 3.70                       | 0.09                                 | 0,99  | 0,06     |
|                    | 5 em NaCl*         | 3.80                       | 0.17                                 | 0,99  | 0,08     |
|                    | 10                 | 7.33                       | 0.14                                 | 0,99  | 0.06     |
| EPS R <sub>3</sub> | 2                  | 0.04                       | 0.73                                 | 0,99  | 0,06     |
|                    | 5                  | 0.52                       | 0.50                                 | 0,99  | 0,06     |
|                    | 5 em NaCl*         | 0.32                       | 0.55                                 | 0,99  | 0.06     |
|                    | 10                 | 4.90                       | 0.28                                 | 0,99  | 0,07     |
| EPS R <sub>4</sub> | 2                  | 0.50                       | 0.32                                 | 0,99  | 0,06     |
|                    | 5                  | 3.24                       | 0.10                                 | 0,98  | 0,09     |
|                    | 5 em NaCl*         | 4,31                       | 0.21                                 | 0,99  | 0,02     |
|                    | 10                 | 7.13                       | 0.13                                 | 0,99  | 0,04     |

\* Solução de NaCl 0,2 M

Também na tabela 4 é possível observar que as soluções dos exopolissacarídeos R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>4</sub>, na concentração de 5 g/L, em presença de NaCl 0,2 M, apresentam um pequeno aumento no valor do índice de consistência (K) quando comparados com as mesmas soluções, nas mesmas concentrações, na ausência do sal. Isso indica que a adição do eletrólito à solução aquosa favorece a viscosidade desses polímeros. Um valor menor de K para o exopolissacarídeo produzido pelo *Mesorhizobium* (R<sub>3</sub>), em presença de sal, na concentração de 5 g/L, pode ser atribuído à interação entre resíduos carregados de ácido urônico (8,4%) e dos íons provenientes da dissociação do sal. (CARRINGTON et al., 1996; SHIMADA et al., 1997).

A dissolução do hidrogel quitosana-xantana em meio eletrolítico promove o aumento da viscosidade, enquanto para a goma xantana sozinha, em baixas concentrações, a adição de um eletrólito, por exemplo, NaCl, reduz a viscosidade;

entretanto, em concentrações elevadas a presença do eletrólito tem efeito oposto, embora um gel fraco de xantana seja formado (MARTÍNEZ-RUVALCABA; CHORNET; RODRIGUE, 2007).

### 5.4.3 Curvas de viscosidade

A viscosidade, que descreve a propriedade física de um líquido em resistir ao fluxo induzido pelo cisalhamento, pode depender de alguns parâmetros tais como temperatura, a natureza física da substância, pressão, taxa de deformação, entre outros. Os diferentes tipos de curvas de fluxo têm suas correspondentes curvas de viscosidade, que no caso dos líquidos Newtonianos, são representados por uma reta paralela à abscissa, mostrando que independente da taxa de cisalhamento, a viscosidade não se altera. Fluidos que sofrem diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento são chamados de pseudoplásticos (SCHRAMM, 2006).

As curvas de viscosidade para os exopolissacarídeos R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub> estão apresentadas nas figuras 15 a 18. As medidas da viscosidade ( $\eta$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) efetuadas nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L foram reunidas em um único gráfico, para cada um dos EPS estudados.

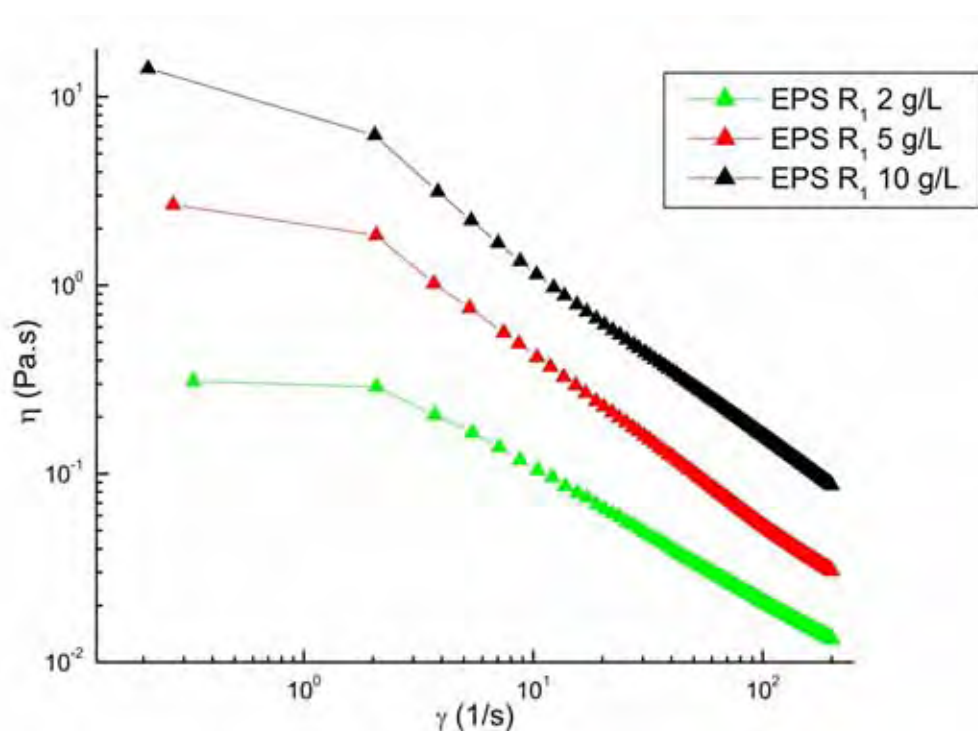
Pelos resultados obtidos é possível observar que a viscosidade aumenta com o aumento da concentração dos polímeros, esse comportamento foi notado visualmente em todos os EPS, mas apenas mostrado para o R<sub>2</sub>, na figura 7. Também, de acordo com as curvas de viscosidade, os EPS estudados apresentaram comportamento pseudoplástico, ou seja, as viscosidades das soluções polissacarídicas, em qualquer uma das concentrações analisadas, decresceram de maneira substancial com o aumento da taxa de deformação.

Schramm (2006) avalia que soluções poliméricas, quando em repouso, mantêm suas moléculas entrelaçadas e enoveladas numa ordem interna irregular que se caracteriza por uma considerável resistência interna ao fluxo, manifestando-se através da viscosidade elevada. Com o aumento das taxas de deformação, ocorre uma ordenação ou alinhamento das partículas na direção do fluxo, provavelmente pelas interações desfeitas. Ainda, segundo o mesmo autor, o cisalhamento pode induzir a quebra dos agregados, auxiliando o material a escoar mais rapidamente.

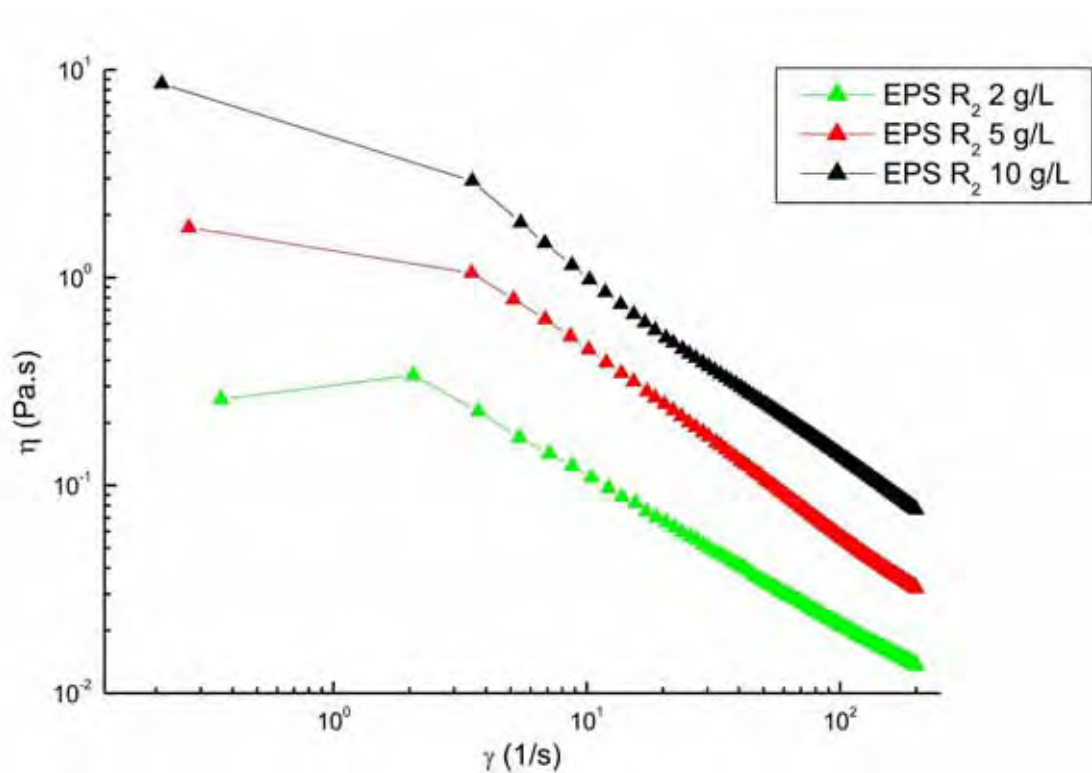
De acordo com Diaz e colaboradores (2004) a viscosidade da solução aquosa de um polissacarídeo está diretamente relacionada com a rigidez de sua molécula

que, por sua vez, depende da sua estrutura, principalmente primária e secundária, a qual está diretamente relacionada à bactéria utilizada e às condições operacionais do processo. A viscosidade pode, portanto, ser afetada pela presença das ramificações, as quais reduzem o grau de enrolamento de uma cadeia linear, sendo a viscosidade de um polímero ramificado menor que a de um linear de mesma composição química e peso molecular. A queda da viscosidade com o aumento da ramificação sempre ocorre quando os ramos não excedem a um determinado comprimento, estando relacionado com a alteração no movimento cooperativo dos segmentos da cadeia. Entretanto, alguns pesquisadores relatam que o aumento das ramificações aumenta a viscosidade e que isto pode ocorrer quando as ramificações são longas e enrolam-se entre as cadeias, com comprimento maior que o crítico da cadeia (NAVARRO, 1997, RAO, 1999)

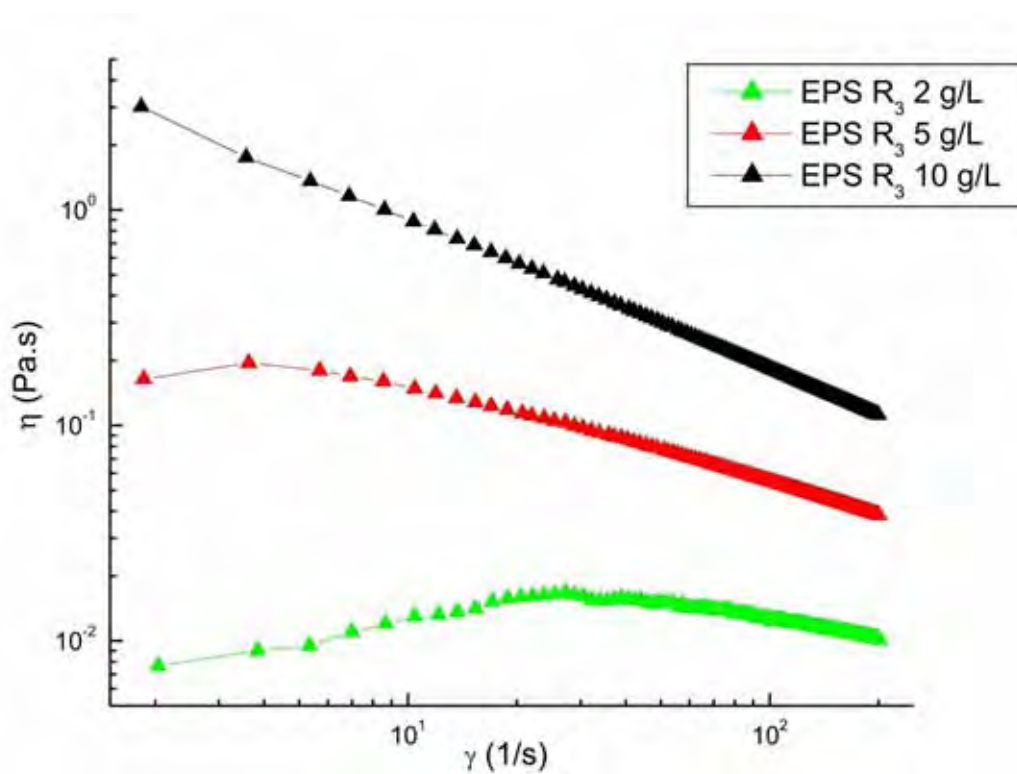
A diminuição da viscosidade com aumento da taxa de deformação foi demonstrada para o polissacarídeo rhamsana, com muitas ramificações, produzido por *Alcaligenes* sp. Gelana, um polissacarídeo não ramificado, produzido por *Pseudomonas elodea*, mostrou menor comportamento pseudoplástico (KUMAR et al., 2004). Provavelmente, as ramificações do rhamsana são longas o suficiente para explicar a elevada viscosidade de suas soluções.



**Figura 15** – Viscosidade absoluta ( $\eta$ ) em função da taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>1</sub> nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C.

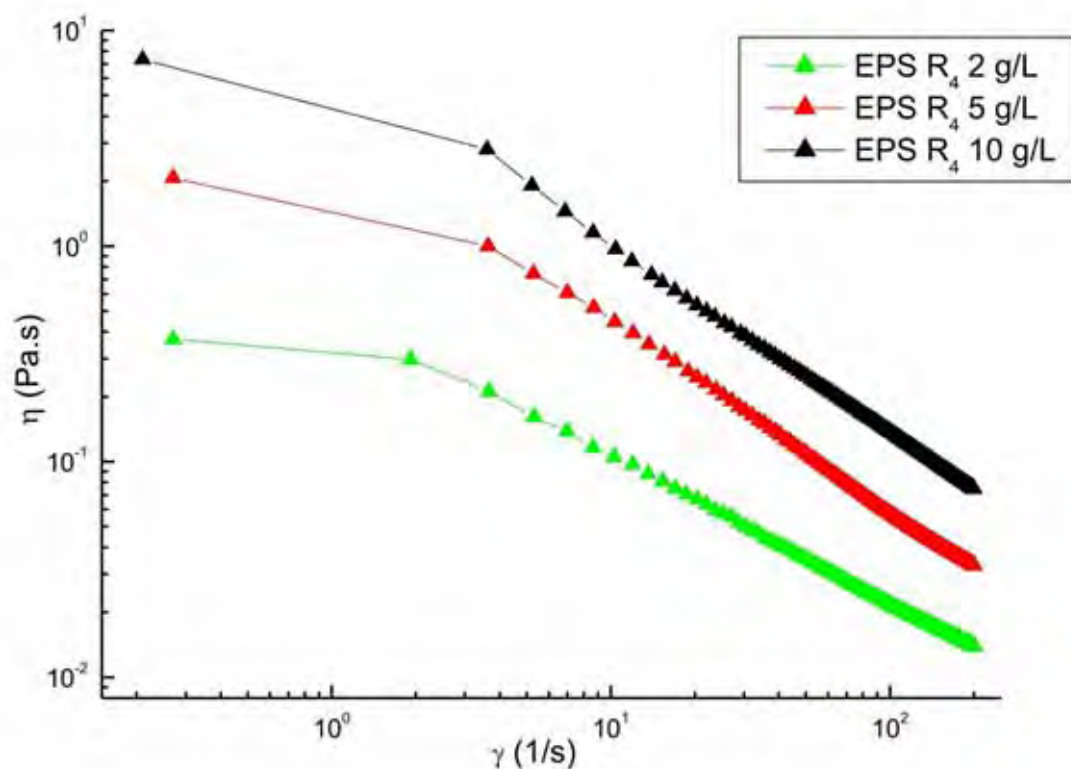


**Figura 16** – Viscosidade absoluta ( $\eta$ ) em função da taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>2</sub> nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C.



**Figura 17** – Viscosidade absoluta ( $\eta$ ) em função da taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>3</sub> nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C.





**Figura 18** – Viscosidade absoluta ( $\eta$ ) em função da taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>4</sub> nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, à temperatura de 25 °C.

O sal na formulação dos alimentos industrializados tem função de realçador de sabor e de conservação (BOBIO, 1992). Além disso, a presença de sais inorgânicos é um fator modificador da viscosidade nas soluções polissacarídicas, podendo incrementar ou diminuir a viscosidade da solução (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004).

Por esta razão foi efetuado um estudo comparativo da viscosidade das soluções, aquosa e aquosa contendo 0,2 M de NaCl, de cada um dos biopolímeros, nas concentrações de 5 g/L. Para esta análise foram selecionadas as taxas de deformação de 10, 50 e 100  $s^{-1}$ , que correspondem, respectivamente, a valores das regiões de baixa, média e alta taxa de cisalhamento ou deformação.

Os resultados da análise são mostrados na tabela 5, juntamente com o percentual de ácidos urônicos.

**Tabela 5** – Viscosidade absoluta ( $\eta$ ) das soluções aquosa e salina dos EPS R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>, 5 g/L, nas taxas de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) 10; 50 e 100 (s<sup>-1</sup>), à temperatura de 25 °C.

|                | <u>Ácido urônico (%)</u> |                           | Viscosidade ( $\eta$ ) (Pa.s) |                          |                           |
|----------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|
|                |                          |                           | <u>10 s<sup>-1</sup></u>      | <u>50 s<sup>-1</sup></u> | <u>100 s<sup>-1</sup></u> |
| R <sub>1</sub> | 2,4                      | 5 g/L em H <sub>2</sub> O | 0,41                          | 0,10                     | 0,05                      |
|                |                          | 5 g/L em NaCl 0,2 M       | 0,51                          | 0,14                     | 0,08                      |
| R <sub>2</sub> | 1,7                      | 5 g/L em H <sub>2</sub> O | 0,45                          | 0,10                     | 0,05                      |
|                |                          | 5 g/L em NaCl 0,2 M       | 0,54                          | 0,14                     | 0,08                      |
| R <sub>3</sub> | 8,4                      | 5 g/L em H <sub>2</sub> O | 0,14                          | 0,07                     | 0,05                      |
|                |                          | 5 g/L em NaCl 0,2 M       | 0,10                          | 0,05                     | 0,04                      |
| R <sub>4</sub> | 0,8                      | 5 g/L em H <sub>2</sub> O | 0,44                          | 0,10                     | 0,05                      |
|                |                          | 5 g/L em NaCl 0,2 M       | 0,44                          | 0,12                     | 0,07                      |

Maiores valores de viscosidade foram encontrados em baixas taxas de deformação (10 s<sup>-1</sup>), com R<sub>3</sub> apresentando os menores valores. O decréscimo da viscosidade aparente com o aumento da taxa de deformação pode ser atribuído a mudança estrutural dos polímeros devido às forças hidrodinâmicas geradas e ao maior alinhamento das moléculas na direção da tensão aplicada (FERREIRA; GUIMARÃES; MAIA, 2008). Em taxas de deformação mais elevadas (100 s<sup>-1</sup>) os valores de viscosidade para os quatro polímeros são praticamente semelhantes, provavelmente devido à ação de deformação sobre a estrutura das moléculas.

É também possível observar, a partir da Tabela 5, que os EPS R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> solubilizados em solução aquosa de NaCl (0,2 M) apresentaram maior viscosidade quando comparados com os respectivos polímeros dissolvidos apenas em água. Resultados semelhantes foram encontrados para goma xantana quando uma alta concentração de sais foi adicionada (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004).

A goma xantana se comporta como um gel em concentrações acima de 1 %. Como é um polieletrólito, espera-se que suas propriedades reológicas sofram

alterações com a força iônica e concentração do polímero (MARTÍNEZ-RUVALCABA; CHORNET; RODRIGUE, 2007). Conforme se aumenta a concentração da solução de goma xantana e a força iônica do sistema, eleva-se a ordenação intramolecular através de ligações de hidrogênio (CARRINGTON et al., 1996) e conseqüentemente, a viscosidade.

O EPS R<sub>3</sub> manteve-se como o menos viscoso entre os quatro polímeros estudados, tanto em meio aquoso quanto em solução aquosa contendo NaCl, provavelmente devido ao maior percentual de ácidos urônicos (8,4%) em sua estrutura, seguido dos EPS R<sub>1</sub> (2,4 %), EPS R<sub>2</sub> (1,7 %) e EPS R<sub>4</sub> (0,8 %) (Tabela 3). Carrington e colaboradores (1996) afirmam que a variação no grau dos substituintes de um polissacarídeo altera suas propriedades reológicas em solução.

Freitas e colaboradores (2009) estudaram o comportamento reológico de um exopolissacarídeo ácido produzido por *Pseudomonas oleovorans* NRRLB-14682, em solução aquosa, e constataram que possui propriedades viscoelásticas similares à goma guar, mas com grande afinidade aos sais, como resultado de sua característica de polieletrólito.

#### 5.4.4 Tixotropia

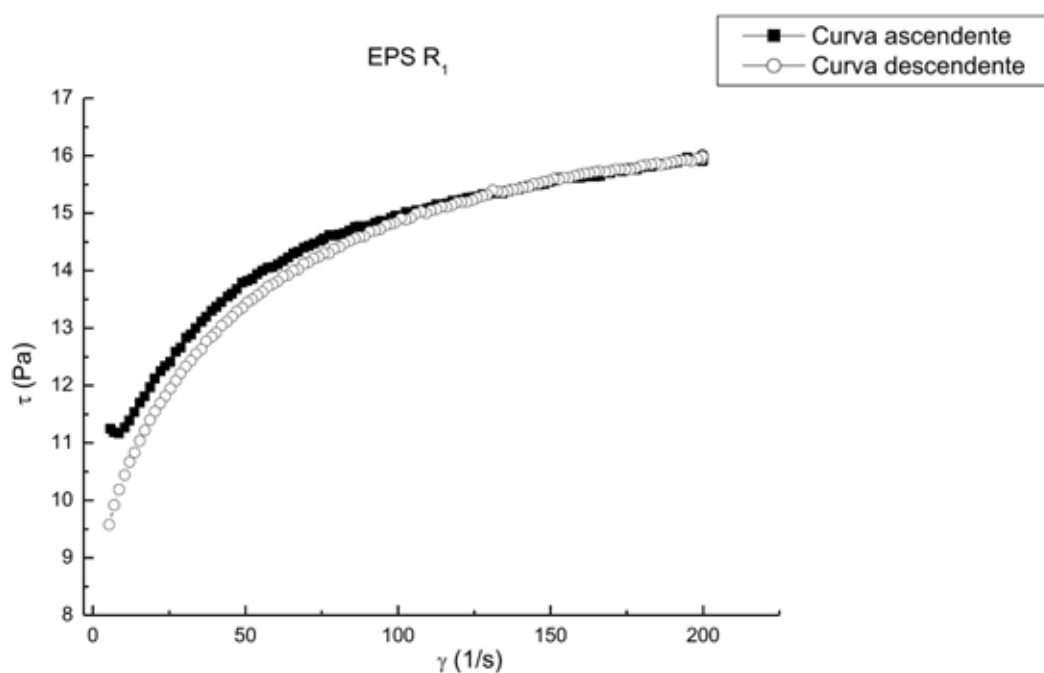
A tixotropia é a capacidade de um gel se liquefazer a medida que uma determinada taxa de deformação é aplicada (COSTA, 2006). A diminuição da viscosidade aparente com o tempo é devido à quebra da estrutura organizada no fluido. Se deixarmos um sistema tixotrópico em repouso por algum tempo, a viscosidade aparente aumentará devido à formação de uma estrutura mais organizada das partículas. Este fenômeno é importante no preparo de alimentos, uma vez que a agitação rompe o gel, e em repouso, o gel se refaz (VRIESMANN, 2008).

O produto tixotrópico tende a ter maior vida de prateleira (“*shelf-life*”) durante o armazenamento, mantendo a viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação (CORRÊA et al., 2005).

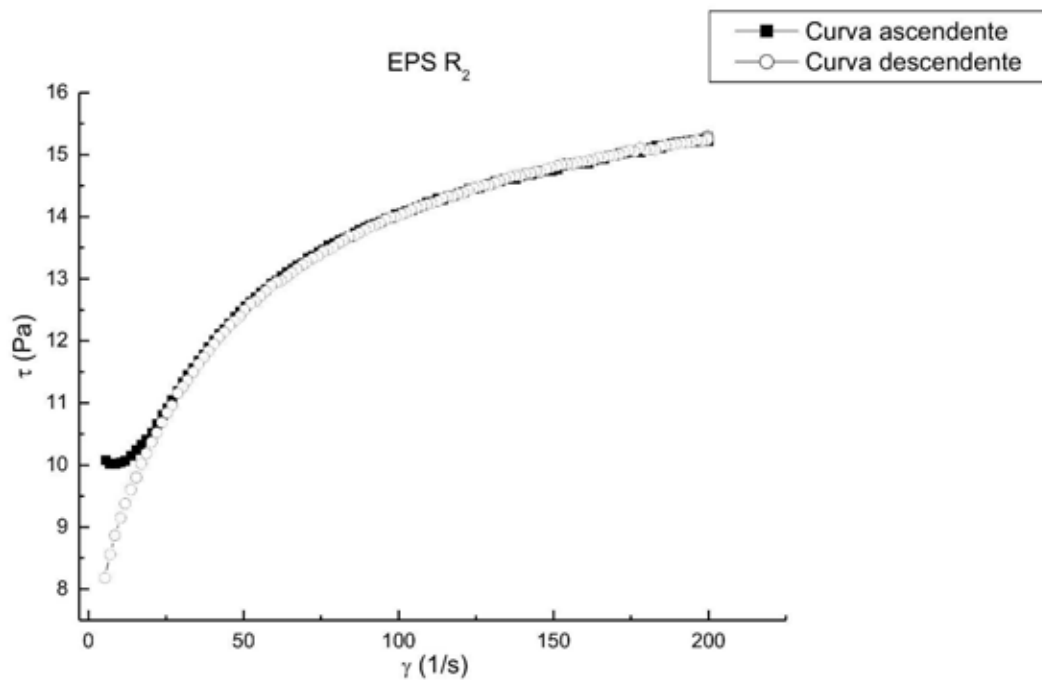
Testes reológicos em que a amostra é submetida ao aumento da taxa de deformação seguido pela diminuição da mesma, servem para observar a tixotropia do material. A ocorrência é verificada quando a curva de aumento da taxa não coincide com a curva de decréscimo no gráfico de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ), formando uma curva denominada de histerese (ARAÚJO; NASCIMENTO, 2007; SAMPAIO; NASCIMENTO, 2007; BONGIOVANI et al., 2009).

As curvas de histerese ( $\tau \times \dot{\gamma}$ ) dos quatro polissacarídeos de *Rhizobium* estudados na concentração de 10 g/L, estão representadas nas Figuras 19 a 22. Os resultados mostram que o EPS R<sub>1</sub> apresentou comportamento tixotrópico quando submetido a baixas taxas de deformação na concentração estudada.

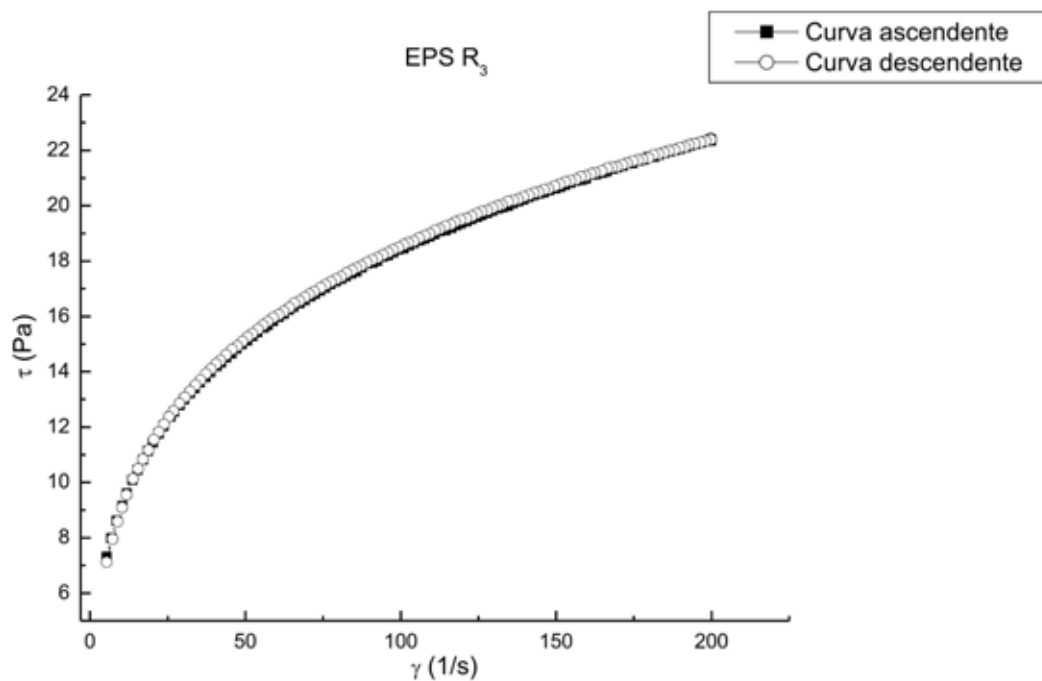
Acredita-se que para os polímeros de *Rhizobium* e *Mesorhizobium* avaliados, sejam necessárias concentrações maiores de material para que os EPS apresentem tixotropia, pois nas concentrações de 10 g/L todos apresentaram uma leve tendência ao comportamento tixotrópico (Figuras 19 a 22), exceto o EPS R<sub>3</sub> (Figura 21). Beyer e colaboradores (1987) encontraram efeito de histerese em soluções a 10 g/L de EPS de *Rhizobium* CB744, o que poderia indicar tixotropia.



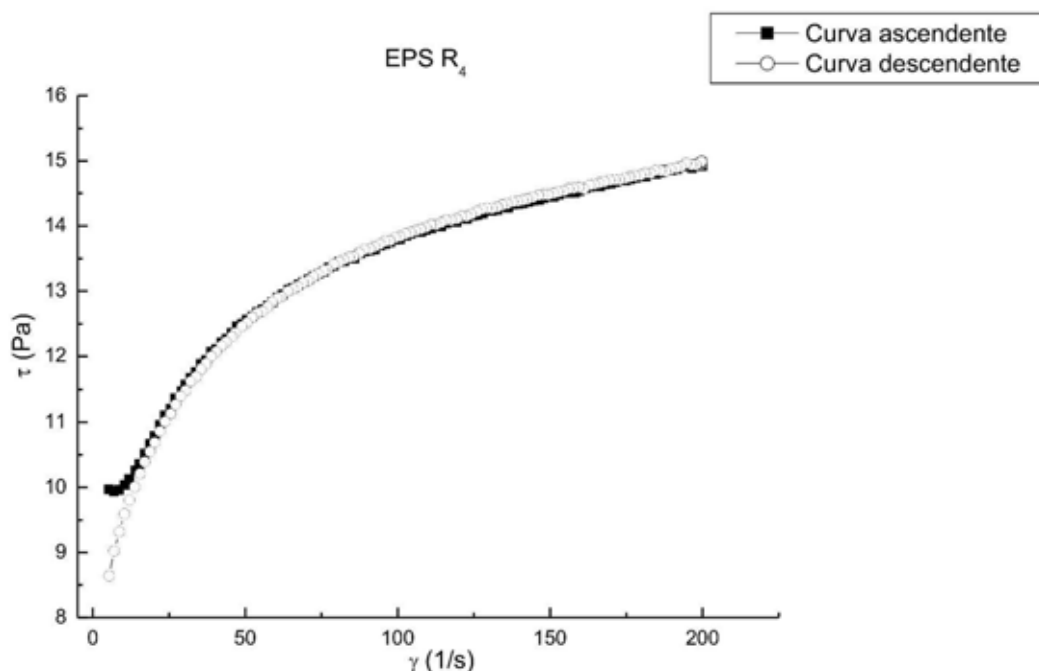
**Figura 19** – Curva de histerese (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>1</sub> na concentração de 10 g/L, à temperatura de 25 °C.



**Figura 20** – Curva de histerese (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>2</sub> na concentração de 10 g/L, à temperatura de 25 °C.



**Figura 21** – Curva de histerese (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>3</sub> na concentração de 10 g/L, à temperatura de 25 °C.



**Figura 22** – Curva de histerese (tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ )) das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>4</sub> na concentração de 10 g/L, à temperatura de 25 °C.

#### 5.4.5 Análise em sistema dinâmico

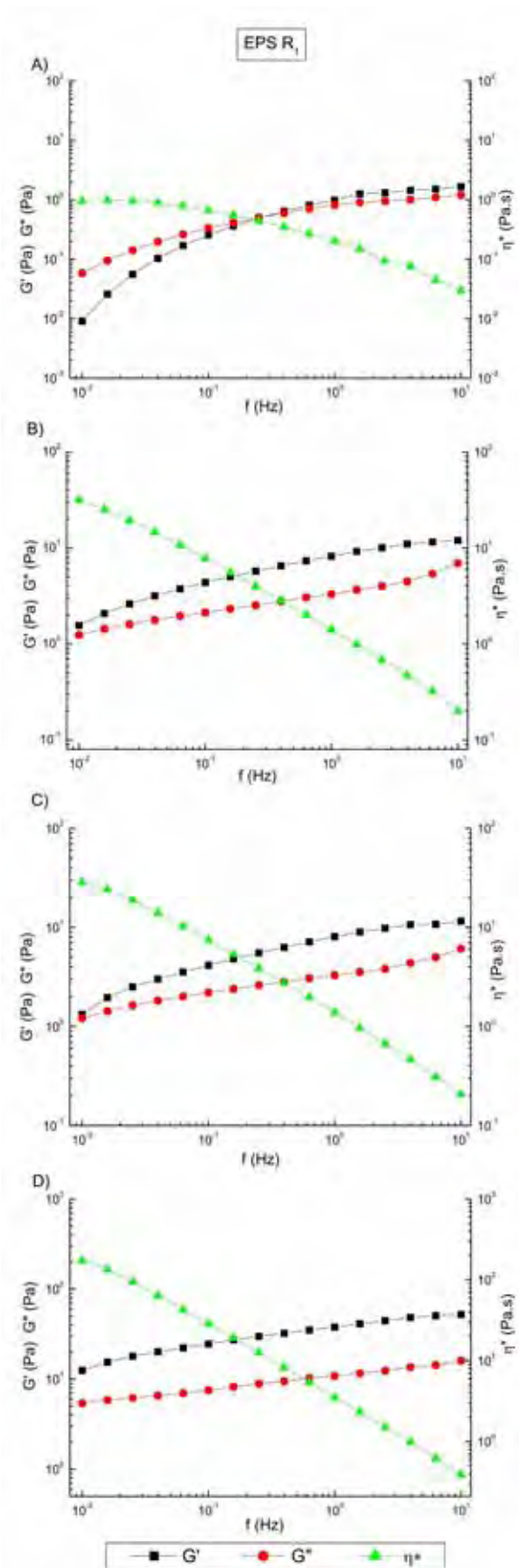
As propriedades viscoelásticas de polissacarídeos podem ser determinadas através de medidas em sistema dinâmico que é um dos mais utilizados no estudo do comportamento viscoelástico em componentes de alimentos (LAMBO-FODJE et al., 2007).

Os polissacarídeos podem apresentar características de viscoelasticidade, ou seja, exibem simultaneamente características de sólido e líquido. É possível determinar a predominância do caráter sólido ou líquido de uma amostra através de medidas dinâmicas representados pelos módulos  $G'$  e  $G''$ , os quais referem-se ao caráter viscoso e elástico do material, respectivamente (SCHRAMM, 2006; BUSATO et al., 2009).

Qualquer teste dinâmico para amostras desconhecidas deve começar com uma varredura de tensão na qual poderá ser determinada a amplitude que mantém a região de viscoelasticidade linear para a amostra. Nesta condição a estrutura original da amostra não sofre perturbação significativa do sistema e assim pode-se proceder a outros testes

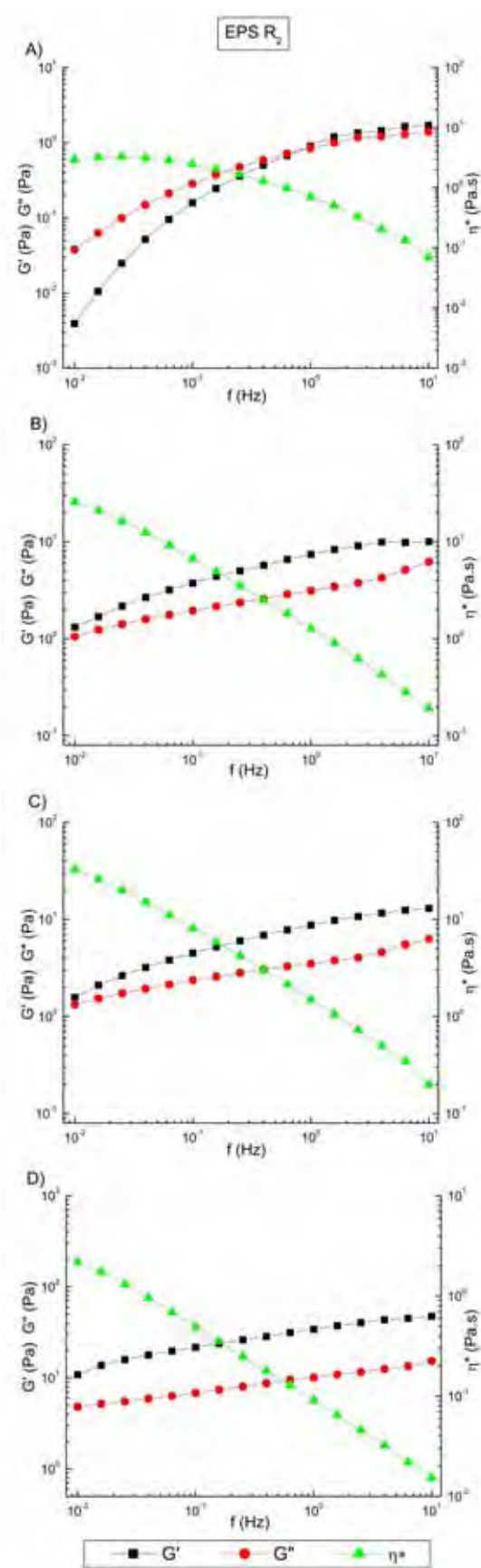
reológicos, para verificar o comportamento do material (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002).

Os valores de tensão de cisalhamento para os testes de varreduras de frequência nas concentrações de 2 g/L e 10 g/L para os quatro EPS estudados foram de 0,2 Pa e 1,5 Pa, respectivamente. Já na concentração de 5 g/L o valor de tensão para os EPS R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>4</sub> foi de 0,6 Pa e para o EPS R<sub>3</sub> foi de 0,3 Pa. Nestas condições, os polímeros apresentaram comportamento viscoelástico linear, ou seja, a tensão ou deformação aplicada não alterou a estrutura física dos EPS. Após determinar a deformação dentro da região viscoelástica linear das amostras, foram realizadas as análises dinâmicas por varredura de frequência para os EPS de *Rhizobium* e *Mesorhizobium* e os resultados obtidos estão representados nas figuras 23 a 26.

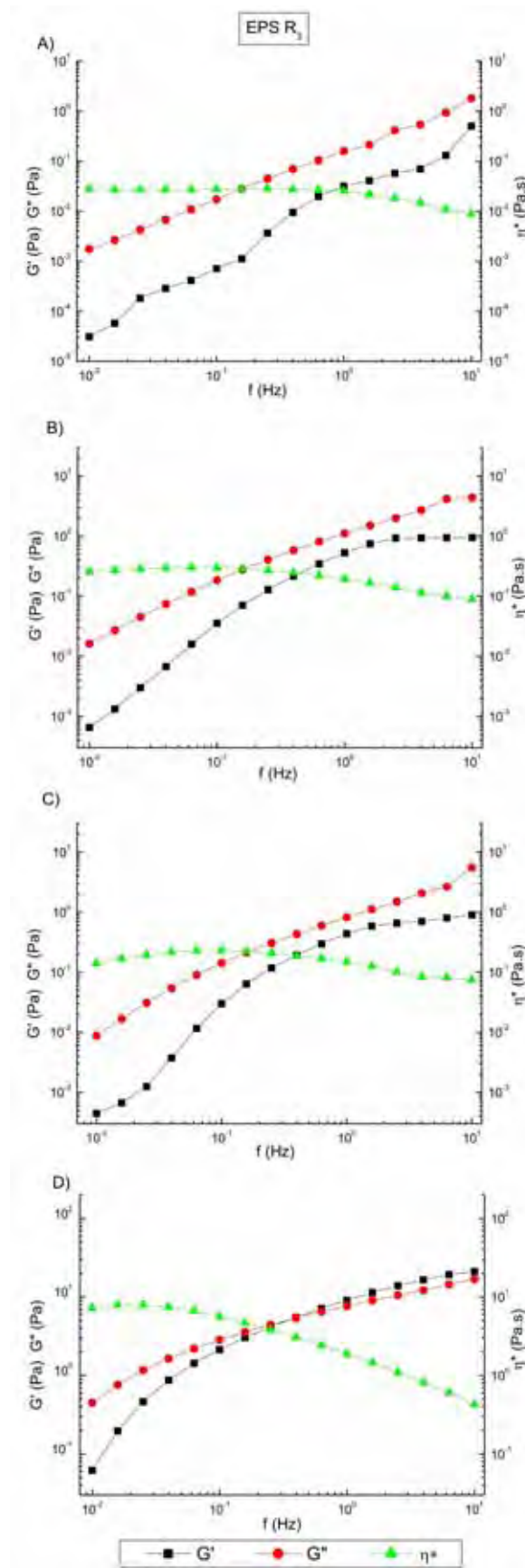


**Figura 23** - Análise do comportamento viscoelástico das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>1</sub> nas concentrações de 2 g/L (A), 5 g/L (B) e (C) e 10 g/L (D), à temperatura de 25 °C - (A), (B), (D) em solução aquosa; (C) em solução aquosa de NaCl 0,2 M.

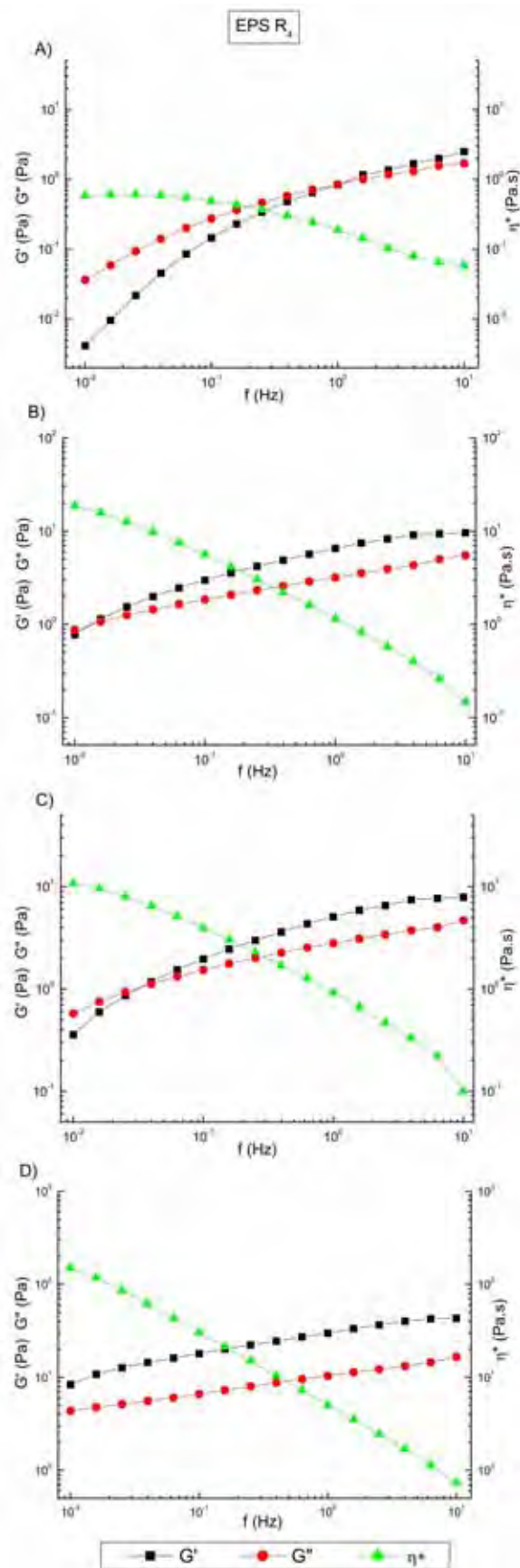




**Figura 24** - Análise do comportamento viscoelástico das soluções polissacarídicas do EPS  $R_2$  nas concentrações de 2 g/L (A), 5 g/L (B) e (C) e 10 g/L (D), à temperatura de 25 °C - (A), (B), (D) em solução aquosa; (C) em solução aquosa de NaCl 0,2 M.



**Figura 25** - Análise do comportamento viscoelástico das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>3</sub> nas concentrações de 2 g/L (A), 5 g/L (B) e (C) e 10 g/L (D), à temperatura de 25 °C - (A), (B), (D) em solução aquosa; (C) em solução aquosa de NaCl 0,2 M.



**Figura 26** - Análise do comportamento viscoelástico das soluções polissacarídicas do EPS R<sub>4</sub> nas concentrações de 2 g/L (A), 5 g/L (B) e (C) e 10 g/L (D), à temperatura de 25 °C - (A), (B), (D) em solução aquosa; (C) em solução aquosa de NaCl 0,2 M.

Os módulos de estocagem ( $G'$ ) e perda ( $G''$ ), ambos em função da frequência, fornecem informações sobre a estrutura do polímero em solução ou de seu gel (PIERMARIA; CANAL; ABRAHAM, 2008).

De acordo com os dados apresentados nas figuras 23, 24 e 26 as soluções dos EPS  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_4$  apresentam comportamento viscoelástico na concentração de 2 g/L, isto é, exibem comportamento de fluxo semelhante ao de um líquido, em baixas frequências, nas quais há predomínio de  $G''$ . Conforme a frequência aumenta ocorre distorção da rede e  $G'$  aumenta mais rapidamente que  $G''$ . Desta forma, os módulos tornam-se praticamente iguais e se cruzam num ponto denominado ponto de gelificação, a partir do qual  $G'$  é maior que  $G''$  e há predomínio do caráter sólido, apresentando comportamento de géis fracos (XU; LIU; ZHANG, 2006). Torres e colaboradores (2006) encontraram resultados semelhantes para soluções do polímero quitosana, uma glucosamina glucana, a 0,035 g/mL.

As figuras 23 e 24 mostram que as soluções dos exopolissacarídeos  $R_1$  e  $R_2$  (5g/L), tanto em água quanto em solução salina, exibem comportamento de gel, com valor de  $G'$  superior ao valor de  $G''$ . Doublier e Couvelier (1996) APUD Martínez-Padilla e colaboradores (2004) encontraram comportamento viscoelástico semelhante para soluções de xantana em KCl a 5 g/L.

Já o EPS  $R_4$  (Figura 26), na concentração de 5 g/L, apresenta o valor do módulo viscoso ( $G''$ ) maior que o módulo elástico ( $G'$ ) somente em baixos valores de frequência, mantendo esse comportamento mesmo em presença de NaCl, mostrando que exhibe comportamento viscoelástico de gel mais fraco quando comparado aos EPS  $R_1$  e  $R_2$ .

As soluções dos polímeros  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_4$ , na concentração de 10 g/L, apresenta valores de  $G'$  superiores aos de  $G''$ . Nota-se que  $G'$  e  $G''$  independem da frequência e a viscosidade dinâmica complexa  $\eta^*$  diminui linearmente com o aumento da frequência, apresentando comportamento viscoelástico com caráter sólido. Este comportamento é típico de gel forte (PIERMARIA; CANAL; ABRAHAM, 2008).

As soluções do EPS  $R_3$  (Figura 25) nas concentrações de 2 e 5 g/L (com e sem NaCl) mostram predominância de  $G''$  sobre  $G'$ , exibindo comportamento de solução diluída. Observamos também que a viscosidade complexa permanece linear com aumento da frequência. Este comportamento está provavelmente associado com o alto conteúdo de ácido urônico deste EPS. Cargas negativas pertencentes à cadeia do polímero fazem com que a conformação da cadeia seja influenciada pela salinidade (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002). Comportamento semelhante foi descrito por Martínez-Ruvalcaba e

colaboradores (2005) para soluções do polímero xantana a 0,1 g/L. É possível observar ainda que na concentração de 10 g/L o polímero R<sub>3</sub> exibe comportamento viscoelástico de gel fraco.

A dependência do módulo elástico (G') com a concentração do polímero na frequência de 10<sup>-1</sup> e 10<sup>0</sup> Hz é mostrada na Tabela 6.

**Tabela 6** - Valores do módulo G' nas varreduras de frequências dos EPS R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>, nas frequências (f) 10<sup>-1</sup> e 10<sup>0</sup> (Hz), à temperatura de 25 °C e 5 °C; valor do ponto de cruzamento (Hz).

|                |                           | G' (Pa)                 |                        |                        | Ponto de<br>Cruzamento (Hz) * |
|----------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------|
|                |                           | 10 <sup>-1</sup> (Hz) * | 10 <sup>0</sup> (Hz) * | 10 <sup>0</sup> (Hz) * |                               |
|                |                           | 25 °C                   | 25 °C                  | 5 °C                   |                               |
| R <sub>1</sub> | 2 g/L                     | 0,25                    | 0,98                   | ---                    | 0,28                          |
|                | 5 g/L em H <sub>2</sub> O | 4,37                    | 8,21                   | 9,74                   | ---                           |
|                | 5 g/L em NaCl             | 4,35                    | 8,43                   | ---                    | ---                           |
|                | 10 g/L                    | 24,60                   | 37,83                  | ---                    | ---                           |
| R <sub>2</sub> | 2g/L                      | 0,15                    | 0,86                   | ---                    | 0,91                          |
|                | 5 g/L em H <sub>2</sub> O | 3,65                    | 7,22                   | 7,5                    | ---                           |
|                | 5 g/L em NaCl             | 4,50                    | 8,75                   | ---                    | ---                           |
|                | 10 g/L                    | 21,72                   | 34,20                  | ---                    | ---                           |
| R <sub>3</sub> | 2 g/L                     | 0,00                    | 0,01                   | ---                    | ---                           |
|                | 5 g/L em H <sub>2</sub> O | 0,03                    | 0,52                   | 0,97                   | ---                           |
|                | 5 g/L em NaCl             | 0,02                    | 0,43                   | ---                    | ---                           |
|                | 10 g/L                    | 2,14                    | 9,08                   | ---                    | 0,36                          |
| R <sub>4</sub> | 2 g/L                     | 0,14                    | 0,83                   | ---                    | 1,31                          |
|                | 5 g/L em H <sub>2</sub> O | 2,98                    | 6,52                   | 7,10                   | 0,01                          |
|                | 5 g/L em NaCl             | 2,02                    | 5,17                   | ---                    | 0,03                          |
|                | 10 g/L                    | 19,22                   | 32,09                  | ----                   | ---                           |

\*Frequência (Hz)

Pelos resultados obtidos (Tabela 6) é possível observar o aumento de  $G'$  com o aumento da concentração dos polímeros, o que pode ser explicado pelo aumento no número e no tamanho dos pontos de junção entre as moléculas (BRITO et al., 2005; MARTÍNEZ-RUVALCABA; CHORNET; RODRIGUE, 2007).

A partir dos valores do módulo elástico ( $G'$ ) observados na Tabela 6, o EPS R<sub>1</sub> acredita-se que tem comportamento de gel mais forte, seguida por R<sub>2</sub> e R<sub>4</sub>, com valores intermediários, e R<sub>3</sub> formando soluções diluídas e gel fraco.

O ponto de cruzamento ou ponto de gelificação, no qual há inversão dos valores de  $G'$  e  $G''$ , fornece um indicativo do comportamento viscoelástico do material. Quanto mais baixos os valores do ponto de cruzamento, maior a contribuição do módulo elástico ( $G'$ ) no sistema (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002; LAMBO-FODJE et al., 2007). Através dos dados apresentados na Tabela 6, notamos que em baixas concentrações (2 g/L) o valor do ponto de cruzamento foi menor em R<sub>1</sub> indicando que adquire caráter elástico antes que todos os outros EPS, formando, portanto, um gel fraco nesta concentração.

Observamos também que em concentração maior (10 g/L) apenas os EPS R<sub>3</sub> apresenta valor no ponto de cruzamento demonstrando comportamento de gel fraco, indicando que apresenta caráter elástico quando submetido a frequências mais elevadas. O fato do EPS R<sub>3</sub> não apresentar valores de ponto de cruzamento nas concentrações de 2 e 5 g/L demonstra que este polímero forma soluções diluídas a baixas concentrações, e que o módulo viscoso ( $G''$ ) permanece superior ao módulo elástico ( $G'$ ) em toda faixa de frequência analisada (Figura 25 (A), (B) e (C)).

Ao contrário dos EPS R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>, o EPS R<sub>4</sub> apresenta baixos valores de ponto de cruzamento na concentração de 5 g/L em solução aquosa e salina (Tabela 6). Apesar da viscosidade absoluta da solução aquosa formada pelo EPS R<sub>4</sub> a 5 g/L ser ligeiramente inferior ao mesmo EPS em solução salina (Tabela 5), este polímero apresenta menor valor do ponto de cruzamento em solução aquosa, indicando que forma um gel mais rapidamente em água que em NaCl. Dados também mostrados na Figura 26 (B) e (C).

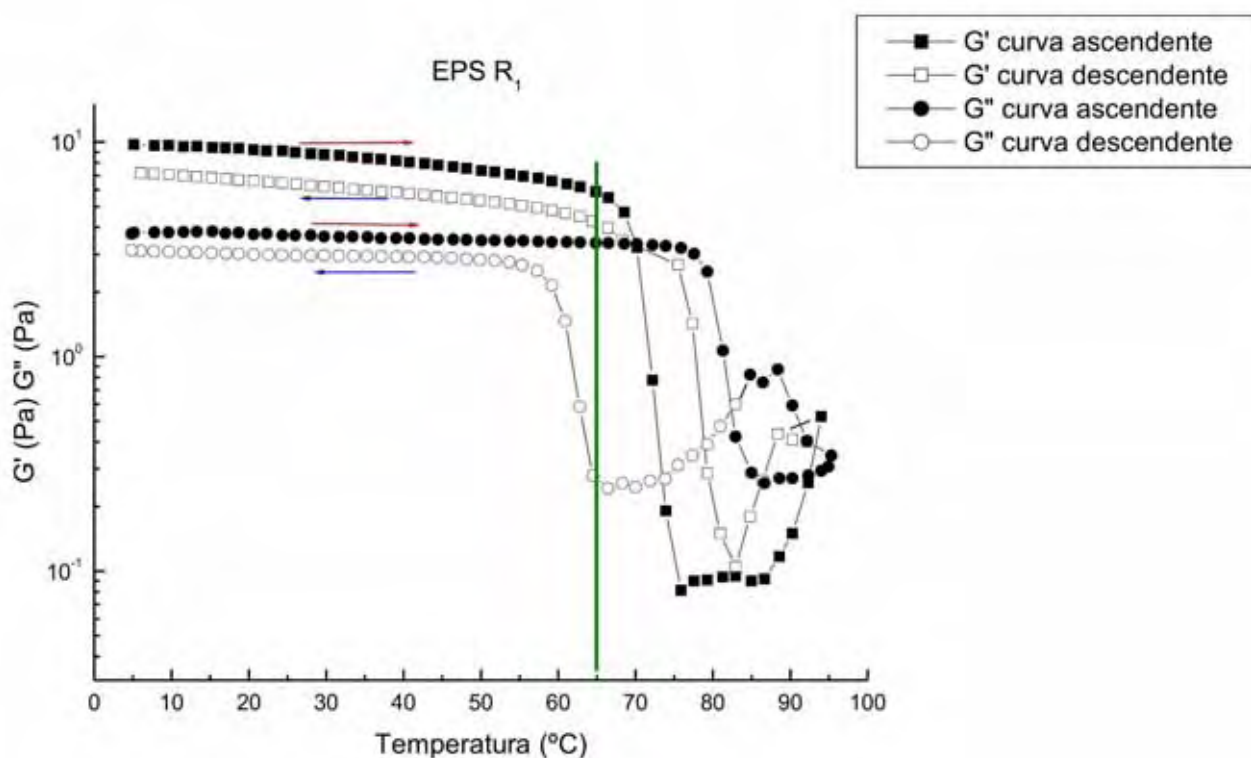
Simsek e colaboradores (2009) em estudo com linhagens da bactéria *Sinorhizobium*, produtora do polímero succinoglucana, encontraram diferentes valores para o ponto de cruzamento, e sugerem que possa ser atribuída a presença de substituintes carregados na molécula como piruvato, acetato e succinato.

Ainda a partir da Tabela 6, notamos que os valores do módulo elástico ( $G'$ ) a 5 °C é maior que  $G'$  a 25 °C na concentração de 5 g/L em todos EPS, demonstrando

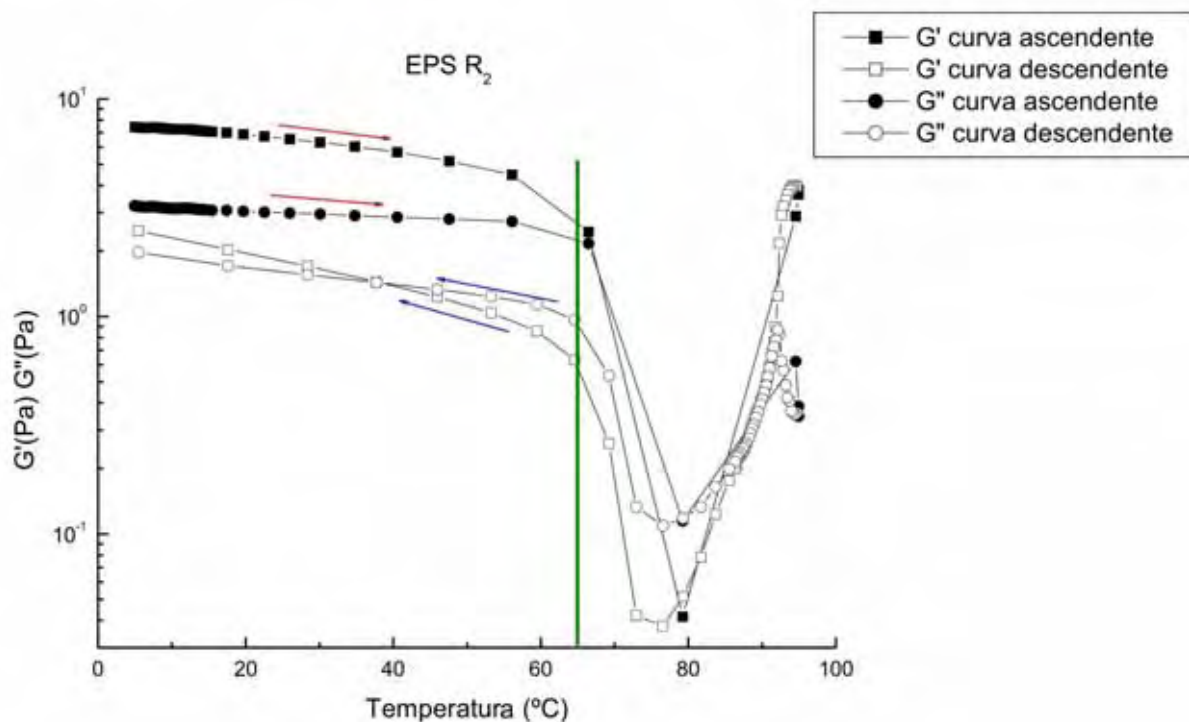
a formação de gel mais forte a baixas temperaturas. Mohammed e colaboradores (2007) descreveram comportamento semelhante para soluções de goma xantana a 5 g/L.

#### 5.4.6 Varredura de temperatura

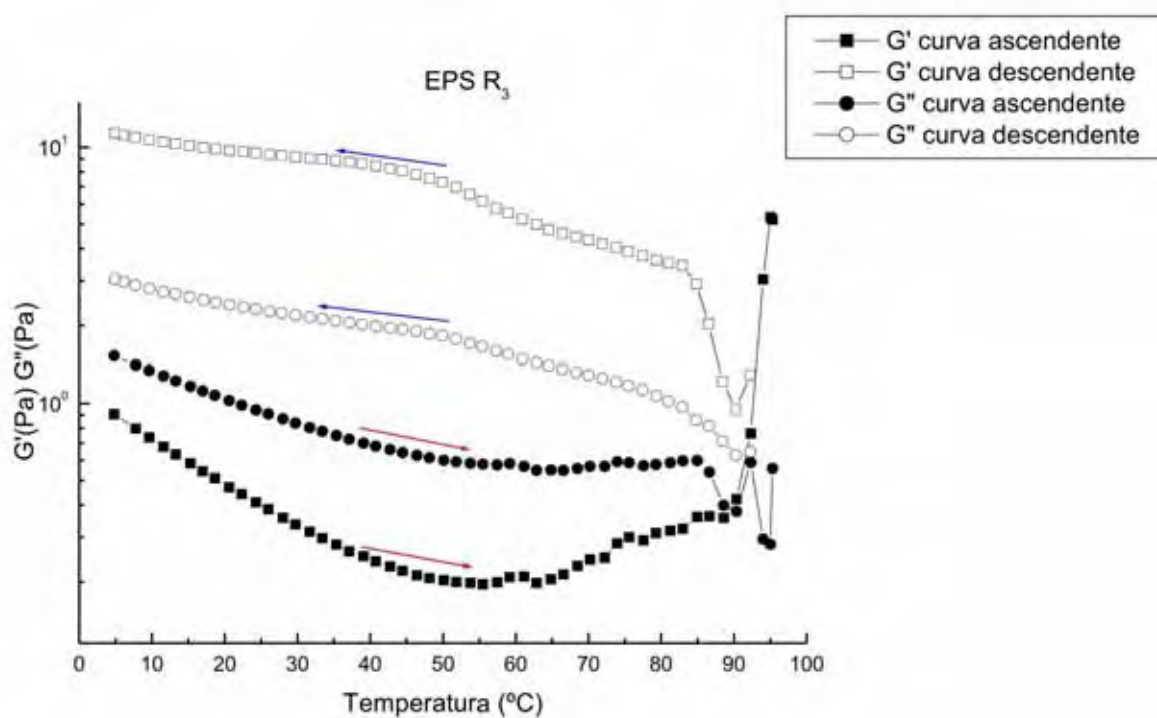
A varredura de temperatura é um experimento que tem como objetivo estudar o comportamento viscoelástico do gel, utilizando um gradiente linear, crescente e decrescente, de temperatura. As quatro amostras dos exopolissacarídeos produzidos pelas bactérias do gênero *Rhizobium* e *Mesorhizobium* foram analisados em uma varredura de temperatura de 5 a 95 °C (ascendente) e de 95 a 5 °C (descendente), com um aumento de 1,5 °C/min, e os resultados obtidos estão representados nas figuras 27 a 30.



**Figura 27** – Varredura de temperatura das soluções polissacarídicas (5 g/L) do EPS R<sub>1</sub>. Curva ascendente (5 a 95 °C) e descendente (95 a 5 °C), com aumento de 1,5 °C/min. Setas vermelhas: aquecimento; setas azuis: resfriamento.

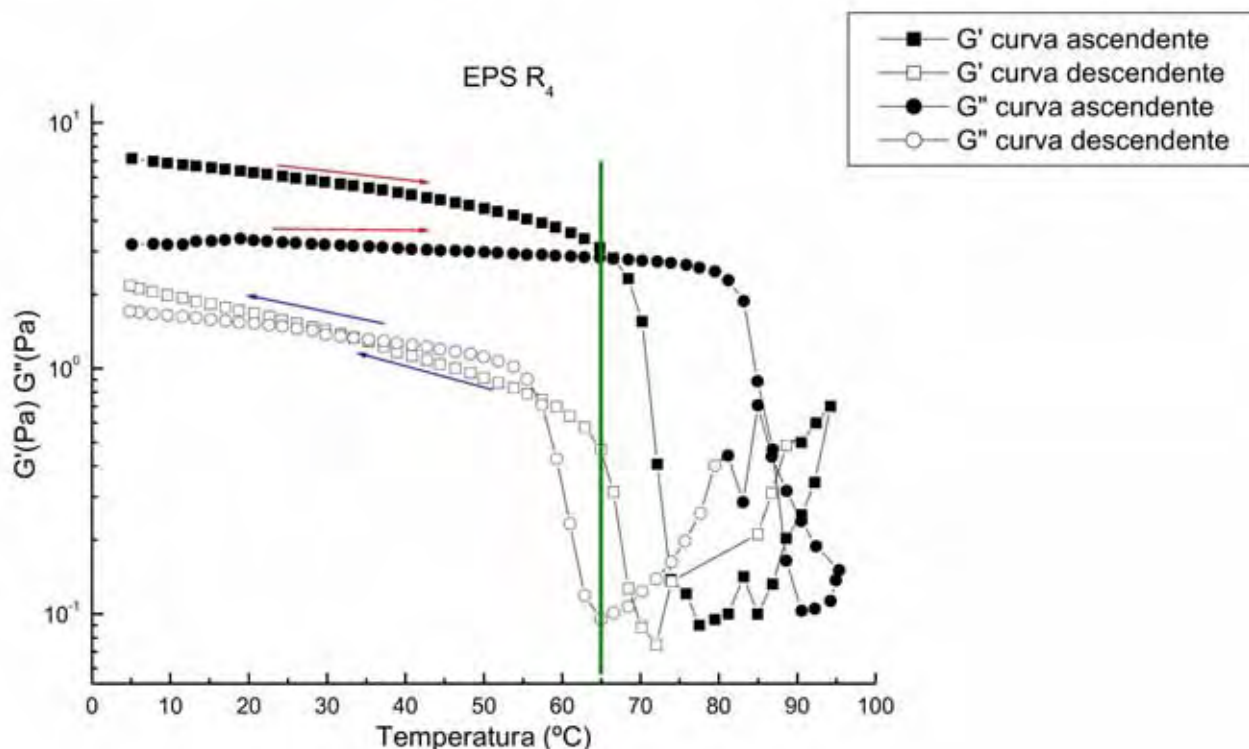


**Figura 28** – Varredura de temperatura das soluções polissacarídicas (5 g/L) do EPS  $R_2$ . Curva ascendente (5 a 95  $^{\circ}\text{C}$ ) e descendente (95 a 5  $^{\circ}\text{C}$ ), com aumento de 1,5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Setas vermelhas: aquecimento; setas azuis: resfriamento.



**Figura 29** – Varredura de temperatura das soluções polissacarídicas (5 g/L) do EPS  $R_3$ . Curva ascendente (5 a 95  $^{\circ}\text{C}$ ) e descendente (95 a 5  $^{\circ}\text{C}$ ), com aumento de 1,5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Setas vermelhas: aquecimento; setas azuis: resfriamento.





**Figura 30** – Varredura de temperatura das soluções polissacarídicas (5 g/L) do EPS R<sub>4</sub>. Curva ascendente (5 a 95 °C) e descendente (95 a 5 °C), com aumento de 1,5 °C/min. Setas vermelhas: aquecimento; setas azuis: resfriamento.

A partir dos dados do EPS R<sub>1</sub> (Figura 27), notamos que os valores dos módulos elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ), na faixa de 5 °C até aproximadamente 65 °C, mantêm-se com pequena variação. Esse comportamento também pode ser observado para as solução do EPS R<sub>2</sub> (Figura 28) e EPS R<sub>4</sub> (Figura 30).

Os pontos díspares observados nos gráficos dos EPS R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>4</sub> (Figuras 27, 28 e 30) a partir de aproximadamente 65 °C (linha verde) indicam a desestabilização da estrutura da molécula quando submetidos a altas temperaturas, e mostra a perda de força do gel (VRIESMANN; SILVEIRA; PETKOWICZ, 2009). A conformação das moléculas em solução passa de um estado molecular ordenado, quando em baixas temperaturas de dissolução, para um estado desordenado em temperaturas mais elevadas (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Já para o polímero R<sub>3</sub> (Figura 29), o qual forma soluções mais diluídas, notamos o comportamento de gel fraco durante o aquecimento (5 a 95 °C), com  $G''$  superior a  $G'$ , e durante o resfriamento (95 a 5 °C) forma gel forte, com  $G'$  superior a  $G''$ . Segundo García-Ochoa e colaboradores (2000), a viscosidade da solução de xantana

diminui com o aumento da temperatura até 40 °C. Entre 40 e 60 °C, a viscosidade aumenta. Para temperaturas acima de 60 °C, a viscosidade diminui à medida que a solução é aquecida. Este comportamento está, provavelmente, associado à interação das cargas na conformação da molécula de xantana.

A varredura de temperatura da solução polissacarídica de R<sub>4</sub> (Figura 30) mostra que, no aquecimento, G' é superior a G'', formando um gel termo resistente. Durante o resfriamento da solução, G'' mantêm-se superior a G' até aproximadamente 30 °C, quando então, ocorre a inversão dos valores, formando, portanto, um gel forte a baixas temperaturas.

Os exopolissacarídeos produzidos pelas diferentes linhagens de bactérias do gênero *Rhizobium* e *Mesorhizobium* ou por modificações nas condições do cultivo, apresentaram diferenças sutis em suas composições monossacarídicas (estrutura primária) que, acredita-se, foram suficientes, para promover alterações da estrutura secundária ou conformacional das moléculas. Isso pode ser constatado a partir dos resultados encontrados nas análises reológicas, tanto em sistema estático quanto em dinâmico, para cada um dos EPS estudados. Espera-se que os resultados apresentados neste trabalho contribuam com informações que permitam considerar essas macromoléculas e seus respectivos organismos produtores como objetos alvo de futura investigação e aplicação industrial.

## 6. CONCLUSÕES

A análise da composição monossacarídica, após hidrólise ácida, detectou a presença de glucose como componente majoritário em todos os EPS e a quantificação de ácidos urônicos mostrou que monossacarídeos ácidos fazem parte da estrutura química desses polímeros, sendo o EPS R<sub>3</sub> o que apresentou maior teor de ácidos urônicos (8,4 %).

Na cromatografia de filtração em gel os EPS R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> eluíram com um único pico e mostraram um perfil homogêneo, sendo o R<sub>2</sub> com menor polidispersividade.

Conforme as curvas de fluxo e viscosidade os biopolímeros em solução apresentaram comportamento não-Newtoniano, com características de soluções pseudoplásticas e não tixotrópicas nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L, e o modelo reológico de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) proporcionou os melhores ajustes dos dados reológicos.

Os EPS R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>4</sub> mostraram um ligeiro aumento na viscosidade em presença de NaCl, e o EPS R<sub>3</sub> manteve-se como o menos viscoso, tanto em meio aquoso quanto em solução salina, provavelmente devido ao maior percentual de ácidos urônicos em sua estrutura.

Os resultados das análises dinâmicas complementaram os resultados obtidos em sistema estático, mostrando comportamento viscoelástico de gel para os EPS de *Rhizobium*. Nota-se que o EPS R<sub>1</sub> é o material que forma gel mais forte, seguida por R<sub>2</sub> e R<sub>4</sub>, com valores intermediários, e R<sub>3</sub> formando soluções diluídas e gel fraco.

Ao analisar a influência de uma ampla faixa de temperatura (5 a 95°C) sobre o comportamento viscoelástico dos géis, observou-se que as soluções dos EPS R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>4</sub> apresentaram características de gel forte, e todos EPS estudados demonstraram formar gel mais forte a baixas temperaturas (5 °C).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMEMURA, A.; HARADA, T.; ABE, M.; HIGASHI, S. Structural studies on the extracellular acidic polysaccharide from *Rhizobium trifolii* 4S. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 115, p. 165-174, 1983.

ARAÚJO, D. G.; NASCIMENTO, C. R. Propriedades reológicas da polpa de bauxita – II. Avaliação do rotor tipo vane. In: **Jornada de Iniciação Científica 15**; Rio de Janeiro. Anais Eletrônicos CETEM, 2007, Disponível em: [http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie\\_anais\\_XV\\_jic\\_2007/Diego.pdf](http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_XV_jic_2007/Diego.pdf). Acesso em: 07 Ago.2008.

ARAÚJO, L.; ALVES, F.; Aditivos e ingredientes: ao gosto do consumidor. **Brasil Alimentos**, São Paulo, n. 19, p. 18-24, 2003.

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

BAE, I.Y.; OH, I-K.; LEE, S.; YOO, S-H.; LEE, H.G. Rheological characterization of levan polysaccharides from *Microbacterium laevaniformans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v.42, n.1, p.10-13, 2008.

BANIK, R. M.; KANARI, B.; UPADHYAY, S. N. Review: Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Kanganam-Ku, v.16, p. 407-414, 2000.

BARBOSA, A.M.; STELUTI, R.M.; DEKKER, R.F.H.; CARDOSO, M.S.; DA SILVA, M.L.C. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3,1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, Botryosphaeria sp. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 338, p. 1691-1698, 2003.

BEYER, R.; MELTON, D. L.; KENNEDY, D.L. Viscosity studies on the polysaccharide gum from *Rhizobium* strain CB 744. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 39, p.151-161. 1987.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO F. O. **Química de processamento de alimentos**. São Paulo: 1992.

BONGIOVANI, R.A.M. **Características reológicas do exopolissacarídeo botriosferana produzido pelo *botryosphaeria rhodina* mamb- 05 em três fontes de carbono: glucose, frutose e sacarose**. 2008. 112f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto.

BONGIOVANI, R.A.M.; SILVEIRA, J.L.M.S.; PENNA, A.N.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.N.M.; CORRADI DA SILVA, M.L. Caracterização reológica dos botriosferanas produzidos pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em glucose, sacarose e

frutose como fontes de carbono. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.12, p.53-59, 2009.

BOYER, R.F. **Modern experimental biochemistry**. Califórnia: Benjamin/Cummings Publishing Company, 1993.

BUSATO, A.P.; REICHER, F.; DOMINGUES, R.; SILVEIRA, J.L.M. Rheological properties of thermally xyloglucan gel from seeds of *Hymenaea courbaril*. **Materials Science and Engineering C**, v.29, p.410-414, 2009.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Lisboa, v.72, p.248-254, 1976.

BRANCO, I.G.; GASPARETTO, C.A. Comportamento reológico de misturas de polpa de manga e sucos de laranja e cenoura utilizando o modelo de Casson. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.8, p.183-189, 2005.

BREEDVELD, M.W.; MILLER, K.J. Cyclic  $\beta$ -glucans of members of the family Rhizobiaceae. **Microbiology Review**, Oxford, v. 58, p. 145-161, 1994.

BRESOLIN, T.M.B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; GANTER, J.L.M.S. Xanthan-galactomannan interactions as related to xanthan conformations. **International Journal of Biological Macromolecules**. Oxford, v.23, p.263-275, 1998.

BRETAS, R. E. S.; D'ÁVILA, M. A. **Reologia de polímeros fundidos**. 2. ed. São Carlos: EdUFSCar, 2005.

BRITO, A.C.F.; SIERAKOWSKI, M.R.; REICHER, F.; FEITOSA, J.P.A. PAULA, R.C.M. Dynamic rheological study of *Sterculia striata* and karaya polysaccharides in aqueous solution. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 19, n.5, p. 861-867, 2005.

BRITO, A.C.F.; SILVA, D.A.; PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. *Sterculia striata* polysaccharide: characterization, rheological properties and comparison with *Sterculia urens* (karaya) polysaccharide. **Polymer International**, Auckland, v. 53, p. 1025-1032, 2004.

CABRAL, M.F.P.; QUEIROZ, A.J.M.; FIGUEIRÊDO, R.M.F. Comportamento reológico da polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) peneirada. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, p.37-40, 2002.

CANILHA, L.; SILVA, D. D. V.; CARVALHO, W.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte 3: polissacarídeos e enzimas. **Revista Analytica**, São Paulo, v. 20, p. 32-41, 2006.

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

CASSON, N. A. **Flow equation for pigment-oil suspensions of the printing ink type, in Rheology of Disperse Suspensions**. New York: Pergamon, 1959.

CASTELLANE, T.C.L.; LEMOS, E.G.M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.10, p.1503-1506, 2007.

CHAMBERLAIN, E.K.; RAO, M.A. Rheological properties of acid converted waxy maize starches in water and 90% DMSO/10% water. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.40, p.251-260, 1999.

CORRADI DA SILVA, M.L.; MARTINEZ, P.F.; IZELI, N.L.; SILVA, I.R.; VASCONCELOS, A.F.D.; CARDOSO, M.S.; STELUTTI, R.M.; GIESE, E.C.; BARBOSA, A.M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, Araraquara, v.29, p.85-92, 2006.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO, F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n.1, p. 73-78, 2005.

COSTA, M. Entenda o que é tixotropia. **Informativo CRQ-IV**, São Paulo, nº. 81, p. 10-11, 2006.

CRUZ PRADELLA, J. G. Biopolímeros e Intermediários Químicos. **Relatório Técnico nº 84 396-205**, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos - Laboratório de Biotecnologia Industrial- LBI/CTPP, São Paulo: 2006. Disponível em <[http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06\\_biopolimeros.pdf](http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06_biopolimeros.pdf)>, acesso em 21. jul. 2008.

CUNHA, M. A. A.; SANTOS, J. C.; GÓMEZ, R. J. H. C.; SILVA, S. S. Goma curdlana: Propriedades e aplicações. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, p. 55-61. 2004.

DAK, M.; VERMA, R.C.; JAAFREY, S.N.A. Effect of temperature and concentration on rheological properties of “Kesar” mango juice. **Journal of Food Engineering**, Davis, v.80, p.1011–1015, 2007.

DIAZ, P. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S. Reologia de xantana: uma revisão sobre a influência de eletrólitos na viscosidade de soluções aquosas de gomas xantana. **Semina: ciências exatas e tecnológicas**, Londrina, v. 25, n.1, p. 15-28, 2004.

DUBOIS, N.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Lisboa, v.28, p.350-356, 1956.

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

FERREIRA, G.M.; GUIMARÃES, M.J.O.C.; MAIA, M.C.A. Efeito da temperatura e taxa de cisalhamento nas propriedades de escoamento da polpa de cupuaçu (*T. grandiflorum* Schum) integral. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, p.385-389, 2008.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, Lisboa, v. 197, p. 157-162, 1991.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; PAIS, J.; COSTA, N.; OLIVEIRA, C.; MAFRA, L.; HILLIOU, L.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. **Bioresource Technology**, v. 100, p.859-865, 2009.

FREITAS, C. A. S.; MAIA, G. A.; COSTA, J. M. C.; FIGUEIREDO, R. W.; RODRIGUES, M. C. P.; SOUSA, P. H. M. Estabilidade do suco tropical de acerola (*Malpighia emarginata* d.c.) adoçado envasado pelos processos *hot-fill* e asséptico. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 544-549, 2006.

FUNAMI, T.; FUNAMI, M.; YADA, H.; NAKAO, Y. Rheological and thermal studies on gelling characteristics of curdlan. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 13, n. 4, p.317-324, 1999.

FUNAMI, T., NISHINARI, K. Gelling characteristics of curdlan aqueous dispersions in the presence of salts. **Food hydrocolloids**. Oxford, v.21, n.1, p.59-65, 2007.

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

GÓMEZ, M.; RONDA, F.; CABALLERO, P. A.; BLANCO, C. A.; ROSELL, C. M. Functionality of different hydrocolloids on the quality and shelf-life of yellow layer cakes. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 21, n.2, p. 167-173, 2007.

GUENTAS, L.; PHEULPIN, P.; MICHAUD, P.; HEYRAUD, A.; GEY, C.; COURTOIS, B.; COURTOIS, J. Structure of a polysaccharide from a *Rhizobium* species containing 2-deoxy- $\beta$ -D-arabino-hexuronic acid. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 332, n.2, p. 167-173, 2001.

HAMINIUK, C. W. I. **Estudo do comportamento reológico e colorimétrico de misturas ternárias e sistemas pécticos de polpas de morango, amora-preta e framboesa**. 2007. 124f. Dissertação (Doutorado). Programa de pós-graduação em tecnologia de alimentos, setor de tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

HAMINIUK, C.W.I.; SIERAKOWSKI, M-R.; IZIDORO, D.R.; MASSON, M.L. Rheological Characterization of Blackberry Pulp. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.9, p.291-296, 2006.

HISAMATSU, M.; ABE, J.; AMEMURA, A.; HARADA, T. Structural elucidation on succinoglycan and related polysaccharides from *Agrobacterium* and *Rhizobium* by fragmentation with two special  $\beta$ -D-glycanases and methylation analysis. **Agriculture Biological Chemistry**, v. 44, p. 1049-1055, 1980.

HISAMATSU, M. et al. Structural characterization of a new acidic exopolysaccharide and cyclic (1→2) β-glucan produced by *Rhizobium huakuii* forming nodules on *Astragalus sinicus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 83, n. 4, p. 315-320, 1997.

HONORATO, T. L.; RABELO, M. C.; GONÇALVES, L. R. B.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Estudo da massa molar viscosimétrica de dextrana obtida via processo fermentativo com dextrana-sacarase do *Leuconostoc mesenteroides* B512F. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16; 2005. Campinas. **Anais**, Campinas: p.1-6, 2005.

IAGUER, F.; REICHER, F.; GANTER, J.L.M.S. Structural and rheological properties of polysaccharides from mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **International Journal of Biological Macromolecules**. Oxford, v.31, p.9-17, 2002.

KACI, Y.; HEYRAUD, A.; BARAKAT, M.; HEULIN, T. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Research in Microbiology**, Paris, v.156, n.4, p.522-531, 2005.

KUMAR, C.G.; JOO, H-S.; CHOI, J-W.; KOO, Y-M.; CHANG, C-S. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p.673-681, 2004.

KUMAR, A.S.; MODY, K.; JHA, B. Review article: Bacterial exopolysaccharides – a perception. **Journal of Basic Microbiology**. Wheinhein, v.47, p. 103-107, 2007.

LAMBO-FODJE, A.M.; LEEMAN, M.; WAHLUND, K.-G.; NYMAN, M.; ÖSTE, R.; LARSSON, H. Molar mass and rheological characterization of an exopolysaccharides from *Pediococcus damnosus* 2.6. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.68, p.577-586, 2007.

LEIGH, J.A .; REED, J.W.; HANKS, J.F., HIRSCH, A .M.; WALKER, G.C. *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*, **Cell**, Massachusetts, v. 51, n.4, p. 579-587, 1987.

LEVERY, S. B.; ZHAN, H.; LEE, C.C.;M LEIGH, J.A.; HAKOMORI, S. Structural analysis of a second acidic exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* that can function in alfalfa root nodule invasion. **Carbohydrate Research**, Amsterdam , v. 210, p. 339-347, 1991.

LOPES, L.; ANDRADE, C. T.; MANO, E. B. O valor das gomas para as indústrias. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 12, p. 65-6,1991.

LÓPEZ, M. J.; VARGAS-GARCÍA, M. C.; SUAREZ-ESTRELLA, F.; MORENO, J. Properties of xanthan obtained from agricultural wastes acid hydrolysates. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 63, n.1, p. 111–115, 2004.

LYNNE, T.; WALKER,G.C. Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. **Cell**, v. 74, n.2, p. 269-280, 1993.



MAIA, L. H.; PORTE, A.; SOUZA, V. F. Filmes comestíveis: aspectos gerais, propriedades de barreira a umidade e oxigênio. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 18, p. 105-128, 2000.

MARCZAK, M.; MAZUR, A.; GRUSZECKI, W.I.; SKORUPSKA, A. Psso, a unique extracellular protein important for exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. **Biochimie**, Paris, v.90, p.1781-1790, 2008.

MARTÍNEZ-PADILLA, L.P.; LÓPEZ-ARAIZA, F.; TECANTE, A. Steady and oscillatory shear behavior of fluids gels formed by binary mixtures of xanthan and gellan. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 18,p. 471-481, 2004.

MARTÍNEZ-RUVALCABA, A.; CHORNET, E.; RODRIGUE, D. Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 67, p. 586-595, 2007.

MENDES, S. F.; SANTOS JUNIOR, O.; BARBOSA, A. M.; VASCONCELOS, A. F. D.; ARANDA-SELVERIO, G.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F. H.; PEREIRA, M. S.; TOVAR, A. M. F.; MOURÃO, P. A. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, In Press, Corrected Proof. doi10.1016/j.ijbiomac, 2009.

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

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

NELSON, N.A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biochemistry**, Oxford, v.153, p.376-380, 1944.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: principles of biochemistry**; 3. ed. New York: Worth Publishers, 2000.

PAZUR, J.H. Neutral Polysaccharides. Chaplin M.F.; Kennedy J.F. **Carbohydrate analysis: a practical approach**. 2.ed. Oxford: Oxford University Press, 1994, p.181-229.

PELEGRINE, D.H.; SILVA, F.C.; GASPARETTO, C.A. Rheological behavior of pineapple and mango pulps. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* - **Food Science and Technology**, v.35, p.645-648, 2002.

PELLETIER, E.; VIEBKE, C.; MEADOWS, J.; WILLIAMS, P.A. A rheological study of the order-disorder conformational transition of xanthan gum. **Biopolymers**, v. 59, p. 339-346, 2001.

PIERMARIA, J.A.; CANAL, M.L.; ABRAHAM, A.G. Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. **Food Hydrocolloids**, Oxford. v. 22, n. 8, p.1520-1527,2008.

PINTO, E. P.; MOREIRA, A.; VENDRUSCOLO, C. T. Influência do pH, adição de sais e temperatura na viscosidade dos biopolímeros produzidos por *Beijerinckia* sp. 7070 e UR4. **Revista Brasileira Agrocência**, Pelotas, v. 8, n. 3, p. 247-251, 2002.

RAO, V. S. R.; QASBA, P. K. BALAJI, P.U.; CHANDRASEKARAN, R. **Conformation of Carbohydrates**. 1º ed., Harwood Academic Publishers. 1999.

RIDOUT, M.J.; BROWNSEY, G.J.; YORK, G.M.; WALKER, G.C.; MORRIS, V.J. Effect of *o*-acyl substituents on the functional behaviour of *Rhizobium meliloti* succinoglycan. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 1-7, 1997.

ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de Xanthomonas sp. Para produção de goma xantana**. 2005. 95f. Dissertação (Mestrado) Departamento de ciências agrárias – Programa de mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguia e das Missões – URI, Campus de Erechim.

SAMPAIO, L.C.; NASCIMENTO, C. R. Propriedades Reológicas da Polpa de Bauxita – I. Estudo da influência da concentração e da distribuição granulométrica. In: Jornada de Iniciação Científica 15; Rio de Janeiro. **Anais Eletrônicos CETEM**, 2007, Disponível em: [www.cetem.gov.br/publicacao/serie\\_anais\\_XIV\\_jiv\\_2006/Lilian%20Sampaio.pdf](http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_XIV_jiv_2006/Lilian%20Sampaio.pdf) Acesso em: 07 Ago.2008.

SAUDE, N.; JUNTER, G.A. Production and molecular weight characteristics of alginate from free and immobilized-cell cultures of *Azotobacter inelandii*. **Process Biochemistry**, Vandoeuvre-les-Nancy, v. 37, p. 895–900, 2002.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Artliber, 2006.

SERRATO, R.V.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; CRUZ, L.M.; PEDROSA, F.O.; CHOUDHURY, B. CARLSON,R.W.;IACOMINI,M. Structural characterization of an acidic exoheteropolysaccharide produced by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*.**Carbohydrate Polymers**, Barking, v.73, n.4, p.564-572, 2008.

SHARYPOVA, L.A.; CHATAIGNÉ, G.; FRAYSSE, N.; BECKER, A.; POINSOT, V. Overproduction and increased molecular weight account for the symbiotic activity of the *rkpZ*-modified K polysaccharide from *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. **Glycobiology**, Oxford, v.16, n. 12, p.1181–1193, 2006.

SHIMADA, A.; NAKATA, H.; NAKAMURA, I. Acidic exopolysaccharide produced by *Enterobacter* sp. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.84, n. 2, p. 113-118, 1997.

SHOBHA, M.S.; THARANATHAN, R.N. Rheological behaviour of pullulanase-treated guar galactomannan on co-gelation with xanthan. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.749-754, 2009.

SIMSEK, S.; MERT, B.; CAMPANELLA, O.H.; REUHS, B. Chemical and rheological properties of bacterial succinoglycan with distinct structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.76, p.320-324, 2009.

SINGH, R.S.; SAINI, G.K.; KENNEDY, J.F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, Nova Iorque, v.73, p.515-531, 2008.

SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, Stanford, v.160, p.61-68, 1945.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 25, p. 331-340, 2004.

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

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

TABILO-MUNIZAGA, G; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Rheology for the food industry. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 67, p. 147-156, 2005.

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

TORALLES, R.P.; VENDRUSCOLO, J.L.; VENDRUSCOLO, C.L. Reologia de purê homogêneo de pêsego: Efeito da temperatura e concentração. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.9, p.1-8, 2006.

TORRES, M.A.; BEPPU, M.M.; SANTANA, C.C.; ARRUDA, E.J. Viscous and viscoelastic properties of chitosan solutions and gels. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.9, p.101-108, 2006.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**; 8. ed, Porto Alegre: Artmed, 2005.

TOSIN, F.F.S. **Polissacarídeos da goma de exsudato e da polpa dos frutos de Prunus persica**: Caracterização estrutural e análises reológicas. 2008. 228f. Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

VASCONCELOS, A. F. D.; MONTEIRO, N.K.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R.; CORRADI DA SILVA, M.L. Three exopolysaccharides of the  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan type and a  $\beta$  - (1 $\rightarrow$ 3;

1→6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.14, p.2481-2485, 2008.

VIDAL, J.R.M.B.; SIERAKOWSKI, M-R.; HAMINIUK, C.W.I.; MASSON, M.L. Propriedades reológicas da polpa de manga (*Mangifera indica* L. cv. Keitt) centrifugada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, p.955-960, 2006.

VIJAYENDRA, S.V.N.; PALAVINEL, G.; MAHADEVAMMA, S.; THARANATHAN, R.N. Physico-chemical characterization of an exopolysaccharide produced by a non-ropy strain of *Leuconostoc* sp. CFR 2181 isolated from *dahi*, an Indian traditional lactic fermented milk product. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 72, p. 300-307, 2008.

VILLAIN-SIMONNET, A.; MILAS, M.; RINAUDO, M. A new bacterial exopolysaccharide (YAS34). II. Influence of thermal treatments on the conformation and structure. Relation with gelation ability. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 27, p.77-87, 2000.

VRIESMANN, L.C. **Extração, caracterização e aspectos reológicos de polissacarídeos da polpa dos frutos de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu)**. 2008. 117f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

VRIESMANN, L.C.; SILVEIRA, J.L.M.; PETKOWICZ, C.L.O. Chemical and rheological properties of a starch-rich fraction from the pulp of the fruit cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Materials Science and Engineering C**, v.29, p.651-656, 2009.

WYATT, P. J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Analytica Chimica Acta**, Oxford, v. 272, p. 1-40, 1993.

XU, X.; LIU, W.L.; ZHANG, L. Rheological behavior of *Aeromonas* gum in aqueous solutions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.20, p.723-729, 2006.

YAMAMOTO, F.; CUNHA, R. L. Acid gelation of gellan: Effect of final pH and heat treatment conditions. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.68, n.3, p.517-527, 2007.

YAMAZAKI, E.; KURITA, O.; MATSUMURA, Y. High viscosity of hydrocolloid from leaves of *Corchorus olitorius* L. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.23, p.655-660, 2009.

ZHANG, Y; XU, X; ZHANG, L. Dynamic viscoelastic behavior of triple helical Lentinan in water: Effect of temperature. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.22, p.6681-6690, 2008.

**ANEXO**

**Carta de aceite de submissão de manuscrito**

----- Forwarded message -----

From: <sbqedit@iq.usp.br>

Date: 2009/7/21

Subject: [QN] - Submissão Temporária - tmp tmp\_4878

To: corradiml@gmail.com

REF.: tmp tmp\_4878

Prezado Prof. CORRADI DA SILVA, MARIA DE LOURDES

Obrigado por submeter seu manuscrito "PROPRIEDADES REOLÓGICAS E EFEITO DA ADIÇÃO DE SAL NA VISCOSIDADE DE EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS DO GÊNERO RHIZOBIUM" para publicação na Química Nova, QN.

O NÚMERO TEMPORÁRIO é: tmp\_4878 tmp.

Assim que o seu arquivo PDF for verificado, o seu manuscrito será inserido no sistema, e você receberá um outro e-mail com o NÚMERO DE REFERÊNCIA, confirmando assim a submissão (este novo e-mail poderá demorar até 3 dias úteis para ser enviado).

Caso você tenha alguma outra dúvida a respeito desta submissão, por favor, entre em contato com a Gerente Editorial da QN no e-mail: sbqedit@iq.usp.br.

Atenciosamente,

Pricila Gil

SBQ - gerente editorial

**Artigo encaminhado a Revista Química Nova**

PROPRIEDADES REOLÓGICAS E EFEITO DA ADIÇÃO DE SAL NA VISCOSIDADE DE EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS DO GÊNERO *RHIZOBIUM*.

**Gabriel Aranda-Selverio, Ana Lúcia Barretto Penna**

Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos – IBILCE, Universidade Estadual Paulista, CEP 15054-000 São José do Rio Preto – SP, Brasil

**Luciana Frizarin Campos-Sás, Osvaldo dos Santos Junior, Ana Flora Dalberto Vasconcelos e Maria de Lourdes Corradi da Silva\***

Departamento de Física, Química e Biologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, CP 266, CEP 19060-900 Presidente Prudente – SP, Brasil.

**Eliana Gertrudes Macedo Lemos e João Carlos Campanharo**

Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, CEP 14884-900 Jaboticabal – SP, Brasil

**Joana Léa Meira Silveira**

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CP 19046, CEP81531990 Curitiba – PR, Brasil

---

Email: [corradi@fct.unesp.br](mailto:corradi@fct.unesp.br)

RHEOLOGICAL PROPERTIES AND EFFECT OF THE SALT ADDITION ON THE EXOPOLYSACCHARIDES VISCOSITY PRODUCED BY BACTERIA OF RHIZOBIUM GENUS.

**Abstract**

Viscosity of some polysaccharides solutions supports that these molecules can be applied in food sectors. Four exopolysaccharides ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ) produced by different *Rhizobium* strains were selected. Sugar composition and differences in the uronic acid contents suggests that chemical structure of these molecules can varies when different culture conditions and strains were analyzed. The Power Law was the rheological model used to represent the experimental data of the shear stress versus shear rate. All exopolysaccharides showed non-Newtonian behavior, with pseudoplastic characteristics.  $R_1$ ,  $R_2$  and  $R_4$  showed a slight increase in viscosity in presence of 0,2 M NaCl.

Keywords: Rheological behaviour; Exopolyssacharides from *Rhizobium*, Pseudoplastic solution.



## 1. INTRODUÇÃO

Há na natureza plantas e microrganismos que secretam polímeros, denominados exopolissacarídeos (EPS), que podem ser classificados como homo- e heteropolissacarídeos. Os primeiros são, geralmente, glucanas neutras, enquanto os heteropolissacarídeos são, em sua grande maioria, polianiónicos devido à presença de ácido urônico.

Os EPS microbianos são considerados substitutos ideais para polissacarídeos de plantas, pois uma vez estabelecidas às melhores condições de cultivo as moléculas produzidas apresentam características químicas e físicas constantes e, geralmente, superiores às gomas naturais.<sup>1</sup> A aplicação desses biopolímeros em diferentes setores industriais, tais como alimentício e farmacêutico,<sup>2</sup> se deve ao fato de alterarem as propriedades físicas do meio onde se encontram, seja por conferirem alta viscosidade às soluções ou por criarem redes intermoleculares coesivas. Na indústria de alimentos podem ser utilizados como espessantes, estabilizantes, emulsificantes, coagulantes, formadores de filmes, gelificantes, agentes de suspensão e dispersantes.<sup>3</sup>

As características físico-químicas dos polissacarídeos dependem da seqüência em que os açúcares estão dispostos na molécula, da presença de resíduos iônicos e da forma como as cadeias se entrelaçam.<sup>2</sup> A solubilidade dos polímeros tende a ser maior quando grupos ácidos ionizáveis estão presentes na molécula. Soluções aquosas de polissacarídeos contendo sais inorgânicos podem ter suas viscosidades modificadas e, por essa razão, os estudos reológicos normalmente investigam o comportamento dos biopolímeros em tais condições.<sup>4</sup>

Polissacarídeos microbianos tais como xantana, gelana, alginatos, celulose bacteriana, ácido hialurônico e succinoglucanos já são aplicados nas indústrias de alimentos, química e farmacêutica.<sup>1, 5</sup> A aplicação da goma xantana na indústria de alimentos se deve principalmente ao seu comportamento não-Newtoniano e formação de soluções pseudoplásticas a baixas concentrações;<sup>6</sup> essas características reológicas são dependentes da concentração do polímero e da presença de eletrólitos em solução.<sup>7</sup>

Dentre os microrganismos produtores de polissacarídeos há um gênero de bactérias, denominado genericamente de rizóbio, que secreta exopolissacarídeos com diferentes funções biológicas.<sup>8</sup> Essas moléculas são necessárias no processo de invasão da célula hospedeira e na formação de nódulos fixadores de nitrogênio em plantas leguminosas. Um exemplo típico dessa interação envolve a bactéria gram-negativa, do solo, *Sinorhizobium meliloti* e seu hospedeiro, alfafa. A bactéria secreta vários polissacarídeos entre eles succinoglucanas e galactoglucanas, necessários para a invasão da mesma.<sup>9</sup>

Castellane e Lemos<sup>10</sup> cultivaram *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e SEMIA 4080, em diferentes fontes de carbono, para produção de exopolissacarídeos e observaram que eles eram constituídos, majoritariamente, por resíduos de glicose e galactose, com traços de manose, ramnose e ácidos urônicos. Entretanto, as proporções de açúcar mostraram-se variáveis para cada exopolissacarídeo produzido. Considerando-se que as propriedades físico-químicas podem variar em função da composição química da molécula, este trabalho tem como objetivo investigar o comportamento reológico dos exopolissacarídeos produzidos pelas diferentes linhagens do *Rhizobium*.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

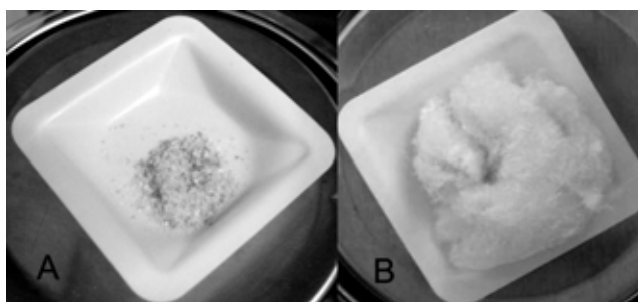
### **2.1. Obtenção dos exopolissacarídeos e preparo de suas soluções**

Os exopolissacarídeos utilizados para as análises foram fornecidos pela Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal. Detalhes das condições de cultivo dos microrganismos produtores destes EPS não foram disponibilizados. Estas informações estão sob sigilo de patente com registro PI0304053-4.

Três diferentes linhagens de bactérias do gênero *Rhizobium* foram utilizadas para a produção dos exopolissacarídeos. Os EPS R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> foram produzidos a partir da mesma estirpe, *Rhizobium tropici*, com diferenças nas condições de cultivo (dados não

disponíveis). O EPS R<sub>3</sub> foi produzido a partir de uma linhagem denominada *Mesorhizobium* e o EPS R<sub>4</sub> a partir de uma estirpe selecionada conhecida como *Rhizobium* sp.

Antes de todas as análises os exopolissacarídeos foram, individualmente, dialisados (72 horas em água destilada corrente) em tubos de 12 KDa, concentrados a baixa temperatura (38 °C) e liofilizados (Figura 1). Foram mantidos desta forma até o momento do uso.



**Figura 1.** (A) Ilustração do EPS R<sub>1</sub> seco e moído; (B) EPS R<sub>1</sub> dialisado e liofilizado

## 2.2. Métodos analíticos

Açúcares totais foram determinados pelo método do fenol-ácido sulfúrico<sup>11</sup> e os açúcares redutores pelo método de Somogy e Nelson.<sup>12</sup> A glucose foi utilizada como padrão em ambos os ensaios. Ácidos urônicos foram quantificados pelo método de Filisetti-Cozzi e Carpita<sup>13</sup> e o ácido glucurônico foi utilizado como padrão. As proteínas foram determinadas pelo método de Bradford<sup>14</sup> e soro albumina bovina foi utilizado como padrão.

## 2.3. Hidrólise Ácida Total

Para se determinar a composição em monossacarídeos, cada EPS (50 µg em açúcares totais) foi submetido à hidrólise ácida<sup>15</sup> (TFA 5 M, 100 °C, 12 h), em tubo selado. Após hidrólise, o excesso de ácido foi removido por co-destilação com água e analisado por HPAEC-PAD (*high performance anionic exchange chromatography-pulsed*

*amperometric detection*). As condições da análise cromatográfica foram efetuadas como descrito por Mendes e colaboradores.<sup>16</sup>

#### 2.4. Comportamento reológico

Para estudo do comportamento reológico os EPS foram solubilizados em água deionizada à temperatura de  $\pm 20$  °C, nas concentrações de 2 g/L, 5 g/L e 10 g/L. As soluções foram mantidas sob agitação mecânica constante, em velocidade média, à temperatura de  $\pm 20$  °C por 18 horas.

As medidas reológicas das soluções polissacarídicas foram efetuadas em reômetro HAAKE Rheostress, modelo RS75, acoplado a um banho termostatizado HAAKE K15 e termocirculador de água DC5B3. Foi utilizado o sensor cone-placa com diâmetro de 60 mm e ângulo do cone de 2 °. A taxa de cisalhamento ou deformação ( $\dot{\gamma}$ ) variou de 0 até 200 s<sup>-1</sup> com um tempo de 300 s, com aquisição de 200 pontos em escala logarítmica. As amostragens foram realizadas em triplicata à temperatura de 25 °C. Os reogramas, para cada uma das três concentrações de cada EPS, foram gerados utilizando software *RheoWin* (versão 3.20). O modelo da Lei da Potência (Equação 1) foi ajustado aos reogramas e os valores do índice de consistência e índice de comportamento de fluxo do fluido foram determinados para as concentrações das soluções analisadas

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:  $\tau$  = tensão de cisalhamento (Pa)

$\dot{\gamma}$  = taxa de deformação (s<sup>-1</sup>)

K = índice de consistência (Pa.s)

n = índice de comportamento de fluxo do fluido (-)

## 2.5. Influência da salinidade na viscosidade

Com o objetivo de avaliar o comportamento reológico dos biopolímeros na presença de sais, os mesmos foram solubilizados em NaCl 0,2 M na concentração de 5 g/L à temperatura de 25 °C e as medidas reológicas foram efetuadas como no item 2.4.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Quantificação dos exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>, foram quantificados para açúcares totais e redutores, proteínas e ácidos urônicos. Os resultados são mostrados na Tabela 1. Os baixos valores encontrados na quantificação de açúcares redutores<sup>12</sup> sinalizam que os carboidratos presentes em solução estão, principalmente, na forma de polissacarídeos e o elevado teor de ácido urônico (8,4 %) presente no polissacarídeo produzido pelo *Mesorhizobium* (R<sub>3</sub>) indica um polímero aniônico. No preparo das soluções polissacarídicas para as reações de quantificação o R<sub>3</sub> apresentou-se como menos viscoso e, de acordo com a literatura, o comportamento reológico de polímeros acídicos é diferente daquele apresentado pelos polímeros neutros. A presença de ácidos glucurônico e pirúvico na goma xantana, confere ionicidade à mesma, promovendo alterações na conformação molecular e aumentando a solubilidade de suas soluções.<sup>4</sup>

Os resultados da hidrólise ácida, para açúcares neutros (Tabela 1), indicaram uma pequena diferença na composição de R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>, ambos produzidos pelo mesmo microrganismo, *Rhizobium tropici*, com pequenas variações no método de produção. A presença majoritária da glucose em todos os exopolissacarídeos indica uma cadeia principal constituída, principalmente, de glucose. De acordo com a literatura microrganismos de linhagens diferentes ou com diferenças apenas nas condições de cultivos, produzem polissacarídeos semelhantes nos quais a cadeia principal, normalmente, é a mesma, com variações no grau de ramificação. Esses resultados também foram, parcialmente, demonstrados por Castellane e Lemos.<sup>10</sup>

**Tabela 1** – Quantificações de açúcares totais e redutores, proteínas e ácido urônico dos exopolissacarídeos produzidos por diferentes linhagens de bactérias do gênero *Rhizobium*.

| <b>Exopolissacarídeos/<br/>Microorganismos<br/>produtores</b> | <b>Açúcar<br/>total (%)</b> | <b>Açúcar<br/>reduzidor<br/>(%)</b> | <b>Proteína<br/>(%)</b> | <b>Ácido<br/>urônico<br/>(%)</b> | <b>Composição em<br/>açúcares<br/>neutros (%)</b> |        |
|---|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|---|--------|
| <b>R<sub>1</sub></b><br>( <i>Rhizobium tropici</i> )          | 94,6                        | 0,10                                | 3,0                     | 2,4                              | Glc   | 77     |
|   |                             |                                     |                         |                                  | Gal   | 18     |
|   |                             |                                     |                         |                                  | Man   | 3      |
| <b>R<sub>2</sub></b><br>( <i>Rhizobium tropici</i> )          | 94,1                        | 0,11                                | 4,2                     | 1,7                              | Glc   | 79     |
|   |                             |                                     |                         |                                  | Gal   | 21     |
|   |                             |                                     |                         |                                  | Man   | traços |
| <b>R<sub>3</sub></b><br>( <i>Mesorhizobium</i> )              | 87,1                        | 0,12                                | 4,5                     | 8,4                              | Glc   | 87     |
|   |                             |                                     |                         |                                  | Gal   | 13     |
|   |                             |                                     |                         |                                  | Man   | traços |
| <b>R<sub>4</sub></b><br>( <i>Rhizobium sp.</i> )              | 95,1                        | 0,10                                | 4,1                     | 0,8                              | Glc   | 80     |
|   |                             |                                     |                         |                                  | Gal   | 20     |
|   |                             |                                     |                         |                                  | Man   | traços |

Traços significam < 1%

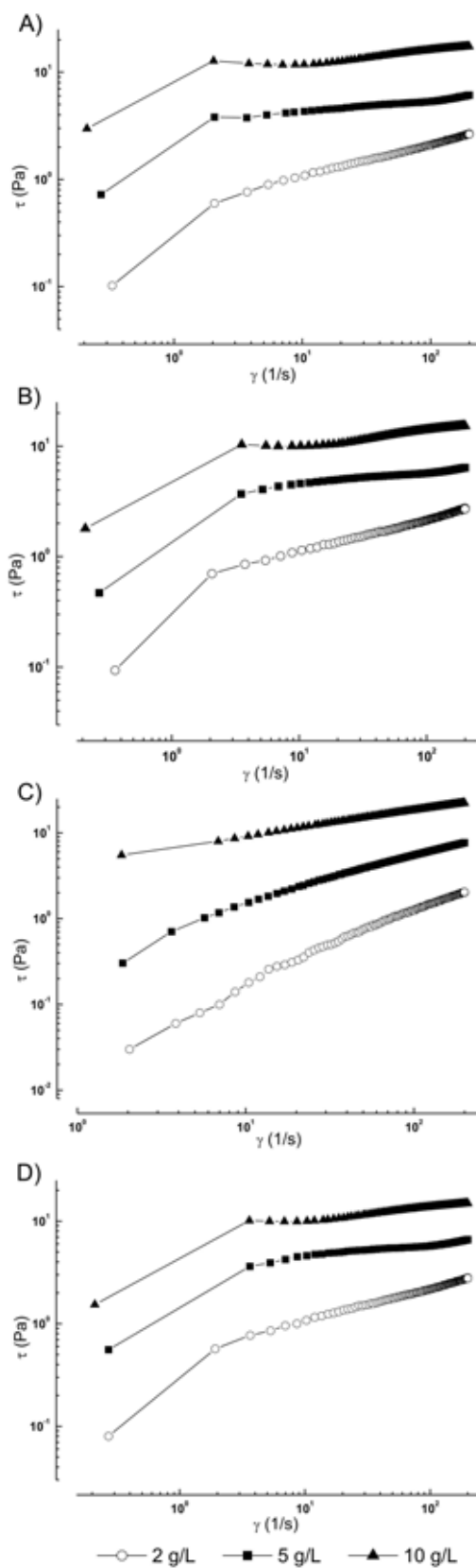
Considerando-se que os resultados apresentados na tabela 1 indicam que as moléculas devem possuir algumas diferenças estruturais, foram preparadas soluções de diferentes concentrações para averiguar o comportamento reológico de cada exopolissacarídeo, selecionado para esse trabalho.

### 3.2. Comportamento reológico das soluções formadas pelos exopolissacarídeos

A curva de fluxo, definida a partir das medidas de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) permite verificar o comportamento de fluxo das soluções polissacarídicas. A partir da construção do reograma é possível estabelecer se um líquido apresenta comportamento de fluxo Newtoniano ou não-Newtoniano, em determinadas condições de tensão ou taxa de deformação. Um líquido Newtoniano é representado, graficamente, por uma reta com início na origem da curva de fluxo. Os que não exibem esse comportamento são chamados não-Newtonianos. A análise dos reogramas com diferentes concentrações poliméricas permite evidenciar a transição de um comportamento Newtoniano para não-Newtoniano.<sup>17</sup>

O perfil apresentado nos reogramas mostrados na figura 2 permite estabelecer que as soluções polissacarídicas R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub> têm comportamento de fluxo de líquidos não-Newtonianos e o aumento da tensão de cisalhamento a partir do aumento progressivo da taxa de deformação, caracteriza as soluções como fluidos pseudoplásticos.<sup>18</sup> Soluções formadas pelo EPS 450, produzido pelo *Bacillus* SP, também apresentam comportamento pseudoplástico assim como várias outras soluções de polissacarídeos microbianos.<sup>19</sup>

A descrição do comportamento reológico dos materiais pode ser 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 utilizados para os sistemas de alimentos são Ostwald-De-Waele (Lei da Potência), Casson, Herschel-Bulkley e Mizrahi-Berki. Os dois primeiros utilizam equações matemáticas com dois parâmetros e os demais com três parâmetros.<sup>20</sup> Para as soluções formadas pelos exopolissacarídeos produzidos pelas diferentes linhagens de *Rhizobium*, nas concentrações de 2, 5 e 10 g/L o modelo de Ostwald-De-Waele proporcionou os melhores ajustes, com maiores valores do coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e menores valores para  $\chi^2$  (Tabela 2). O desvio de “n” da unidade indica o grau de desvio do comportamento newtoniano. Valores de  $n < 1$  definem comportamento pseudoplástico. As soluções polissacarídicas estudadas neste trabalho apresentaram  $n < 1$ , indicando comportamento pseudoplástico (Tabela 2).



**Figura 2.** Reogramas (tensão de cisalhamento x taxa de deformação) das soluções polissacarídicas (A)  $R_1$ , (B)  $R_2$ , (C)  $R_3$  e (D)  $R_4$  nas concentrações de 2 g/L, 5 g/L e 10 g/L, à temperatura de 25 °C



**Tabela 2.** Parâmetros reológicos obtidos pela análise das soluções exopolissacarídicas pela aplicação do modelo da Lei da Potência.

| <b>Amostra</b>     | <b>Concentração<br/>(g/L)</b> | <b>Índice de<br/>Consistência<br/>(K)</b> | <b>Índice de<br/>Comportamento<br/>de Fluxo (n)</b> | <b>Coefficiente<br/>de Regressão<br/>(R<sup>2</sup>)</b> | <b><math>\chi^2</math></b> |
|--------------------|-------------------------------|---|---|--|----------------------------|
| EPS R <sub>1</sub> | 2                             | 0.51                                      | 0.30  | 0,99   | 0,05                       |
|                    | 5                             | 3.14                                      | 0.11  | 0,98   | 0,08                       |
|                    | 5 em NaCl                     | 3.36                                      | 0.19  | 0,99   | 0,04                       |
|                    | 10                            | 9.30                                      | 0.12  | 0,99   | 0,05                       |
| EPS R <sub>2</sub> | 2                             | 0.52                                      | 0.30  | 0,99   | 0,09                       |
|                    | 5                             | 3.70                                      | 0.09  | 0,99   | 0,06                       |
|                    | 5 em NaCl                     | 3.80                                      | 0.17  | 0,99   | 0,08                       |
|                    | 10                            | 7.33                                      | 0.14  | 0,99   | 0.06                       |
| EPS R <sub>3</sub> | 2                             | 0.04                                      | 0.73  | 0,99   | 0,06                       |
|                    | 5                             | 0.52                                      | 0.50  | 0,99   | 0,06                       |
|                    | 5 em NaCl                     | 0.32                                      | 0.55  | 0,99   | 0,06                       |
|                    | 10                            | 4.90                                      | 0.28  | 0,99   | 0,07                       |
| EPS R <sub>4</sub> | 2                             | 0.50                                      | 0.32  | 0,99   | 0,06                       |
|                    | 5                             | 3.24                                      | 0.10  | 0,98   | 0,09                       |
|                    | 5 em NaCl                     | 4,31                                      | 0.21  | 0,99   | 0,02                       |
|                    | 10                            | 7.13                                      | 0.13  | 0,99   | 0,04                       |

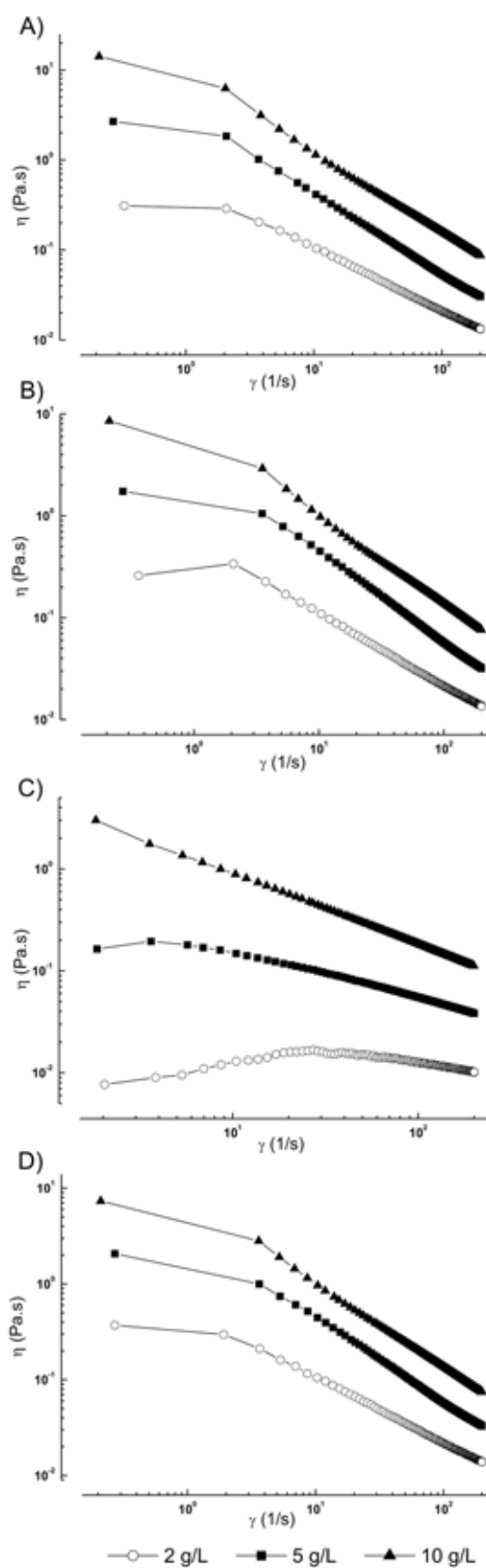
É possível, ainda, observar a partir do índice de consistência (K) (Tabela 2) um aumento progressivo da viscosidade conforme se aumenta a concentração das soluções de todos EPS. Nota-se uma tendência da solução do exopolissacarídeo R<sub>1</sub> ser mais viscosa do que as soluções de R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>, principalmente em concentrações maiores

(10 g/L).  $R_3$  apresenta menores valores de K, em qualquer uma das concentrações analisadas, em comparação aos demais EPS.

A tabela 2 mostra que as soluções dos exopolissacarídeos  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_4$ , em presença de NaCl 0,2 M, apresentam um pequeno aumento no valor do índice de consistência (K) quando comparados com as mesmas concentrações das soluções aquosas dos respectivos polissacarídeos, indicando que a presença desse eletrólito favorece a viscosidade dos polímeros. Um valor menor de K para o exopolissacarídeo produzido pelo *Mesorhizobium* ( $R_3$ ), em presença de sal na concentração de 5 g/L pode ser atribuído à interação entre resíduos carregados de ácido urônico (8,4 %) e os íons provenientes da dissociação do sal. A dissolução do hidrogel quitosana-xantana em meio eletrolítico promove o aumento da viscosidade, enquanto para a goma xantana sozinha, em baixas concentrações, a adição de um eletrólito, por exemplo, NaCl, reduz a viscosidade; entretanto, em concentrações elevadas a presença do eletrólito tem efeito oposto, embora um gel fraco de xantana seja formado.<sup>7,21</sup>

### 3.3. Efeito da adição de sal na viscosidade

As curvas de fluxo têm suas correspondentes curvas de viscosidade.<sup>17</sup> Foram realizados estudos quanto à viscosidade aparente das soluções aquosas (2, 5 e 10 g/L) dos biopolímeros  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  e  $R_4$ . As medidas da viscosidade ( $\eta$ ) x taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) foram reunidas em um único gráfico, para cada um dos EPS investigados. Pelos resultados obtidos (Figura 3) é possível observar que a viscosidade aumenta com o aumento da concentração dos polímeros, entretanto com o aumento da taxa de deformação, para uma mesma concentração do polímero, ocorre a diminuição da viscosidade. Fluidos que sofrem diminuição da viscosidade, quando a taxa de deformação aumenta, são chamados pseudoplásticos.<sup>22</sup> Esse perfil caracteriza o comportamento pseudoplástico de  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  e  $R_4$



**Figura 3.** Viscosidade absoluta ( $\eta$ ) em função da taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) de (A) R<sub>1</sub>, (B) R<sub>2</sub>, (C) R<sub>3</sub> e (D) R<sub>4</sub> nas concentrações de 2 g/L, 5 g/L e 10 g/L, em solução aquosa, à temperatura de 25 °C.

Um estudo comparativo da viscosidade das soluções aquosa e salina dos biopolímeros (5 g/L), juntamente com o teor de ácidos urônicos, é apresentado na Tabela 3. Valores maiores de viscosidade são encontrados em baixas taxas de deformação ( $10 \text{ s}^{-1}$ ), com R<sub>3</sub> apresentando os menores valores. O decréscimo da viscosidade aparente com o aumento da taxa de deformação pode ser atribuído a mudança estrutural dos polímeros devido as forças hidrodinâmicas geradas e o maior alinhamento das moléculas na direção da tensão aplicada.<sup>23</sup> Em taxas de deformação mais elevadas os valores de viscosidade para os quatro polímeros são praticamente semelhantes, provavelmente devido a ação de deformação sobre a estrutura das moléculas.

**Tabela 3** – Viscosidade absoluta ( $\eta$ ) das soluções aquosa e salina dos EPS R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>, nas concentrações de 5 g/L e nas taxas de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) 10; 50 e 100 ( $\text{s}^{-1}$ ), à temperatura de 25 °C.

|                | Ácido urônico (%) |                           | Viscosidade ( $\eta$ ) (Pa.s) |                     |                      |
|----------------|-------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------|
|                |                   |                           | $10 \text{ s}^{-1}$           | $50 \text{ s}^{-1}$ | $100 \text{ s}^{-1}$ |
| R <sub>1</sub> | 2,4               | 5 g/L em H <sub>2</sub> O | 0,41                          | 0,10                | 0,05                 |
|                |                   | 5 g/L em NaCl 0,2 M       | 0,51                          | 0,14                | 0,08                 |
| R <sub>2</sub> | 1,7               | 5 g/L em H <sub>2</sub> O | 0,45                          | 0,10                | 0,05                 |
|                |                   | 5 g/L em NaCl 0,2 M       | 0,54                          | 0,14                | 0,08                 |
| R <sub>3</sub> | 8,4               | 5 g/L em H <sub>2</sub> O | 0,14                          | 0,07                | 0,05                 |
|                |                   | 5 g/L em NaCl 0,2 M       | 0,10                          | 0,05                | 0,04                 |
| R <sub>4</sub> | 0,8               | 5 g/L em H <sub>2</sub> O | 0,44                          | 0,10                | 0,05                 |
|                |                   | 5 g/L em NaCl 0,2 M       | 0,44                          | 0,12                | 0,07                 |

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>4</sub> solubilizados em solução aquosa de NaCl apresentaram maior viscosidade quando comparados com os respectivos polímeros dissolvidos apenas em

água. R<sub>3</sub> comportou-se como o menos viscoso, tanto em meio aquoso quanto em solução aquosa contendo NaCl, provavelmente devido ao maior percentual de ácidos urônicos (8,4 %) em sua estrutura. Freitas e colaboradores<sup>24</sup> estudaram o comportamento reológico de um exopolissacarídeo ácido produzido por *Pseudomonas oleovorans* NRRLB-14682, em solução aquosa, e constataram que possui propriedades viscoelásticas similares a goma Guar, mas com grande afinidade aos sais, como resultado de sua característica de polieletrólito.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados nos experimentos efetuados neste trabalho indicam que linhagens diferentes (R<sub>1</sub>/R<sub>2</sub>/R<sub>4</sub> e R<sub>3</sub>) de um mesmo microrganismo produzem moléculas de composição química semelhantes, entretanto com diferenças, ainda que sutis, suficientes para alterar o comportamento reológico de suas soluções.

#### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de mestrado ao aluno Gabriel A. Selverio e à FAPESP (processo 05/53879-3).

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Singh, R.S.; Saini, G.K.; Kennedy, J.F.; *Carbohydr. Polym.* **2008**, 73, 515.
2. Kumar, A.S.; Mody, K.; Jha, B.; *J Basic Microbiol.* **2007**, 47, 103; Vijayendra, S.V.N.; Palavinel, G.; Mahadevamma, S.; Tharanathan, R.N.; *Carbohydr. Polym.*, **2008**, 72, 300.
3. Lopes, L.; Andrade, C. T.; Mano, E. B.; *Ciênc. hoje* **1991**, 12, 65; Maia, L. H.; Porte, A.; Souza, V. F.; *B. CEPPA*, **2000**, 18, 105; Araujo, L.; Alves, F.; *Brasil Alimentos*, **2003**, 19, 18; Cunha, M. A. A.; Santos, J. C.; Gómez, R. J. H. C.; Silva, S. S.; *Biotechnol. Ciênc. e Desenvol.*, **2004**, 33, 55; Gómez, M.; Ronda, F.; Caballero, P. A.; Blanco, C. A.; Rosell, C. M.; *Food Hydrocoll.*, **2007**, 21,167.
4. Diaz, P. S.; Vendruscolo, C. T.; Vendruscolo, J. L. S.; *Semin.*, **2004**, 25, 15.
5. Kumar, C.G.; Joo, H-S.; Choi, J-W.; Koo, Y-M.; Chang, C-S. ; *Enzyme Microb. Technol.*, **2004**, 34, 673; Piermaria, J.A.; Canal, M.L.; Abraham, A.G.; *Food Hydrocoll.*, **2008**, 22, 1520.
6. Shobha, M.S.; Tharanathan, R.N.; *Food Hydrocoll.*, **2009**, 23, 749.
7. Martínez-Ruvalcaba, A.; Chornet, E.; Rodrigues, D. *Carbohydr. Polym.*, **2007**, 67, 586.

8. Marczak, M.; Mazur, A.; Gruszecki, W.I.; Skorupska, A.; *Biochimie*, **2008**, 90, 1781.
9. Sharypova, L.A.; Chataigné, G.; Fraysse, N.; Becker, A.; Poinot, V.; *Glycobiology*, **2006**, 16, 1181; Serrato, R.V.; Sasaki, G.L.; Gorin, P.A.J.; Cruz, L.M.; Pedrosa, F.O.; Choudhury, B. Carlson, R. W.; Iacomini, M.; *Carbohydr. Polym.*, **2008**, 73, 564.
10. Castellane, T.C.L.; Lemos, E.G.M. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, **2007**, 42, 1503.
11. Dubois, N.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A., Smith, F., *Anal. Chem.*, **1956**, 28, 350.
12. Somogyi, M.; *J. Biol. Chem.*, **1945**, 160, 61; Nelson, N.A.; *J. Biochem.*, **1944**, 153, 376.
13. Filisetti-Cozzi, T. M. C.; Carpita, N. C.; *Anal. Biochem*, **1991**, 197, 157.
14. Bradford, M.M.; *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 248.
15. Vasconcelos, A. F. D.; Monteiro, N. K.; Dekker, R. F. H.; Barbosa, A. M.; Carbonero, E. R.; Silveira, J. L. M.; Sasaki, G. L.; Silva, R.; Corradi da Silva, M. L., *Carbohydr. Res.*, **2008**, 343, 2481.
16. Mendes, S. F., Santos Junior, O., Barbosa, A. M., Vasconcelos, A. F. D., Selverio, G. A., Monteiro, N. K., Dekker, R. F. H., Pereira, M. S., Tovar, A. M. F., Mourão, P. A. S., Corradi da Silva, M. L.; *Int. J. Biol. Macrom.*, **2009**, doi10.1016/j.ijbiomac.2009.06.004.
17. Schramm, G. Em Reologia e Reometria: Fundamentos teóricos e práticos; Mothé, C., Correia, D. Z., Petri, H. M., Gonçalves, M., Carestiatto, T. Eds.; Artliber Editora Ltda: São Paulo, 2006, cap. 1, 2 e 3.
18. Navarro, R. F. Fundamentos de reologia de polímeros. Editora da Universidade de Caxias do Sul: Caxias do Sul, 1997.
19. Rottava, I. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do alto Araguaia e das Missões– URI, Campus de Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil, 2005.
20. Haminiuk, C. W. I., Sierakowski, M. R., Izidoro, D. R., Masson, M. L.; *Braz. J. Food Technol.*, **2006**, 9, 291.
21. Carrington, S.; Odell, J.; Fisher, L.; Mitchell, J.; Hartley, L.; *Polym.*, **1996**, 37, 2871.
22. Bongiovani, R. A. M., Silveira, J. L. M., Penna, A. L. B., Dekker, R. f. H., Barbosa, A. M., Corradi da Silva, M. L., *Braz. J. Food Technol.*, **2009**, 12, 53.
23. Ferreira, G.M.; Guimarães, M.J.O.C.; Maia, M.C.A.; *Rev. Bras. Frutic.*, **2008**, 30, 385.
24. Freitas, F.; Alves, V.D.; Pais, J.; Costa, N.; Oliveira, C.; Mafra, L.; Hilliou, L.; Oliveira, R.; Reis, M.A.M.; *Bioresour. Technol.*, **2009**, 100, 859.