



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

CARACTERIZAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR
Mesorhizobium loti SEMIA 816 A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL

JOICE MILIANE DE OLIVEIRA

PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT

Orientador

RIO GRANDE, RS

2017

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

CARACTERIZAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR
***Mesorhizobium loti* SEMIA 816 A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL**

JOICE MILIANE DE OLIVIERA

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

PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT
Orientador

RIO GRANDE, RS

2017

Ficha catalográfica

O48c Oliveira, Joice Miliane de.
Caracterização do exopolissacarídeo produzido por *Mesorhizobium loti* semia 816 a partir de glicerol residual / Joice Miliane de Oliveira. – 2017.

82 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2017.

Orientador: Dr. Carlos André Veiga Burkert.

1. Biopolímeros 2. Gomas microbianas 3. Bactérias diazotróficas
4. Reologia 5. Emulsões 6. Textura I. Burkert, Carlos André Veiga
II. Título.

CDU 664

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Joice Miliane de Oliveira e aprovada em 03 de abril de 2017, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:


Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert – FURG


Dra. Vanessa Amaral Ribeiro – UFSM


Profa. Dra. Janaina F. de Medeiros Burkert – FURG.


Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto – FURG

**Dedico este trabalho aos meus pais Dilceu e Nidia por todo esforço e apoio para que eu
pudesse chegar até aqui.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por guiar meus passos sempre na direção certa.

À minha mãe, Nídia e ao meu pai Dilceu, obrigada por me ensinarem qual caminho seguir, pelo apoio incondicional, pela confiança em mim depositada, por sempre se fazerem presentes mesmo distante.

Ao meu dois irmãos, Junior e Jonas, obrigada pelos conselhos, incentivo e pela ajuda sempre que foi necessário.

Ao meu namorado, Marciel Sipp, obrigada por ter entrado em minha vida e desde sempre fazer parte de cada momento, por me aguentar nesses últimos meses que não foram nada fáceis. Por me incentivar e me apoiar, pelo amor, carinho e dedicação sempre, especialmente neste período.

Ao meu orientador, Carlos André, por me acolher em seu laboratório, pela orientação e contribuição para a conclusão deste trabalho.

Aos professores por aceitarem participar da defesa desta dissertação, enriquecendo este trabalho.

À Renata Trindade, pela amizade e pela ajuda principalmente no início do trabalho, quando tudo é difícil, sempre com muita paciência e boa vontade.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, que me acolheram e me ajudaram muito durante a execução deste trabalho, pela ótima companhia e pelos momentos de descontração, em especial, o técnico do laboratório Bruno Ladeira, Carina Borba, Daniela Nogueira, Belkis Roesler, Renata Nunes, Tabita, pelo auxílio ao longo do trabalho, por me ajudarem sempre quando necessário.

À nossa querida pós-Doc Joana Ores, pelos ensinamentos e dúvidas tiradas sempre que necessário.

Agradeço à Vanessa Ribeiro, pela ajuda mesmo estando longe, sempre disposta e prestativa.

Às novas amigas que fiz no mestrado, Bárbara e Jenifer, espero levar para vida toda. E as antigas que nunca morram independente das circunstâncias. Obrigada Dalvana Barzoto e Dionéia dos Santos pela ótima companhia sempre (mesmo estando longe), por partilharem angústias, conquistas e descobertas.

À aluna de iniciação científica Sabrina Adamoli, pela ajuda na parte experimental, pela dedicação e boa vontade.

Ao Laboratório de Controle Ambiental, Laboratório de Análise Sensorial e Controle de Qualidade e ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos, pelo auxílio nas análises reológicas, empréstimo de equipamentos, vidrarias e análise de TPA.

Ao CNPq, FAPERGS e CAPES, pelo apoio financeiro.

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

“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de competência.”
(Henry Ford)

RESUMO

Os exopolissacarídeos (EPSs) são produzidos por uma grande variedade de micro-organismos e possuem propriedades físicas, químicas e estruturais bastante homogêneas. Os polissacarídeos de origem microbiana vêm emergindo como um importante bioproduto para diversos segmentos industriais, inclusive na indústria alimentícia, onde essas macromoléculas podem ser usadas como emulsificantes, estabilizantes, ligantes, agentes gelificantes, coagulantes, lubrificantes, formadores de filme, espessantes e agentes suspensores. Estudos recentes têm mostrado que as bactérias diazotróficas, da família *Rhizobiaceae*, são capazes de utilizar resíduos industriais como fonte de carbono e produzir EPSs, como o glicerol residual oriundo da produção do biodiesel. Por outro lado, a caracterização química associada ao estudo das propriedades reológicas fornecem informações sobre as possíveis aplicações desses polímeros. Este trabalho teve como objetivo caracterizar o EPS produzido pela bactéria diazotrófica *Mesorhizobium loti* Semia 816, a partir de glicerol residual como fonte de carbono, em termos de propriedades reológicas, perfil de textura, sinérese dos géis e capacidade emulsificante. As propriedades foram comparadas com as gomas comerciais xantana e gelana. O cultivo foi realizado em frascos agitados, conduzidos em incubadora rotatória a 30°C e 200 rpm utilizando meio de cultivo com a seguinte composição (g L⁻¹): 12,2 glicerol residual; 0,4 KH₂PO₄; 0,1 K₂HPO₄; 0,2 MgSO₄.7H₂O; 0,1 NaCl; 0,4 extrato de levedura; 0,12 MnCl₂.4H₂O; 0,15 CaCl₂.2H₂O; pH ajustado em 7,0. O EPS foi recuperado por precipitação com etanol 96%, purificado parcialmente por diálise e liofilizado. A solução a 1% m/v do EPS produzido pela bactéria *M. loti* Semia 816, assim como as gomas comerciais xantana e gelana, apresentaram um comportamento não-newtoniano. O ajuste ao modelo de Ostwald-de-Waele, com valores de “n” menores que 1 para todas as gomas, confirmaram o comportamento pseudoplástico. As viscosidades observadas para uma taxa de cisalhamento de 38 s⁻¹ foram de 772 mPa.s, 2895 mPa.s e 570 mPa.s, respectivamente, para xantana, gelana e EPS de *M. loti* Semia 816. A adição de sais aumentou a viscosidade aparente das amostras de xantana e do EPS de *M. loti* Semia 816, independente do sal adicionado, enquanto que para a goma gelana houve redução da viscosidade. O EPS foi capaz de formar emulsões com diferentes óleos vegetais (arroz, soja, girassol, milho e canola), com valores de índice de emulsificação em 24 h superiores a 65%, com destaque para o óleo de soja (84,1%) e girassol (79,02%). Quanto à sua composição, o EPS de *M. loti* Semia 816 apresentou teores de proteínas bem superiores (11,31%) aos encontrados na gelana (3,23%) e xantana (5,04%), enquanto que o teor de ácidos urônicos (3,90%) foi similar ao encontrado para xantana (3,50%). Os teores encontrados para açúcares totais foram 82,54% para o EPS de *M. loti* Semia 816, similar ao da xantana (87,78%), mas diferindo da gelana (91,03%). Os géis de xantana e EPS (1% m/v) demonstraram comportamentos similares quanto aos parâmetros de textura instrumental (dureza, adesividade, elasticidade, coesividade, gomosidade e mastigabilidade), entretanto os géis de gelana (1% m/v) mostraram-se de forma geral mais resistentes. A sinérese dos géis foi baixa, com valores inferiores a 3% após 7 dias de armazenamento. Desta forma, o EPS de *M. loti* Semia 816 mostrou propriedades similares à goma xantana, portanto com potenciais aplicações em diversas áreas, demonstrando poder constituir uma alternativa a produtos já existentes.

Palavras-chaves: biopolímeros, gomas microbianas, bactérias diazotróficas, reologia, emulsões, textura.

CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCED BY *Mesorhizobium loti* SEMIA 816 FROM RESIDUAL GLYCEROL

ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPSs) are produced by a wide variety of microorganisms and have fairly homogeneous physical, chemical and structural properties. Microbial polysaccharides have emerged as an important bioproduct for several industrial segments, including the food industry, where these macromolecules can be used as emulsifiers, stabilizers, binders, gelling agents, coagulants, lubricants, film formers, thickeners and suspending agents. Recent studies have shown that diazotrophic bacteria from the *Rhizobiaceae* family are capable of using industrial wastes as a source of carbon in order to produce EPSs, such as residual glycerol from biodiesel production. On the other hand, the chemical characterization associated with the study of rheological properties provides information about the possible applications of these polymers. This work aimed to characterize the EPS produced by the diazotrophic bacteria *Mesorhizobium loti* Semia 816, from residual glycerol as a carbon source, in terms of rheological properties, texture profile, gel syneresis, emulsifying capacity, as well as chemical composition. The properties were compared with the commercial xanthan and gellan gums. Cultivation was performed in shaken flasks, carried out in a rotary shaker at 30°C and 200 rpm using culture medium with the following composition (g L⁻¹): 12.2 residual glycerol; 0.4 KH₂PO₄; 0.1 K₂HPO₄; 0.2 MgSO₄·7H₂O; 0.1 NaCl; 0.4 yeast extract; 0.12 MnCl₂·4H₂O; 0.15 CaCl₂·2H₂O; pH adjusted to 7.0. EPS was recovered by precipitation with 96% ethanol, partially purified by dialysis and lyophilized. The 1% w/v solution of the EPS produced by *M. loti* Semia 816, as well as the commercial xanthan and gellan gums, presented a non-newtonian behavior. The adjustment to the Ostwald-de-Waele model, with values of “n” lower than 1 for all gums, confirmed the pseudoplastic behavior. The viscosities observed at a shear rate of 38 s⁻¹ were 772 mPa.s, 2895 mPa.s and 570 mPa.s, respectively, for xanthan, gellan and EPS of *M. loti* Semia 816. The addition of salts increased the apparent viscosity of the samples of xanthan and EPS samples of *M. loti* Semia 816, independent of the added salt, whereas for the gellan gum there was a reduction of the viscosity. The EPS was able to form emulsions with different vegetable oils (rice, soybean, sunflower, corn and canola), with values of emulsification index in 24 h above 65%, with emphasis on soybean oil (84.1%) and sunflower oil (79.02%). In relation to its composition, the EPS of *M. loti* Semia 816 had higher protein content (11.31%) than those found in gellan (3.23%) and xanthan (5.04%), whereas the uronic acid content (3.90%) was similar to that found for xanthan (3.50%). The total sugars content was 82.54% for the EPS of *M. loti* Semia 816, similar to xanthan gum (87.78%), but different from gellan gum (91.03%). The gels of xanthan and EPS (1% w/v) showed similar behavior regarding the parameters of instrumental texture (hardness, adhesiveness, elasticity, cohesiveness, gumminess and chewing), however gellan gels (1% w/v) were generally more resistant. The syneresis of the gels was low, with values lower than 3% after 7 days of storage. In this way, the EPS of *M. loti* Semia 816 showed similar properties to xanthan gum, therefore with potential applications in several areas, demonstrating that it could be an alternative to commercial products.

Key words: biopolymers, microbial gums, diazotrophic bacteria, rheology, emulsions, texture.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades e aplicações de alguns EPSs bacterianos	24
Tabela 2 - Propriedades avaliadas na análise instrumental do perfil de textura (TPA).....	32
Tabela 3 - Produção de EPSs por bactérias diazotróficas.....	45
Tabela 4 - Parâmetros reológicos obtidos pela análise das soluções de EPSs, goma xantana e gelana, pela aplicação do modelo da Lei da Potência (Modelo de Ostwald-de-Waele).	49
Tabela 5 - Viscosidade aparente das soluções aquosas e salinas do EPS de <i>M. loti</i> Semia 816 e gomas comerciais xantana e gelana para a taxa de cisalhamento de 38 s^{-1}	53
Tabela 6 - IE_{24} para o EPS sintetizado por <i>M. Loti</i> Semia, comparando com a goma gelana e a goma xantana (comerciais).....	54
Tabela 7 - Teores de açúcares totais, proteínas totais e cinzas dos EPSs em base seca	57
Tabela 8 - Valores médios e desvios-padrão para os parâmetros dureza (DR), adesividade (AD), elasticidade (EL), coesividade (CS), gomosidade (GM) e mastigabilidade (MG), obtidas na análise instrumental do perfil de textura dos géis com adição de goma gelana (G), goma xantana (X) e EPS de <i>M. loti</i> Semia 816 (M) na concentração de 1% m/v.....	59
Tabela 9 - Sinérese (%) dos géis de xantana, gelana e do EPS sintetizado pela bactéria <i>M. loti</i> Semia 816 ao longo do armazenamento.	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de um polímero de gelana.....	23
Figura 2 - Estrutura química de um polímero de xantana.....	23
Figura 3 - Estrutura química de um polímero de levana.....	25
Figura 4 - Reograma representando os comportamentos reológicos em função da velocidade de cisalhamento versus tensão de cisalhamento.	29
Figura 5 - Gráfico típico de análise instrumental do perfil de textura.....	31
Figura 6 - Fluxograma do processo de obtenção do EPS produzido pela bactéria <i>M. loti</i> Semia 816.....	38
Figura 7 - (A) EPS recuperado após 24 h em álcool etílico; (B) EPS liofilizado.....	46
Figura 8 - Variação da viscosidade versus taxa de cisalhamento em solução aquosa (1% m/v) do EPS produzido por <i>M. loti</i> Semia 816 em comparação às duas gomas comerciais.....	47
Figura 9 - Variação da viscosidade versus taxa de cisalhamento em solução aquosa (1% m/v), na presença de KCl 0,1 mol.L ⁻¹ , do EPS produzido por <i>M. loti</i> Semia 816 em comparação as duas gomas comerciais.....	50
Figura 10 - Variação da viscosidade versus taxa de cisalhamento em solução aquosa (1% m/v), na presença de KCl 1 mol.L ⁻¹ , do EPS produzido por <i>M. loti</i> Semia 816 em comparação as duas gomas comerciais.....	51
Figura 11 - Variação da viscosidade versus taxa de cisalhamento em solução aquosa (1% m/v), na presença de NaCl 0,1 mol.L ⁻¹ , do EPS produzido pelo <i>M. loti</i> Semia 816 em comparação as duas gomas comerciais.....	51
Figura 12 - Variação da viscosidade versus taxa de cisalhamento em solução aquosa (1% m/v), na presença de NaCl 1 mol.L ⁻¹ , do EPS produzido pelo <i>M. loti</i> Semia 816 em comparação as duas gomas comerciais.....	52
Figura 13 - (A) Gel proveniente da goma gelana; (B) Gel proveniente do EPS de <i>M. loti</i> Semia 816; (C) Gel proveniente da goma xantana	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 GLICEROL.....	19
3.2 EXOPOLISSACARÍDEOS	20
3.2.1 Gelana.....	22
3.2.2 Xantana.....	23
3.2.3 Levana.....	25
3.3 EPSs PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DA FAMÍLIA Rhizobiaceae.....	Erro! Indicador não definido.
3.4 PROPRIEDADES REOLÓGICAS DOS EPSs BACTERIANOS	28
3.5 FORMAÇÃO DE GÉIS COM EPSs	30
3.6 FORMAÇÃO DE EMULSÕES COM EPSs.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 MATERIAL.....	37
4.1.1 Micro-organismo	37
4.1.2 Glicerol residual	37
4.1.3 Outros materiais.....	37
4.2 MÉTODOS.....	37
4.2.1 Manutenção da cultura	39
4.2.2 Inóculo e condições de cultivo	39
4.2.3 Cultivos em frascos agitados	39
4.2.4 Recuperação do EPS	39
4.2.5 Solubilização das amostras	40
4.2.6 Determinação da viscosidade	40
4.2.6.1 Análise reológica	40
4.2.7 Efeito da adição de sais na viscosidade	41
4.2.8 Índice de emulsificação (IE₂₄)	41
4.2.9 Caracterização química	41
4.2.9.1 Açúcares totais.....	42
4.2.9.2 Proteínas Totais	42
4.2.9.3 Ácidos urônicos	42

4.2.9.4 Umidade	42
4.2.9.5 Cinzas.....	43
4.2.10 Perfil de textura instrumental dos géis formados	43
4.2.11 Sinérese dos géis com adição dos biopolímeros microbianos.....	43
4.2.12 Análise estatística dos resultados	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DO EPS	45
5.2 DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE	46
5.3 EFEITO DA ADIÇÃO DE SAIS NA VISCOSIDADE	50
5.4 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (IE ₂₄)	54
5.5 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EPSs.....	56
5.6 PERFIL DE TEXTURA INSTRUMENTAL DOS GÉIS FORMADOS.....	58
5.6.1 Dureza	59
5.6.2 Adesividade.....	60
5.6.3 Elasticidade.....	60
5.6.4 Coesividade	61
5.6.5 Gomosidade	61
5.6.6 Mastigabilidade	62
5.7 SINÉRESE DOS GÉIS COM ADIÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS.....	62
6 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APENDICE.....	81

1 INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPSs) são produzidos por uma grande variedade de micro-organismos, sendo sintetizados por fungos, leveduras e várias classes de bactérias. São definidos como gomas hidrossolúveis ou biopolímeros que possuem propriedades físicas, estruturais e químicas diferentes (CANUTO, 2006; FREITAS; ALVES; REIS, 2011; HUSSAIN et al., 2016). Esses polissacarídeos são conhecidos como gomas devido à sua capacidade de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso, mesmo quando aplicados em baixas concentrações. Um grande número desses polissacarídeos está sendo estudado, mas relativamente poucos são comerciais (CASTELLANE; LEMOS 2007; HUSSAIN et al., 2016). Quatro polissacarídeos bacterianos são aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) para uso alimentar. Dentre esses se encontram a goma gelana (produzido pela bactéria *Sphingomonas paucimobilis*), curdulana (produzida pela bactéria *Alcaligenes faecalis* var. *mixogenes*), xantana (produzida por bactérias do gênero *Xanthomonas*) e a dextrana (produzidos por bactérias pertencentes à família *Lactobacillaceae*) (MONTEIRO, 2011).

Diversos outros micro-organismos são capazes de sintetizar e secretar polissacarídeos, os quais são produzidos durante o crescimento microbiano. Dentre eles estão as bactérias diazotróficas da família *Rhizobiaceae*, constituída pelos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, que nos últimos anos vem sendo investigadas por produzirem quantidades consideráveis de EPSs (FRIZZO, 2007; MONTEIRO et al., 2012; RIBEIRO, 2015; RIBEIRO; BURKERT, 2016).

Os polissacarídeos de origem microbiana têm despertado crescente interesse, visto que, em comparação às outras fontes, apresentam vantagens como: produção independente de fatores climáticos e necessidade de espaço relativamente pequeno, possibilidade do uso de diferentes matérias-primas e menor variação da qualidade, ou seja, das propriedades físico-químicas e maior rapidez na obtenção do produto acabado (FARIA, 2002; FREITAS, ALVES; REIS, 2011; OLIVEIRA, 2010; SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

A maioria dos processos de produção emprega preferencialmente glicose e sacarose como fontes de carbono na elaboração dos meios de produção. Porém, o emprego de matérias-primas alternativas de baixo custo, tais como subprodutos ou rejeitos agroindustriais, pode não só reduzir custos do processo, como também minimizar os problemas ambientais (OLIVEIRA, 2010). No caso de bactérias diazotróficas, subprodutos e resíduos agroindustriais têm sido utilizados como substratos, como, por exemplo, o glicerol residual (RIBEIRO, 2015),

hidrolisado de farelo de arroz (DEVI; VIJAYENDRA; SHAMALA, 2012) e soro de leite (ZHOU et al., 2014).

Conforme pesquisas desenvolvidas nos últimos anos, o glicerol possui como componente principal carbono de fácil assimilação, sendo que no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG seu emprego vem sendo estudado no cultivo de micro-organismos visando à obtenção de produtos de interesse comercial, tais como biossurfactantes (ROSA et al., 2010; ROSA et al., 2015), proteínas (SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2013), lipídios (MACHADO JR. et al., 2015; SPIER; BUFFON; BURKERT, 2015), carotenoides (RIOS et al., 2015; SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2016) e EPSs (RIBEIRO, 2015; TRINDADE; MUNHOZ; BURKERT, 2015). O glicerol residual é um subproduto da produção do biodiesel, sendo que cada 100 kg de biodiesel produzido gera cerca de 10 kg de glicerol residual (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

Os EPSs de bactérias fixadoras de nitrogênio, os rizóbios, são possíveis biopolímeros para aplicações industriais. A possibilidade de aplicação desses compostos na saúde humana, assim como em outras áreas, como alimentícia, farmacêutica, petrolífera e cosmética, tem levado a intensivos estudos relacionados à sua obtenção e caracterização. O estabelecimento das condições de cultivo, a determinação das características físico-químicas e a sua estrutura química, bem como o comportamento reológico, são essenciais para permitir a sua utilização (RIBEIRO; BURKERT, 2016).

A maioria das aplicações dos polissacarídeos na indústria alimentícia está associada à capacidade que eles possuem de alterar, drasticamente, as suas propriedades físicas, podendo resultar soluções de alta viscosidade ou criando redes intermoleculares coesivas. Nesses casos, o conhecimento do comportamento reológico destas soluções é fundamental (MARCOTTE; TAHERIAN; RAMASWAMY, 2001). Também podem apresentar a capacidade de formar e estabilizar emulsões com compostos de natureza hidrofóbica (OZTURKL; MCCLEMENTS, 2016). Além disso, os polissacarídeos microbianos tendem a ser relativamente estáveis a mudanças no pH, força iônica, temperatura e concentrações salinas (NITSCHKE; COSTA, 2007; OZTURKL; MCCLEMENTS, 2016; YADAV; RAHI; SONI, 2014).

Visando esse mercado crescente, nos últimos anos foram realizados diferentes estudos para o desenvolvimento de novos EPSs com o uso de fontes de carbono renováveis na fase de produção, buscando características reológicas melhoradas e outras propriedades de interesse. Desta forma, propõe-se um estudo a fim de conhecer e compreender as propriedades do EPS sintetizado pela bactéria *Mesorhizobium loti* Semia 816 em meio à base de glicerol residual, que foi primeiramente investigado por Ribeiro (2015).

Desta forma, esta dissertação tem como objetivo principal caracterizar o EPS produzido pela bactéria diazotrófica *M. loti* Semia 816, em termos de propriedades reológicas, perfil de textura instrumental, capacidade emulsificante, bem como composição química.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o EPS produzido pela bactéria diazotrófica *Mesorhizobium loti* Semia 816, em termos de propriedades reológicas, perfil de textura dos géis formados e capacidade emulsificante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir o EPS a partir da bactéria *M. loti* Semia 816 utilizando como fonte de carbono glicerol residual;
- Caracterizar o EPS produzido, quanto à sua composição química (proteínas, ácidos urônicos, carboidratos totais e cinzas);
- Verificar o comportamento reológico das soluções aquosas e o efeito da adição de sais na viscosidade;
- Determinar o índice de emulsificação na presença de diferentes óleos vegetais comerciais;
- Avaliar as propriedades de textura do gel de EPS comparando-o com as gomas comerciais xantana e gelana, bem como avaliar a sinérese destes géis.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 GLICEROL

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

O glicerol residual resultante da síntese do biodiesel usualmente apresenta de 55-90% de glicerol (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009). Possui baixo valor agregado, já que contém resíduos de metanol, triacilgliceróis não convertidos, hidróxido de sódio, ácidos graxos livres, sais de ácido graxo, ésteres, compostos de enxofre, minerais e proteínas (AMARAL et al., 2009; RAMOS, 2011). O rápido crescimento na produção do biodiesel e a obrigatoriedade de adição ao diesel no Brasil já resultam na acumulação de grandes quantidades de glicerol residual (CHATZIFRAGKOU et al., 2011).

Para ser usado em indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos, deve passar por um processo de purificação, sendo o seu uso condicionado ao seu grau de pureza, que deve estar usualmente acima de 95% (FERREIRA, 2009), o qual não é viável, pois é um processo de alto custo. Sendo assim, a utilização deste, na forma impura, sem tratamentos, em processos biotecnológicos, pode constituir uma ótima alternativa de aproveitamento, pois contém em sua composição fonte de carbono de fácil assimilação pelos micro-organismos (RAMOS, 2011), agregando valor a este coproduto, além de diminuir os custos do processo (FREITAS et al., 2010).

Spier, Buffon e Burkert (2015) estudaram 12 diferentes cepas de leveduras para avaliar a sua capacidade de acumular lipídios usando glicerol residual como fonte de carbono, evidenciando que este pode ser uma alternativa sustentável e renovável. As leveduras selecionadas apresentaram composição de ácidos graxos similares aos óleos vegetais utilizados na síntese de biodiesel.

Outro estudo, onde se investigou a possibilidade de usar o glicerol residual como principal substrato para a produção de biomassa de levedura como uma fonte de proteínas, foi conduzido por Santos et al. (2013), no qual a substituição de glicerol puro por glicerol residual não apresentou impacto sobre o teor de proteína e a produção de biomassa, indicando que é possível utilizar o glicerol sem purificação prévia.

Sousa et al. (2014) realizaram um estudo utilizando *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e glicerol como fonte de carbono, na produção de compostos tenso-ativos biológicos. O composto produzido por este micro-organismo foi capaz de emulsionar n-hexadecano e óleo de soja.

Machado et al. (2015) estudaram a produção de biomassa por *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 em diferentes condições de aeração e agitação, com o objetivo de obter lipídios, utilizando um meio à base de glicerol residual. Foi possível obter 19,14 g L⁻¹ de biomassa com um teor lipídico de 7,87%, e em relação ao perfil de ácidos graxos poli-insaturados, o ácido linoleico foi predominante, com 49,16%. Portanto, esta levedura poderia constituir uma alternativa sustentável e renovável de fonte de ácidos graxos essenciais, usada, por exemplo, em formulações de alimentos para animais.

Ribeiro (2015) avaliou dez bactérias diazotróficas produtoras de EPSs a fim de selecionar a linhagem bacteriana com o maior potencial de excretar EPSs usando o glicerol residual como fonte de carbono. *M. loti* Semia 816 alcançou a concentração máxima de biomassa (1,89 ± 0,12 g L⁻¹) e produção máxima de EPS (4,90 ± 0,21 g L⁻¹) em 96 h de cultivo.

3.2 EXOPOLISSACARÍDEOS

Há na natureza plantas e micro-organismos que secretam polissacarídeos, denominados exopolissacarídeos (EPS). As gomas naturais, por exemplo, são polissacarídeos obtidos de exsudados de troncos de árvore, sementes, algas ou por cultivo microbiano. Esses polímeros podem ser classificados como homopolissacarídeos (normalmente polímeros compostos de D-glicose) e heteropolissacarídeos (unidades repetidas e alinhadas desde dissacarídeos até octassacarídeos), compostos de dois a quatro tipos de monossacarídeos diferentes e muitos contendo grupos acetila e piruvato (ARANDA-SELVERIO et al., 2010; SUTHERLAND, 2001). Heteropolissacarídeos são constituídos por vários tipos de monossacarídeos, como gelana ou xantana, e são, em sua grande maioria, polianiônicos, devido à presença de ácidos urônicos que compõem a maioria dos EPSs bacterianos. 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), facilitando sua recuperação (ARANDA-SELVERIO et al., 2010; CANILHA et al., 2006; DONOT et al., 2012; KUMAR et al., 2004; SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

Os EPSs são produzidos por uma grande variedade de micro-organismos, são definidos como gomas hidrossolúveis ou biopolímeros que possuem propriedades físicas, estruturais e químicas diferentes. Dentre esses biopolímeros destacam-se: goma gelana (produzido pela bactéria *Sphingomonas paucimobilis*, antes conhecida como *Pseudomonas elodea*), curdulana (produzida pela bactéria *Alcaligenes faecalis* var. *mixogenes*), xantana

(produzida por bactérias do gênero *Xanthomonas*) (CANUTO, 2006; FREITAS et al., 2011). Estes foram descobertos depois de um trabalho pioneiro de um grupo de cientistas dos Estados Unidos, em meados dos anos 50 (CANUTO, 2006).

Devido a essa ampla diversidade em estruturas e propriedades físicas, os polissacarídeos microbianos possuem muitas aplicações em indústrias de alimentos, farmacêutica, petrolífera, cosmética, têxtil, de tintas, produtos agrícolas, entre outras. Dependendo de sua estrutura química, algumas aplicações podem incluir seu uso como emulsificantes, estabilizantes, ligantes, agentes gelificantes, coagulantes, lubrificantes, formadores de filmes, espessantes e agentes suspensores (ACHAYUTHAKA; SUPHANTHARIKA; RAO, 2006; BAJAJ et al., 2006; CANUTO, 2006; FARIA et al., 2011; LOPES; ANDRADE, 1995; LOPES; ANDRADE; MANO, 1991; PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011; SILVA et al., 2009).

As gomas microbianas podem ser produzidas pelo cultivo em meio líquido na presença de micro-organismos, contendo uma fonte de carbono renovável, geralmente um carboidrato derivado da cana-de-açúcar, milho, batata, trigo ou beterraba (ACHAYUTHAKA; SUPHANTHARIKA; RAO, 2006; FARIA et al., 2011); um óleo vegetal extraído de soja, girassol, palma ou outra planta oleaginosa (PRADELLA, 2006); ou até mesmo resíduos como o soro de leite (PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011) e soro de queijo (SILVA et al., 2009), juntamente com sais minerais. Além disso, há estudos em que podem ser produzidos através de via enzimática (MOREIRA; DEL PINTO; VENDRUSCOLO, 2003) e com bactérias Gram-negativas, as quais têm sido apontadas como as mais eficientes em produzir polissacarídeos extracelulares (SANDFORD, 1979; SILVA et al., 2009).

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

Devido à grande diversidade de suas propriedades reológicas e estruturais a produção de EPSs de origem microbiana vem emergindo como uma importante fonte de matéria-prima para diversos segmentos industriais, pois fazem parte de uma classe de polímeros solúveis em água que possuem diversas aplicações, inclusive na indústria alimentícia, onde essas macromoléculas podem ser usadas *in natura* como aditivos seguros. Suas propriedades e características funcionais estão relacionadas à capacidade de espessar, de manter partículas em suspensão e reter água (BAJAJ et al., 2006; CANUTO, 2006; MONTEIRO et al., 2012; SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

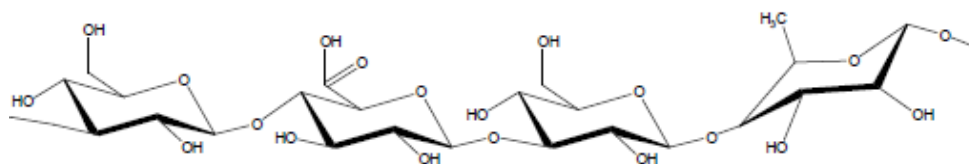
Os EPSs mais estudados são os de origem microbiana, devido algumas vantagens de obtenção em relação às outras gomas, visto que são independentes das condições climáticas e são produzidos em condições controladas. Há a possibilidade de utilização de matérias-primas regionais e até mesmo resíduos industriais, 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 micro-organismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de cultivo, como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo de cultivo e composição do meio (FARIA, 2002; FREITAS; ALVES; REIS, 2011; OLIVEIRA, 2010; SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

Para que se tenha uma produção de EPSs eficiente deve-se considerar desde a escolha adequada do micro-organismo até a determinação dos parâmetros de cultivo, onde se destaca o meio de cultura e sua influência na síntese, no rendimento e na composição dos EPSs (FARIA, 2002; VETTORI; FRANCHETTI; CONTIERO, 2012). Nos últimos anos sucederam-se descobertas de polissacarídeos produzidos por micro-organismos, a maioria dos quais por bactérias. A Tabela 1 apresenta alguns biopolímeros microbianos, indicando a fonte de carbono, micro-organismo produtor e suas respectivas propriedades e aplicações.

Bactérias gram-negativas e gram-positivas são conhecidas como produtoras de EPS (KUMAR, MODY e JHA, 2007). Algumas vêm sendo estudadas e outras já são produzidos comercialmente, tais como gelana, xantana e levana (MONTEIRO, 2011).

3.2.1 Gelana

Produzida pela bactéria *Sphingomonas*, constituída por unidades de glicose, ácido glicurônico e L-ramnose nas relações molares de 2:1:1, respectivamente, como mostrado na Figura 1. Foi produzida em laboratório pela primeira vez em 1978 nos Estados Unidos e liberada para uso, em alimentos, no Japão, em 1988. Em 1992 foi aprovado pela FDA – *Food and Drug Administration* como aditivo alimentar (BAJAJ et al., 2006; MONTEIRO, 2011). Segundo Triveni, Shamala e Rastogi (2001) a goma gelana produzida pela bactéria *Sphingomonas paucimobilis* pode ser usada em menor concentração na presença de alguns cátions para produzir um gel transparente e termorreversível. Foi, inicialmente, comercializada pela empresa norte-americana Kelco, sendo oferecida como um substituto do ágar.

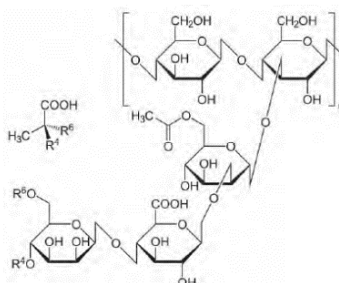
Figura 1 - Estrutura química de um polímero de gelana

Fonte: MONTEIRO (2011).

3.2.2 Xantana

A xantana é um heteropolissacarídeo constituído por unidades de glicose, manose e ácido glicurônico na proporção de 2:2:1 (Figura 2), com pequenas quantidades de O-acetil e resíduos de piruvato (KUMAR; MODY; JHA, 2007). A cadeia principal do polímero é formada por dímeros de unidades D-glicopiranosídicas unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, sendo uma das unidades 3-O-substituída pelo trissacarídeo β -D-manose-(1,4)- β -D-ácido glicurônico-(1,2)- α -D-manose. A unidade terminal não redutora da ramificação pode ser O-substituída em 4 e 6 por um grupo piruvato enquanto a manose, ligada à cadeia principal, pode apresentar-se acetilada em O-6. Os teores destes substituintes podem variar de 30 a 40% para o piruvato e de 60 a 70% para a acetila, entre as gomas produzidas pelas diferentes espécies do gênero *Xanthomonas* (COVIELLO, 2007).

Os substituintes, presentes na ramificação, influenciam diretamente na formação e estabilização de uma estrutura, portanto, na viscosidade (KUMAR; MODY; JHA, 2007). A massa molecular de um biopolímero de xantana pode variar de 2 a 12×10^6 Da (ROLLER; DEA, 1992; KATZBAUER, 1998).

Figura 2 - Estrutura química de um polímero de xantana

Fonte: MONTEIRO (2011).

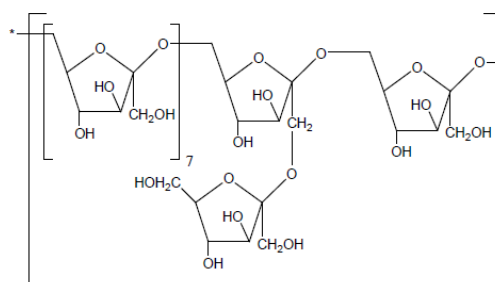
Tabela 1 - Propriedades e aplicações de alguns EPSs bacterianos.

Micro-organismo	EPS	Fontes de carbono	Propriedades	Aplicações	Referências
<i>Xanthomonas campestris</i>	Xantana	- Caldo de cana de açúcar - Sacarose - Soro de leite - Soro de queijo	-Viscosidade alta em baixas concentrações -Estabilidade em concentrações salinas (150 g L ⁻¹ de NaCl) -Eficiência em elevadas temperaturas (até 90°C) e níveis de pH (2-11) -Estabilidade em ampla faixa de concentrações salinas (NaCl, CaCl ₂ e KCl)	-Indústria de alimentos e farmacêutica -Petróleo -Cosméticos -Agricultura -Indústria de tintas	FARIA et al. (2011) PALANIRAJ; JAYARAMAN (2011) MESOMO et al. (2009) SILVA et al. (2009) ACHAYUTHAKA; SUPHANTHARIKA; RAO (2006)
		-Glicose - Sacarose -Lactose -Maltose - Melaço -Amido solúvel	-Viscosidade intrínseca em água a 25°C; -Gel termo-reversível -Agente de alta viscosidade e gelificação -Estabilidade em pH 2-10 -Maleabilidade -Forma géis em concentrações baixas (<0,1%)	-Substituto de ágar em meios microbianos -Aplicação em alimentos congelados, geleias, iogurtes - Alimentos para animais -Indústria farmacêutica	BAJAJ et al. (2006) FREITAS; ALVES; REIS (2011) PRADELLA (2006)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Levana	- Caldo de cana de açúcar -Glicose -Sacarose	- Alta solubilidade em água -Capacidade de formar filme - Atividade antitumoral e inflamatória -Baixa viscosidade	- Alimentos (prebióticos) - Cosméticos -Medicina	ERNANDES; CRUZ (2011) FREITAS; ALVES; REIS (2011)

3.2.3 Levana

A goma levana é sintetizada por várias espécies de bactérias como *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis*. É considerada subproduto do processo de fermentação para produção de etanol, responsável pela elevação da viscosidade do xarope de cana-de-açúcar. É considerada um polímero atóxico e biologicamente ativo constituído de unidades β -D-frutofuranosídicas unidas por ligações (2 \rightarrow 6) com uma ramificação β (2 \rightarrow 1) a cada nove unidades da cadeia principal (Figura 3). Na indústria de alimentos é utilizada como estabilizante, emulsificante e agente encapsulante. A alta solubilidade e a baixa viscosidade das soluções aquosas de levana, quando comparada com outras gomas, a colocam como uma possível substituta da goma arábica (BAE et al., 2008; MELO et al., 2008; SHIH; CHEN; WUB, 2010).

Figura 3 - Estrutura química de um polímero de levana



Fonte: MONTEIRO (2011).

3.3 EPSs PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DA FAMÍLIA Rhizobiaceae

Diversos micro-organismos são capazes de sintetizar e secretar polissacarídeos como compostos solúveis ou insolúveis em meio aquoso (KUMAR; MODY; JHA, 2007). São produzidos durante o crescimento de vários gêneros de bactérias (CANUTO, 2006). Dentre eles estão os correspondentes às bactérias diazotróficas, que são responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio, convertendo o nitrogênio molecular atmosférico (N_2) em íon amônio (NH_4^+) ou aminoácidos. As bactérias diazotróficas da família Rhizobiaceae são constituídas pelos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (CASTELLANE, 2011; FRIZZO, 2007; MONTEIRO et al., 2012).

Os rizóbios são bactérias do solo que são capazes de estabelecer uma simbiose fixadora de nitrogênio com plantas da família das leguminosas (PROMÉ et al., 2002) e são investigadas por produzirem quantidades consideráveis de EPSs (CASTELLANE, 2011;

CASTELLANE; LEMOS, 2007; MONTEIRO et al., 2012; RIBEIRO, 2015). Dentre os polissacarídeos secretados encontra-se desde simples glicanas até complexos heteropolímeros (MONTEIRO, 2011). Na literatura, consta que esses polímeros são constituídos por D-glicose, D-galactose, e também foram detectados traços de manose e ácido D-glicurônico, podendo apresentar piruvato, geralmente ligado aos resíduos terminais das ramificações, e grupos *O*-acetil (CASTELLANE, 2011; CASTELLANE; LEMOS, 2007). Não há um produto comercial a partir desses polissacarídeos, apenas há informações de produção de EPSs com o nome de succinoglicanas e galactoglicanas (CASTELLANE; LEMOS, 2007; SUTHERLAND, 2001; YOUNES et al., 2000).

Estudos realizados em camundongos mostraram que o polissacarídeo produzido pela bactéria *Rhizobium* sp. N613 possuía atividade antitumoral (ZHAO et al., 2010). Ding e colaboradores (2014) extraíram um EPS obtido a partir de *Rhizobium* sp. N613 (REPS) modificado por selênio, usando cloreto de bário como catalisador, verificando que a bactéria possuía atividade antitumoral. Os polissacarídeos ácidos são os mais investigados por apresentarem propriedades reológicas e farmacológicas diferenciadas, o que desperta o interesse das indústrias alimentícia e farmacêutica (MONTEIRO et al., 2012).

A composição química de um número considerável de EPSs rizobianos já foi determinada (CASTELLANE, 2011; CASTELLANE; LEMOS, 2007; CASTELLANE; LEMOS, 2016; CASTELLANE et al., 2017; KACI et al., 2005; KARR et al., 2000, RIBEIRO, 2015). A estrutura, composição, biossíntese e propriedades funcionais dos polissacarídeos extracelulares podem variar dependendo da cepa utilizada, do substrato e das condições de produção (FREITAS; ALVES; REIS, 2011; SILVA et al., 2009). As características físico-químicas dependem da sequência em que os açúcares estão dispostos na molécula, da forma como as cadeias se entrelaçam e da presença de resíduos iônicos (ARANDA-SELVERIO et al., 2010; KUMAR et al., 2004). A solubilidade desses 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 (ARANDA-SELVERIO et al., 2010; DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004).

Monteiro e colaboradores (2012) realizaram alguns estudos reológicos com soluções de EPSs produzidos pelas bactérias *Rhizobium tropici* (diferentes cepas) e *Mesorhizobium* sp. e verificaram que essas soluções apresentaram comportamento de fluxo e viscosidade distintas, sendo, provavelmente, a composição química desses compostos responsável por essas diferenças.

Kaci et al. (2005) isolaram e identificaram um EPS produzido por uma cepa de *Rhizobium*, de solos áridos no sul da Argélia, como um polímero formado por glicose, galactose e ácido manurônico na proporção molar de 2:1:1. Análises reológicas mostraram que as soluções do EPS tinham comportamento de fluido pseudoplástico, o qual pode ser utilizado como agente espessante, com propriedades polieletrólíticas.

A diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de deformação e temperatura é uma característica comum dos biopolímeros bacterianos (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014; MORAES et al., 2011). Segundo Beyer, Meldon e Kennedy (1987), soluções a 1% m/v do EPS produzido por *Rhizobium* CB744, quando submetidas à temperatura de 65°C e elevadas taxas de deformação, apresentaram decréscimo da viscosidade. Outro estudo foi realizado com *Rhizobium radiobacter* S10 isolado a partir de Kefir, investigando suas propriedades químicas e reológicas. O rendimento em EPS chegou a 2.834,2 mg L⁻¹, e as soluções de EPS com 0,1% e 1,0% m/v apresentaram pseudoplasticidade. Géis fracos foram obtidos com concentrações de EPS de 0,75% à temperatura ambiente (25°C), indicando que o aquecimento e o resfriamento não influenciaram na capacidade de gelificação (ZHOU et al., 2014).

Ribeiro (2015) avaliou o potencial de produção de EPSs com bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* cultivadas em meio contendo o glicerol residual como fonte de carbono, sendo que três destacaram-se como produtoras de EPSs: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Semia 344, *Mesorhizobium loti* Semia 816 e *Mesorhizobium huakuii* Semia 4779, obtendo 2,32±0,44 g L⁻¹, 4,90±0,21 g L⁻¹ e 1,75±0,14 g L⁻¹, respectivamente. Os EPSs apresentaram uma composição em monossacarídeos similar entre si, compostos por glicose, galactose e manose, e em relação aos grupos funcionais presentes também se apresentaram similares. O comportamento térmico dos EPSs, avaliado a partir de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA), foi similar ao das gomas comerciais gelana e xantana.

Castellane e colaboradores (2017) estudaram a produção de EPSs por cepas de *Rhizobium tropici* (Semia 4080 e MUTZC3) com o objetivo de analisar as estruturas e determinar algumas das propriedades físico-químicas. Ambos foram cultivados utilizando o meio PSYL (sacarose) com ou sem adição de óleo diesel. A adição de óleo diesel (0,1% v/v) no meio de cultura resultou em índices de emulsificação superiores, constituindo uma alternativa de produto biotecnológico interessante para a indústria petrolífera.

3.4 PROPRIEDADES REOLÓGICAS DOS EPSs BACTERIANOS

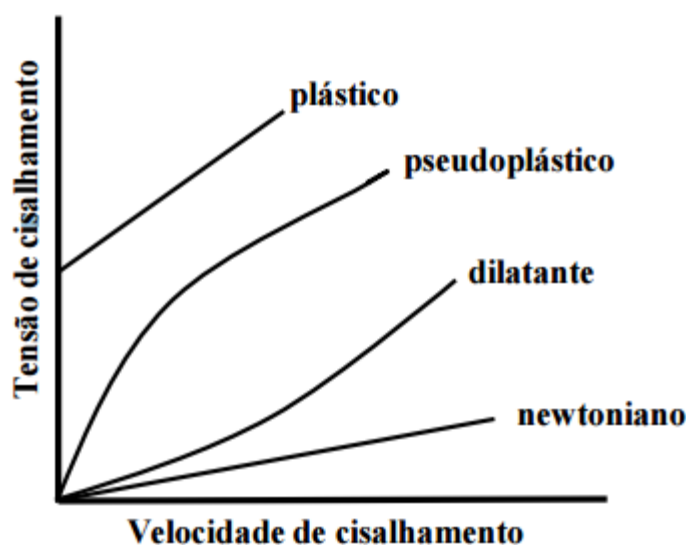
O primeiro passo para a compreensão das propriedades e aplicações destes polímeros bacterianos é a determinação da estrutura química (TONELI; MURR; PARK, 2005), mesmo assim são poucas as informações estruturais disponíveis na literatura sobre os diversos tipos de EPSs bacterianos (KAMBOUROVA et al., 2009). A caracterização dos EPSs microbianos é importante na definição da aplicação desses biopolímeros. A avaliação reológica destaca-se por fornecer informações a respeito das possíveis aplicações biotecnológicas desses polissacarídeos (KACI et al., 2005). Além disso, as medidas reológicas possibilitam a caracterização de polímeros em soluções e géis, fornecendo dados importantes para o desenvolvimento de processos tecnológicos, controle de qualidade das matérias-primas e produtos finais (TOSIN, 2008).

A reologia ou ciência do fluxo é o estudo da deformação e do escoamento da matéria. A deformação ocorre na matéria sólida e o escoamento na matéria líquida. A propriedade reológica de interesse no caso dos sólidos é a sua elasticidade, e nos líquidos é a viscosidade, que pode ser interpretada como a resistência que um fluido oferece para escoar ou também como medida da fricção interna de um fluido (CANUTO, 2006; PASQUEL, 1999; ROTTAVA, 2005). Viscosidade é a capacidade do fluido de resistir ao escoamento, sendo que tal resistência é causada pelo atrito interno das partículas (RAMOS, 2011).

Os fluidos são divididos em duas categorias: newtonianos e não-newtonianos. O fluido newtoniano caracteriza-se pela viscosidade constante, independentemente da velocidade que se aplica no cisalhamento. O fluido não-newtoniano apresenta uma mudança na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. Estes valores de viscosidade são considerados como viscosidade aparente, definida como razão entre a tensão de cisalhamento medida e a taxa de cisalhamento (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000). Nos sistemas não-newtonianos, a extensão das interações entre as partículas é a principal responsável pela complexidade do comportamento reológico das preparações. Desta forma, os fluidos podem assumir vários comportamentos, tais como: plástico, pseudoplástico ou dilatante. Na Figura 4 pode ser visualizado um reograma representando os comportamentos.

Fluidos que não necessitam de tensão de cisalhamento inicial para escoar são representados pelo modelo mais comum que é descrito pela lei de potência ou equação de Ostwald-de-Waele, classificando-se em pseudoplásticos ($n > 1$) e dilatantes ($n < 1$) (BERWANDER, 2005).

Figura 4 - Reograma representando os comportamentos reológicos em função da velocidade de cisalhamento versus tensão de cisalhamento.



Fonte: AULTON (2005).

A viscosidade pode fornecer importantes informações a respeito das mudanças fundamentais na estrutura do fluido durante um determinado processo, como polimerização, emulsificação e homogeneização. Do ponto de vista industrial, a pseudoplasticidade, a viscoelasticidade e a tensão residual elevada constituem propriedades reológicas interessantes das soluções de biopolímeros bacterianos (SUTHERLAND, 2001). Dos parâmetros que interferem na viscosidade dos polímeros, pode-se citar o tipo de estrutura molecular e a concentração de polímero (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004; SUTHERLAND, 2001).

As propriedades reológicas das soluções oriundas de um polímero bacteriano são dependentes de sua massa molar, estrutura molecular e dos grupos acetil ou piruvato (ROTTAVA, 2005). Outro fator importante quando se fala em viscosidade é a temperatura, sendo, portanto, importante controlá-la durante as determinações experimentais. Em geral, os líquidos têm sua viscosidade diminuída com o aumento da temperatura (BERWANGER, 2005). Alguns pesquisadores ainda relatam que o aumento das ramificações aumenta a viscosidade (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004).

A maioria das aplicações dos hidrocoloides na indústria alimentícia está associada à capacidade que eles possuem de alterar, drasticamente, as suas propriedades físicas, podendo resultar soluções de alta viscosidade ou criando redes intermoleculares coesivas. Nesses casos, o conhecimento do comportamento reológico destas soluções é fundamental, na avaliação e na

modelagem de processos. Além disso, as propriedades reológicas são um indicador da qualidade do produto e desempenham papel fundamental na análise das condições dos processos aplicados nos alimentos, como pasteurização, evaporação e secagem (MARCOTTE; TAHERIAN; RAMASWAMY, 2001).

Segundo Miles et al. (1985), a viscosidade aumenta em altas concentrações de polímero ou quando é adicionada uma larga quantidade de sais. Este efeito ocorre provavelmente pelas interações entre as moléculas de polímero. Diaz (2002) estudou a adição de cloreto de potássio e de sódio em soluções de xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv pruni 24, verificando que a maior viscosidade aparente apresentada pela solução foi com a adição de cloreto de potássio na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Aranda-Selverio (2009) efetuou um estudo comparativo da viscosidade das soluções aquosa com e sem adição de $0,2 \text{ M}$ de NaCl, para cada um dos biopolímeros de *Rhizobium* e *Mesorhizobium*, nas concentrações de 5 g L^{-1} , escolhendo as taxas de deformação de 10 , 50 e 100 s^{-1} . Os resultados mostraram que maiores valores de viscosidade foram encontrados em baixas taxas de deformação (10 s^{-1}). Dois EPSs, R1 e R2, solubilizados em solução aquosa de NaCl ($0,2 \text{ M}$) apresentaram maior viscosidade quando comparados com os EPSs sem adição de sais.

3.5 FORMAÇÃO DE GÉIS COM EPSs

As propriedades de textura estão intensamente relacionadas à deformação, desintegração e ao escoamento do alimento sobre aplicações de um dado sistema de forças. São definidas como medidas pelas funções de tempo, força, massa e distância (COSTA, 2015; GEISE, 1995).

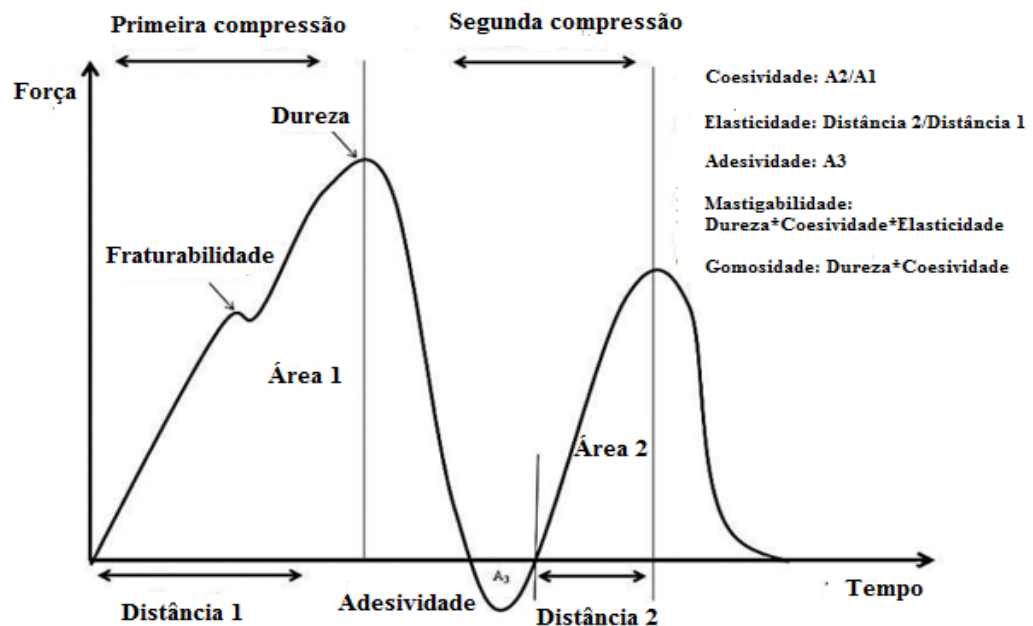
A maioria dos hidrocoloides espessa e confere viscosidade às dispersões aquosas, porém alguns destes também possuem outra propriedade, o poder de formar géis. A formação de gel é um fenômeno envolvendo a associação ou a reticulação das cadeias do polímero para formar uma rede tridimensional que aprisiona ou imobiliza a água dentro dela, formando uma estrutura rígida que é resistente ao fluxo. Em outras palavras, torna-se viscoelástico, exibindo ambas as características de um líquido e um sólido. As propriedades de textura dos géis, por exemplo, elásticos ou quebradiços, longos ou extensíveis, mastigáveis ou cremosos, variam amplamente com o tipo de hidrocoloide utilizado. As outras propriedades sensoriais, como opacidade e sensação pegajosa na boca, também dependem do hidrocoloide empregado. Os hidrocoloides que são comumente usados como espessantes são: amido, xantana, goma guar, goma de alfarroba, goma karaya, goma arábica e derivados de celulose. Os hidrocoloides do

tipo gelificante são: alginato, pectina, carragenana, gelatina e ágar (SAHA; BHATTACHARYA, 2010).

Entre os métodos para a avaliação da textura instrumental em alimentos destaca-se a análise instrumental do perfil de textura (TPA), onde é possível gerar um gráfico de força x tempo (Figura 5). Entendendo que os parâmetros de textura são bastante importantes para géis em geral, é interessante verificar seu comportamento em relação a diferentes sistemas. As propriedades avaliadas na análise instrumental do perfil e textura (TPA) são apresentadas detalhadamente na Tabela 2.

No caso específico para géis de amido as propriedades mecânicas de textura dos géis dependem de fatores como: constituintes do amido, volume e deformação dos grânulos, da interação entre as fases contínuas e dispersas e retrogradação do gel em associação com a sinérese (COSTA, 2015; CHOI; KERR, 2003; YAMIN et al., 1999).

Figura 5 - Gráfico típico de análise instrumental do perfil de textura



Fonte: Adaptado de HLEAP; VELASCO (2010).

Tabela 2 - Propriedades avaliadas na análise instrumental do perfil de textura (TPA).

Propriedade	Definição física	Definição sensorial
Dureza	É a força necessária para deformar o produto em uma determinada distância.	Força requerida para compressão do alimento entre os dentes molares.
Elasticidade	Forma com que o produto retorna à sua condição inicial depois de ter sido deformado durante a primeira compressão.	Grau para o qual um produto volta à sua forma original, depois da compressão com os dentes.
Adesividade	Trabalho necessário para puxar o êmbolo de compressão fora da amostra.	Força requerida para remover o material que adere a boca durante o processo normal de comer.
Coesividade	A taxa na qual o material se desintegra em ação mecânica.	Grau ao qual uma substância é comprimida entre os dentes antes de romper.
Fraturabilidade	Força com que o material se fratura.	Força pela qual uma amostra esmigalha ou quebra.
Mastigabilidade	Força necessária para desintegrar o material.	Tempo necessário para mastigar uma amostra (velocidade constante) para reduzi-la à consistência adequada para deglutição.
Gomosidade	Força necessária para desintegrar o material.	Força necessária para desintegrar a massa do alimento, obtida durante a mastigação, até que atinja o ponto de engolir.

Fonte: BOURNE (2002); COSTA (2015) com adaptações.

Em estudos da influência de biopolímeros microbianos na textura de gel de amido de milho, Munhoz, Weber e Chang (2004) verificaram que, ao serem incorporadas ao amido de

milho com 71 % de amilose, as gomas guar e xantana promoveram a diminuição da dureza do gel após 120 h de armazenamento, sendo a goma xantana com efeito mais pronunciado. Segundo Costa (2015), isso ocorre por que os hidrocoloides apresentam a capacidade de reduzir a retrogradação dos géis, o que, com o tempo, promove uma diminuição da rigidez em relação às amostras controle.

Combinações de amido-hidrocoloide têm sido usadas em alimentos processados (muito utilizados em produtos de confeitaria) desde, pelo menos, 1950. Além do polissacarídeo microbiano proteger os grânulos de amido contra o cisalhamento durante a gelatinização, tem capacidade de melhorar a textura/reologia do produto, manter a umidade e proteger contra a sinérese (BEMILLER, 2011). As combinações amido/polissacarídeo microbiano podem trazer esses benefícios e até mesmo evitar o uso dos termos em alimentos de amidos modificados (COSTA, 2015).

Há estudos de que certos biopolímeros promovem maior estabilidade de determinados géis de amidos (HEYMAN et al., 2014). Kim, Patel e BeMiller (2013) verificaram que alguns biopolímeros microbianos em combinação com certos amidos fornecem melhoria de algumas propriedades como a retrogradação, sinérese, textura e reologia. Chaisawang e Supphantharika (2006) propõem que a goma xantana, por envolver os grânulos do amido nativo, dificulta o inchamento dos mesmos e conseqüentemente influencia na gelatinização.

3.6 FORMAÇÃO DE EMULSÕES COM EPSs

Emulsões de óleo em água são vastamente utilizados em muitos processos industriais em alimentos, cosméticos e farmacêuticos, pois são a base de muitos produtos. As emulsões são termodinamicamente instáveis, porque o contato entre as moléculas de água e óleo é energeticamente desfavorável (MCCLEMENTS, 2000). Na formulação de sistemas de emulsão estável, normalmente se distingue dois tipos de ingrediente: agentes emulsionantes e os estabilizadores. Emulsionantes são moléculas tensoativas que reduzem a tensão superficial e evitam que as gotículas de floclulação se formem. Estabilizadores normalmente são biopolímeros, proteínas ou polissacarídeos, e estes conferem a estabilidade da emulsão em longo prazo. A principal ação de estabilização dos polissacarídeos é através da modificação de viscosidade aquosa (DICKINSON, 2003).

Ao estudar a atividade de emulsificação de uma solução de R-PS18 produzido por *Rhizobium* sp. PRIM-18 0,5% m/v em água com um volume igual de substratos hidrofóbicos (óleo de oliva, óleo de girassol, gasolina, querosene, hexano, xileno e tolueno), Priyanka e

colaboradores (2015) constataram que o índice de emulsificação foi superior a 84% para todos os substratos testados, destacando-se óleo de girassol (96%), azeite e hexano (91%).

Krstonosic et al. (2009) avaliaram a influência da adição de goma xantana na reologia, características de dispersão e estabilidade da emulsão de óleo de milho em água. Durante 15 dias de armazenamento com a adição de xantana os resultados mostraram à diminuição do raio médio de gota e aumento nas propriedades elásticas das emulsões. Todas as emulsões, com e sem xantana, mostraram comportamento pseudoplástico.

A capacidade do EPS de emulsionar os hidrocarbonetos também pode ser explorada para uma melhor recuperação do petróleo e para a remediação do azeite. Esse estudo, com duas cepas de mutantes de *R. tropici* Semia 4077, foi realizado por Castellane, Campanharo e Lemos (2015). A pesquisa verificou a estabilidade das emulsões formadas com óleo de soja, óleo diesel e tolueno, utilizando concentrações de EPS purificados de 1 e 5 g L⁻¹. Cada solução foi misturada ao óleo na proporção 3:2 v/v. Para fins de comparação usou-se a goma xantana. Os resultados demonstraram que o EPS produzido pela cepa selvagem de *R. tropici* Semia 4077 possuía a capacidade de estabilizar emulsões com tolueno, soja e óleo diesel, com índices de emulsificação superiores a 50% utilizando 5 g L⁻¹ de EPS, enquanto o EPS produzido pelo mutante 4077:Z04 provou possuir capacidade de estabilização da emulsão com tolueno, com um índice de emulsificação de 51,83% na mesma concentração.

Maalej e colaboradores (2015) investigaram a capacidade emulsionante de um novo EPS (EPS22) produzido por *Pseudomonas stutzeri* AS22, o qual foi capaz de emulsionar vários óleos alimentares e compostos hidrofóbicos, especialmente azeite e hexano, com índices de emulsificação de 100% a uma concentração de 0,6%. Também demonstrou sua atividade emulsionante durante a exposição a temperaturas elevadas (20-100°C) e pH (4 e 10).

Prasanna et al. (2012), analisaram os EPSs purificados de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CCUG 52486 e *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205, na concentração de 1 mg mL⁻¹, comparando-os com a goma guar e a goma xantana. Os EPSs de *B. infantis* NCIMB 702205 e *B. longum* subsp. *infantis* CUG 52486 produziram emulsões mais estáveis com óleo de laranja, óleo de semente de girassol, óleo de coco e xileno, quando comparado com a goma guar e goma xantana.

Freitas et al. (2011) verificaram a capacidade de formação e estabilização da emulsão de um EPS produzido por *Enterobacter*, cepa A47 DSM 23139, comparando com fucogel, goma xantana, goma guar, alginato, pectina e carboximetilcelulose (CMC), para avaliar seu potencial em óleos de milho, girassol, farelo de arroz, madeira de cedro e óleo de silicone, na proporção de 3:2 v/v. Apresentou uma elevada capacidade de estabilização da

emulsões para os óleos alimentares testados, óleo de girassol, milho e óleo de farelo de arroz, com índices de emulsificação de 60, 64 e 80%, respectivamente. O EPS demonstrou índices de emulsificação mais elevados que a xantana, alginato e pectina, para a maioria dos compostos testados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Escola de Química de Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande, utilizando também a estrutura de outros laboratórios da unidade.

4.1 MATERIAL

4.1.1 Micro-organismo

Foi utilizada a bactéria *Mesorhizobium loti* Semia 816 fornecida pelo Banco de Culturas da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Fepagro, Porto Alegre, Brasil), Seção de Microbiologia Agrícola da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul.

4.1.2 Glicerol residual

O glicerol residual proveniente da obtenção de biodiesel a partir do óleo de soja por via metanólica foi fornecido pela empresa BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A (Passo Fundo - RS), apresentando a seguinte composição: glicerol, 82,09%; umidade, 11,38%; cinzas 5,94%; matéria orgânica não glicerídica, 0,59%; pH, 5,14.

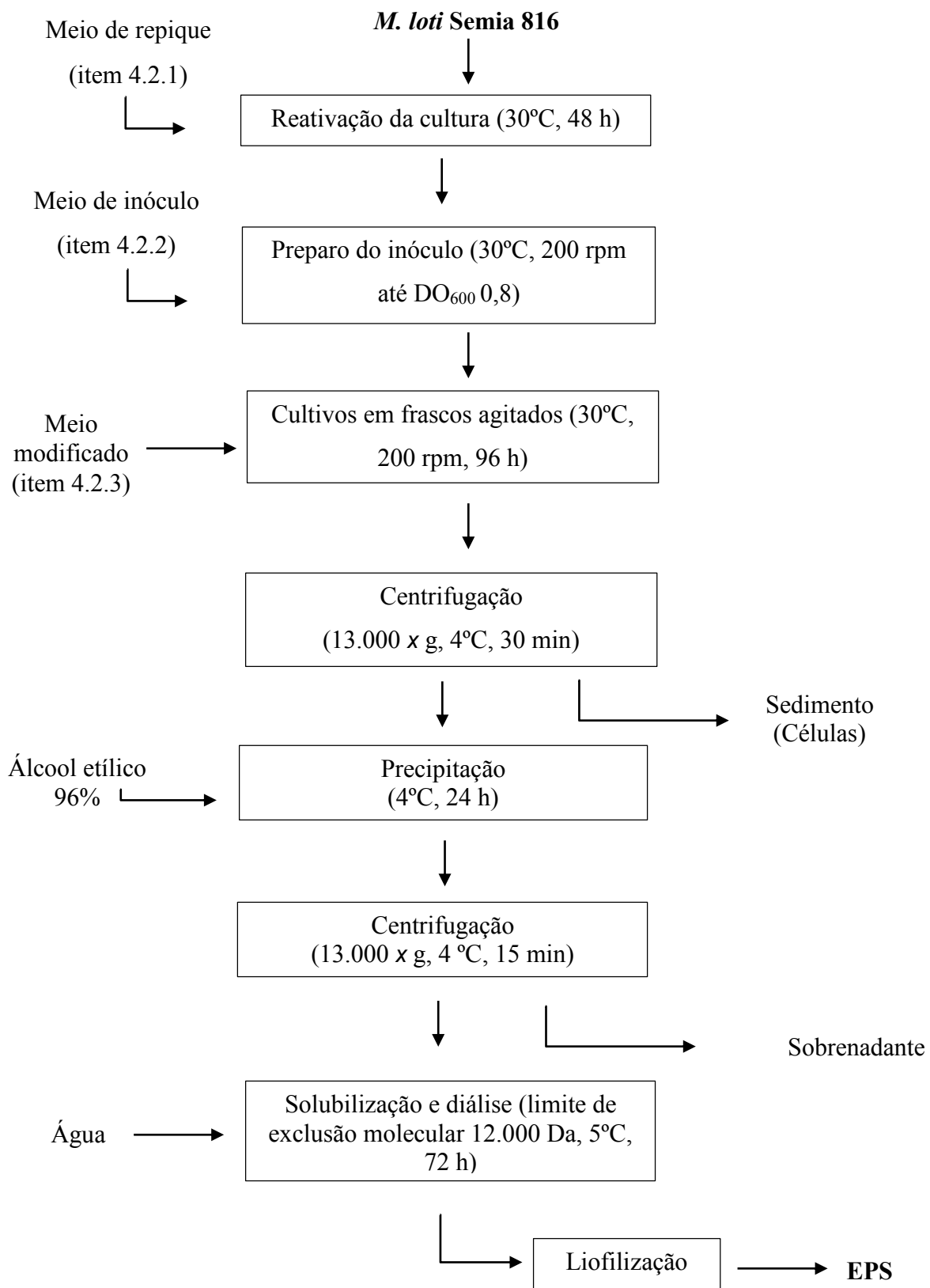
4.1.3 Outros materiais

A xantana foi adquirida de Pra Vida (Santa Cruz do Sul, RS, Brasil) e a gelana foi fornecida pela CP Kelco Company (Atlanta, GA, Estados Unidos), sendo usadas para fins de comparação com o EPS produzido por *M. loti* Semia 816. Para a formação de emulsões foram utilizados cinco óleos vegetais, adquiridos no comércio local: milho, girassol, arroz, soja e canola.

4.2 MÉTODOS

Um fluxograma demonstrando as etapas de obtenção do EPS desde a manutenção da cultura até a liofilização está apresentado na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma do processo de obtenção do EPS produzido pela bactéria *M. loti* Semia 816.



4.2.1 Manutenção da cultura

A partir da cultura refrigerada a 8°C, fornecida pela Fepagro, foram realizados repiques sucessivos, sendo utilizado o meio YMA (*Yeast Manitol*) (g L^{-1}): 10 manitol; 0,5 K_2HPO_4 ; 0,2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 NaCl; 0,4 extrato de levedura; 15 ágar. A bactéria foi incubada em estufa bacteriológica (Quimis QE316M2, Brasil) a 30°C por 48 h. A cepa foi mantida refrigerada (8°C), sendo realizados repiques trimestrais.

4.2.2 Inóculo e condições de cultivo

O inóculo foi preparado partindo de um tubo contendo a cultura microbiana reativada, sendo raspada com 10 mL água peptonada 0,1%, a fim de resultar em uma suspensão de células. Esta foi transferida para frasco *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 90 mL de meio YMA (g L^{-1}): 10 manitol; 0,1 K_2HPO_4 ; 0,4 KH_2PO_4 ; 0,2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 NaCl; 0,4 extrato de levedura. Os frascos foram mantidos em incubadora refrigerada com agitação orbital (Tecnal TE-424, Brasil) a 30°C e 200 rpm, até atingir a densidade ótica (DO) de 0,8 a 600 nm (STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012).

4.2.3 Cultivos em frascos agitados

Os cultivos foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 100 mL de meio com a seguinte composição (g L^{-1}): 12,2 glicerol residual; 0,1 K_2HPO_4 ; 0,4 KH_2PO_4 ; 0,2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 NaCl; 0,4 extrato de levedura; 0,12 $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,15 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; pH ajustado em 7,0. Os frascos foram incubados a 30°C e 200 rpm por 96 h, adicionando-se 10% v/v de inóculo (RIBEIRO, 2015).

4.2.4 Recuperação do EPS

A recuperação do EPS do meio de cultivo foi realizada através da centrifugação (Eppendorf modelo 5804-R, Alemanha) a $13.000 \times g$ por 30 min a 4°C para remoção de células, seguido de precipitação do EPS pela adição de álcool etílico 96% (1:3 v/v). Essa solução ficou em repouso por 24 h a $\pm 4^\circ\text{C}$, sendo novamente centrifugada a $13.000 \times g$ a 4°C por 15 min (RIBEIRO, 2015).

O EPS recuperado foi solubilizado em água Milli-Q e dialisado em sacos de diálises com limite de exclusão molecular de 12.000 Da, contra água destilada, por 72 h a 4°C para eliminação de impurezas. Após a diálise, seus volumes foram congelados, liofilizados e conservados congelados (RIBEIRO, 2015).

4.2.5 Solubilização das amostras

Para o preparo das amostras, tanto para determinação da viscosidade quanto para determinação do índice de emulsificação, foi adotado o procedimento de acordo com Xuewu et al. (1996) com adaptações. O EPS e as gomas comerciais foram diluídos, na concentração de 1% m/v, em água destilada, agitando-se em vórtex por 5 min e após aquecimento a 60°C por 40 min.

4.2.6 Determinação da viscosidade

Para determinação da viscosidade do EPS e das gomas comerciais (1% m/v), estas foram solubilizadas de acordo com o item 4.2.5, e mantidas na temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) por 24 h. Foi utilizado um reômetro digital rotacional cone/Plate DV- III Ultra (Brookfield cone/Plate version, EUA), acoplado a um banho-maria a 25°C, com adaptador para pequenas amostras, determinando-se as curvas de viscosidade aparente (cP) em função da taxa de cisalhamento (s^{-1}). As leituras foram em 300 s e a taxa de cisalhamento variou de 30 a 800 s^{-1} . O *spindle* foi o CP51.

4.2.6.1 Análise reológica

A descrição do comportamento reológico das amostras foi realizada a partir do modelo matemático de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) (ARANDA-SELVERIO et al., 2010; HAMINIUK et al., 2006), o qual relaciona a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento. Para confirmação do comportamento pseudoplástico da solução de EPS produzido e das duas gomas comerciais, foi realizado o ajuste do modelo de Ostwald-de-Waele (Equação 1) aos dados experimentais, a partir de regressão linear, usando o *software* Statistica 5.0 (StatSoft Inc, EUA). Plotou-se Ln da taxa de deformação x Ln da tensão de cisalhamento, obtendo-se os valores de K (índice de consistência) e n (índice do comportamento do fluxo), podendo-se, então, demonstrar o ajuste do modelo aos dados experimentais (ARANDA-SELVERIO et al., 2010).

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

Onde:

τ = tensão de cisalhamento (mPa)

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

K = índice de consistência (mPa.sⁿ)

n = índice do comportamento do fluxo (adimensional)

4.2.7 Efeito da adição de sais na viscosidade

Para verificar o efeito da adição de sais na viscosidade, foram adicionados à solução 1% m/v do EPS de *M. loti* Semia 816 e das duas gomas comerciais, cloreto de potássio e cloreto de sódio nas concentrações de 0,1 e 1 mol L⁻¹.

As amostras foram solubilizados em soluções de NaCl e KCl 0,1 e 1 mol L⁻¹ em 60°C por 40 min. Foram mantidas por 24 h em temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) para a medida da viscosidade em reômetro digital rotacional cone/Plate DV-III Ultra (Brookfield cone/Plate version, EUA). Os parâmetros adotados foram: taxa de deformação aplicada de 30 a 800 s⁻¹, tempo de 300 s e temperatura de 25°C. Os ensaios foram realizados de acordo com metodologia adaptada de Diaz (2002).

4.2.8 Índice de emulsificação (IE₂₄)

O índice de emulsificação (IE₂₄) foi determinado para o biopolímero produzido, usando como referências a goma xantana e a goma gelana comerciais, baseando-se no método de Cooper e Goldemberg (1987). Foram utilizados cinco óleos vegetais: milho, girassol, arroz, soja e canola. A suspensão de goma (1% m/v) e cada óleo foram adicionados na proporção de 2:3 v/v, em tubos de ensaio com rosca, e logo após os tubos foram agitados em vórtex durante 2 min. Após 24 h de repouso, foi medida a altura da camada emulsionada e a altura total da camada líquida.

O IE₂₄ foi calculado de acordo com a Equação (2):

$$IE_{24} = \frac{\text{altura camada emulsionada}}{\text{altura total}} \cdot 100\% \quad (2)$$

4.2.9 Caracterização química

Foi realizada a caracterização química do EPS produzido, como também das gomas comerciais, gelana e xantana, para fins de comparação.

4.2.9.1 Açúcares totais

O conteúdo de açúcares totais foi determinado através do método fenol-ácido sulfúrico, que se baseia na formação do derivado furfural, na presença de H₂SO₄ concentrado, que reage com o fenol formando um complexo de coloração amarela (DUBOIS; GILLES; HAMILTON, 1956).

Em um tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL de amostra convenientemente diluída, 0,5 mL de fenol 5%, seguido da adição de 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Após 30 min em repouso, à temperatura ambiente, foi realizada a leitura da transmitância a 480 nm em espectrofotômetro visível (Bioespectro SP-22, China). A concentração do teor de açúcares foi determinada através de uma curva padrão de glicose (1 g L⁻¹), apresentada no Apêndice I (Figura I). As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.9.2 Proteínas Totais

O conteúdo de proteínas totais foi determinado através do método de Kjeldahl (Método 920.87), segundo AOAC (2003). O conteúdo de proteínas foi calculado multiplicando por 6,25. As análises foram realizadas em triplicatas.

4.2.9.3 Ácidos urônicos

A dosagem de ácidos urônicos foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), onde a 400 µL de amostra 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 H₂SO₄ concentrado. Após aquecimento em banho com H₂O fervente por 20 min, os tubos foram resfriados e então adicionados 80 µL da solução de m-hidroxibifenil a 0,15% m/v em NaOH 0,5% m/v para a produção do complexo colorido. A absorbância da solução, estável até 1 h após sua formação, foi medida imediatamente em 525 nm em espectrofotômetro visível (Bioespectro SP-22, China). A quantificação foi realizada com o auxílio de uma curva padrão de ácido glicurônico na concentração de 0,1 mg mL⁻¹ dentro da faixa de linearidade do método (0,97 a 38,8 µg 400 µL⁻¹ de ácido urônico), apresentado no Apêndice I (Figura II). As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.9.4 Umidade

O conteúdo de umidade foi determinado usando a metodologia da AOAC (2003) (Método 925.10). As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.9.5 Cinzas

Os teores de cinzas do EPS e das gomas comerciais foram determinados por incineração em mufla (AOAC, 2000).

4.2.10 Perfil de textura instrumental dos géis formados

Para o preparo dos géis, foram usados água e hidrocoloides (goma xantana, goma gelana e EPS liofilizado), para um total de 50 g. Assim foram preparados géis com adição de hidrocoloides na concentração de 1,0% m/m. As suspensões foram solubilizadas a 85°C em banho termostaticado por 10 min com agitação manual suave, seguido de resfriamento até temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$). As amostras foram transferidas para recipientes de vidro de 50 mL (forma cilíndrica de ± 45 mm de diâmetro interno e ± 60 mm de altura), ajustando a altura do gel para aproximadamente 30 mm, sendo resfriadas em temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) durante 24 h.

Após o período de armazenamento as amostras foram submetidas à análise de perfil de textura (TPA) (dureza, elasticidade, coesividade, gomosidade, adesividade e mastigabilidade), com texturômetro TA-XT Plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido), equipado com um *probe* cilíndrico de P/0.5R, com as seguintes condições experimentais para todos os ensaios: velocidade de pré-teste 2,0 mm s⁻¹; velocidade de teste 2,0 mm s⁻¹; velocidade de pós-teste 2,0 mm s⁻¹; compressão de 50% e um período de repouso de 5 s entre os dois ciclos; força de disparo 5 g (adaptado de Costa, 2015).

Os resultados obtidos da curva força x tempo foram calculados pelo programa Texture Expert para TPA (Stable Micro Systems, Reino Unido).

4.2.11 Sinérese dos géis com adição dos biopolímeros microbianos

Para medida da sinérese das amostras de géis na presença de biopolímeros foi utilizada a metodologia descrita por Costa (2015) e Banerjee e Bhattacharya (2011), com adaptações.

As amostras já preparadas (mesmo procedimento utilizado no item 4.2.10) foram vertidas em tubos graduados de centrífuga de 50 mL e suas massas (m_1) foram determinadas. Estas dispersões foram resfriadas até a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) para fixação dos géis e após armazenadas em estufa a 4°C por período que variou de 1 a 7 dias. Ao término de cada tempo de armazenamento as amostras foram retiradas da estufa e centrifugadas a 13.000 x g por 15 min a 4°C em centrífuga (Eppendorf modelo 5804-R, Alemanha). Após separar e

descartar a água, os géis, juntamente com os tubos, foram pesados (m_2) novamente. A sinérese do gel foi calculada conforme a Equação 3 e os resultados expressos em (%) de água liberada.

$$\text{Sinérese (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \cdot 100\% \quad (3)$$

4.2.12 Análise estatística dos resultados

Os ensaios com o EPS e as gomas comerciais nas diferentes condições foram realizados em triplicata, sendo os dados tratados por análise de variância e teste de Tukey (MONTGOMERY, 2004), a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre os polissacarídeos, a 95% de confiança ($p \leq 0,05$). O tratamento estatístico dos dados foi feito com o *software* Statistica 5.0 (StatSoft Inc, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DO EPS

A produção do EPS em 96 h, ainda não submetido à diálise, é apresentada na Tabela 3, em comparação com a literatura. O EPS apresentado corresponde ao material extracelular precipitável por etanol, conforme descrito por Staudt, Wolfe, Shrout (2012).

Tabela 3 - Produção de EPSs por bactérias diazotróficas

Bactéria diazotrófica	Fonte de carbono	Produção de EPSs	Referência
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	Sacarose	4,08 g L ⁻¹	STAUDT; WOLFE, SHROUT (2012)
<i>Rhizobium radiobacter</i> S10	Soro de leite	2,83 g L ⁻¹	ZHOU et al. (2014)
<i>Rhizobium tropici</i> Semia 4077	Manitol	7,45 g L ⁻¹	CASTELLANE et al. (2015)
<i>Rhizobium</i> sp.	Sacarose	6,63 g L ⁻¹	MORETTO et al. (2015)
<i>Rhizobium tropici</i> Semia 4080	Sacarose	4,51 g L ⁻¹	CASTELLANE et al. (2017)
	Sacarose + Diesel	5,26 g L ⁻¹	
<i>Mesorhizobium loti</i> Semia 816	Glicerol residual	4,91 g L ⁻¹	Este trabalho

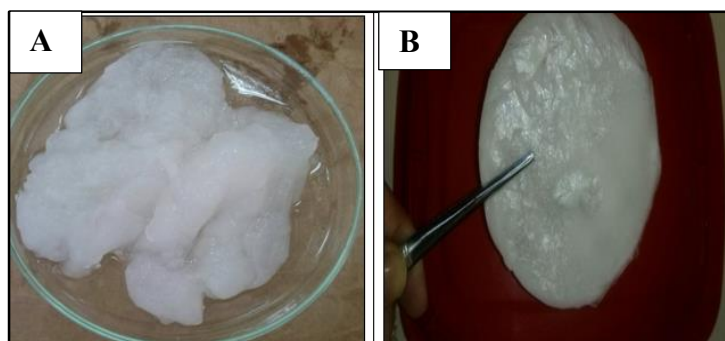
Observa-se pela Tabela 3 que *M. loti* Semia 816 produziu quantidades expressivas de EPSs quando comparado com outras bactérias do gênero *Rhizobium* cultivadas com outros substratos. Cabe salientar ainda que este resultado foi possível usando um substrato de baixo custo e grande disponibilidade (glicerol residual proveniente da produção de biodiesel), ao contrário, por exemplo, do manitol, fonte de carbono usual no cultivo deste grupo de bactérias, que mostrou resultado superior ao obtido no presente trabalho com *R. tropici* Semia 4077 (CASTELLANE et al., 2015). Cabe ressaltar que o resultado obtido para *M. loti* 816 (4,91±0,38

g L⁻¹) correspondeu ao encontrado para o mesmo micro-organismo por Ribeiro (2015), que foi 4,90±0,21 g L⁻¹.

O pH é um parâmetro importante para o crescimento de organismos. Durante os cultivos foi observada uma acidificação, na qual o pH diminuiu de 6,72 ± 0,05 (0 h) para 6,26 ± 0,11 (24 h), 5,98 ± 0,25 (48 h) e 4,77 ± 0,10 no final do período de incubação (96 h). Para Castellane et al. (2017), o pH do meio de cultivo influencia significativamente a produção de EPS. Em geral, o pH médio ideal para a produção de EPS varia de 5 a 7. Segundo Lindstrom, Barry e Braddock (1998), a acidificação é característica desta bactéria, pois provavelmente está associada ao fato de que bactérias do gênero *Rhizobium* produzem uma reação ácida em meio contendo sais minerais.

A recuperação do EPS do meio de cultivo foi realizada através da centrifugação por 30 min a 4°C para remoção de células, seguido de precipitação do EPS pela adição de álcool etílico 96%. O EPS recuperado (Figura 7A) foi colocado em placas de Petri e em seguida foi solubilizado em água e dialisado (72 h). Após a diálise, seus volumes foram congelados e liofilizados (Figura 7B) (MONTEIRO, 2011). Castellane, Lemos e Lemos (2014), Caltellane et al. (2017), Moretto et al. (2015), Priyanka et al. (2015) e Ribeiro (2015) utilizaram a mesma metodologia na recuperação do EPS. O processo de diálise tem como finalidade remover compostos de baixa massa molar, pois segundo Souza (2009) estes podem interferir na formação da rede de gel.

Figura 7 - (A) EPS recuperado após 24 h em álcool etílico; (B) EPS liofilizado



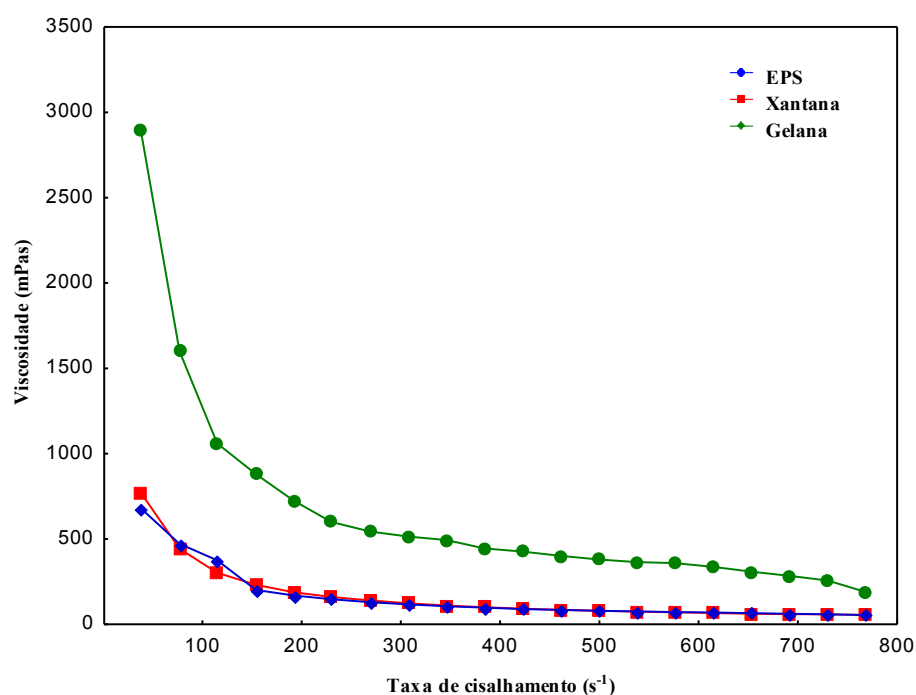
5.2 DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE

Como característica expressiva dos polissacarídeos, as propriedades reológicas das gomas influenciam diretamente no processamento, estabilização e textura, tanto nas indústrias alimentícias, quanto têxteis ou farmacológicas (SUN; HUANG; WU, 2014).

Para verificar a qualidade do biopolímero sintetizado pela bactéria *M. loti* Semia 816, foi determinada a viscosidade em uma solução aquosa a 1% (m/v), utilizando para fins de comparação a goma gelana e a goma xantana comerciais.

A Figura 8 apresenta o comportamento da viscosidade aparente (cP) em função da taxa de cisalhamento (s^{-1}) para a goma produzida por *Mesorhizobium loti* Semia 816 e as duas gomas comerciais, xantana e gelana.

Figura 8 - Variação da viscosidade versus taxa de cisalhamento em solução aquosa (1% m/v) do EPS produzido por *M. loti* Semia 816 em comparação às duas gomas comerciais



A solução do EPS produzido pela bactéria *M. loti* Semia 816, assim como as gomas comerciais xantana e gelana, apresentaram um comportamento não-newtoniano quando utilizada uma solução de concentração 1% m/v, no qual a viscosidade decresce com o aumento da taxa de cisalhamento. Especificamente, o comportamento de um polissacarídeo em solução corresponde ao de um fluido pseudoplástico (FARIA 2002; FERNANDES JUNIOR et al., 2010; XU et al., 2015). O decréscimo da viscosidade, com o aumento da taxa de cisalhamento, mostrada na Figura 8, se explica através da orientação das moléculas na direção do fluxo, da deformação das cadeias flexíveis e da diminuição das interações intermoleculares, tornando menor a resistência ao escoamento (TONELI et al., 2005).

A resistência ao escoamento de muitas partículas resulta na elevada viscosidade. No entanto, essas partículas serão destruídas à medida que a taxa de cisalhamento aumenta,

dispersando macromoléculas ao longo da direção do fluxo, fazendo com que a viscosidade aparente diminua (XU et al., 2015). Fernandes Junior et al. (2010) e Priyanka et al. (2015) analisaram as soluções de EPSs produzidos pela bactéria *Rhizobium* nas concentrações de 10% e 0,25% m/v, respectivamente, e do mesmo modo observaram um decréscimo na viscosidade (mPas) com o aumento da taxa de cisalhamento (s^{-1}), indicando o comportamento pseudoplástico característico dos polímeros bacterianos.

De acordo com a Figura 8, utilizando a concentração de 1% m/v, a viscosidade aparente da gelana é a mais alta, seguido da xantana e do EPS produzido. A viscosidade aparente da gelana (2.895 mPa.s) é cerca de 4 vezes maior que a da xantana (772 mPa.s) e do EPS (570 mPa.s), para um taxa de cisalhamento de $38 s^{-1}$. A capacidade de espessamento da goma gelana comercial é maior, o que pode ser atribuído à diferença significativa no seu arranjo de cadeia. Porém, observando a Figura 8, nota-se que praticamente não houve diferença entre o EPS de *M. loti* Semia 816 e a goma xantana comercial.

Oliveira (2010) caracterizou a reologia do biopolímero pululana de duas cepas isoladas de *Aureobasidium pullulans*, não purificado e parcialmente purificado, sendo preparadas soluções aquosas nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,3 e 0,5 g L⁻¹, com diferentes taxas de cisalhamento, variando de 300 a 800 s⁻¹, nas temperaturas de 10, 25 e 35°C, observando um comportamento pseudoplástico.

Castellane, Lemos e Lemos (2014) investigaram as propriedades reológicas do EPS de *R. tropici* Semia 4080, cepas mutantes (MUTZC3 e MUTPA7) e isolados de rizóbios (JAB1 e JAB6). *R. tropici* Semia 4080 tem as vantagens da não-patogenicidade e produtividade rápida e, portanto, mostrou ser um modelo de organismo celular muito promissor para a produção de EPS microbiano. Os ensaios reológicos foram conduzidos a 25°C, com taxa de cisalhamento de 0,1 até 100 s⁻¹. Os EPSs apresentaram comportamento não newtoniano típico.

Moretto et al. (2015) caracterizaram os EPSs de quatro isolados de *Rhizobium* (LBMP-C01 e LBMP-C04) e *Ensifer* (LBMP-C02 e LBMP-C03), apresentando comportamento pseudoplástico para taxa de cisalhamento de 0,1 a 100 s⁻¹.

O modelo de Ostwald-de-Waele (Lei da potência) é bastante utilizado para descrever o comportamento reológico de fluidos pseudoplásticos. Os coeficientes deste modelo para as soluções analisadas são apresentados na Tabela 4. O coeficiente de consistência 'K' descreve o intervalo geral de viscosidades em toda a parte modelada da curva de fluxo.

Tabela 4 - Parâmetros reológicos obtidos pela análise das soluções de EPSs, goma xantana e gelana, pela aplicação do modelo da Lei da Potência (Modelo de Ostwald-de-Waele).

EPS	Índice de consistência K (mPa.s ⁿ)	Índice do comportamento de fluxo(n)	Coefficiente de regressão (R ²)
<i>M. loti</i> 816	78,93	0,26	0,99
Xantana	186,77	0,12	0,99
Gelana	414,46	0,24	0,93

Pode ser observado na Tabela 4 que a solução do EPS produzido neste estudo e a goma xantana, bem como a goma gelana, apresentaram $n < 1$, confirmando o perfil pseudoplástico. Para Faria (2009), Almeida (2010) e Castellane et al. (2017) esse comportamento é característico dos biopolímeros bacterianos. Castellane et al. (2015) encontraram para EPS de *R. tropici* Semia 4077 e EPS do mutante Z04 (5 g L⁻¹) valores de K de 3,7 e 2,9 Pa.sⁿ, respectivamente. Zhou et al. (2014), ao estudar o comportamento reológico do EPS (1% m/v) produzido por *R. radiobacter* S10 utilizando taxas de cisalhamento de 0,01 s⁻¹ a 1000 s⁻¹, encontraram valores para índice de consistência (K) de 338,85 e n igual a 0,87, a partir do ajuste ao modelo de Williamson.

O comportamento pseudoplástico foi relatado para outros EPSs bacterianos, tais como o EPS 450, produzido por *Bacillus* sp. (ROTTAVA, 2005), EPSs de bactérias do gênero *Rhizobium* (ARANDA-SELVERIO et al., 2010; MORETTO et al., 2015) e xantana produzida por *Xanthomonas campestris* (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

Ribeiro (2015) caracterizou parcialmente o EPS produzido pela bactéria *M. loti* Semia 816 quanto ao comportamento das soluções aquosas do EPS dialisado e não dialisado e de duas gomas comerciais xantana e gelana, a 1% m/v, a 25°C, com *spindle* 51, tempo 300 s, com taxa de cisalhamento de 5 a 100 s⁻¹. As amostras apresentaram um comportamento não-newtoniano, e uma variação de 13,15% na viscosidade máxima do EPS não dialisado (4.540,70 mPa.s) para o EPS dialisado (5.138,16 mPa.s), tendo superado a viscosidade da goma xantana comercial (3.067 mPa.s), utilizada para fins de comparação.

Zhou e colaboradores (2014) investigaram as propriedades reológicas do EPS produzido pela bactéria *R. radiobacter* S10, utilizando taxas de cisalhamento de 0,01 s⁻¹ a 1000 s⁻¹ a 25°C. A viscosidade aparente de todas as soluções testadas diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento, indicando comportamento típico de EPSs bacterianos (pseudoplasticidade).

Variando a taxa de cisalhamento de 0,01 a 1000 s^{-1} , durante 400 s, com 100 pontos de aquisição, Klaic e colaboradores (2016) relatam valores para índice de comportamento de fluxo menores que 1 ao investigar a viscosidade de xantana produzida por *X. arboricola* pv pruni na mesma concentração (1% m/v).

Na indústria de alimentos, polímeros com características pseudoplásticas são utilizados para melhorar a qualidade sensorial, como também propriedades de suspensão de produtos alimentares. A preparação de formulações tanto em alimentos como em cosméticos, usando EPS, permite uma elevada viscosidade, tornando-os mais firmes e estáveis (MAALEJ et al., 2014; PRASANNA et al., 2012).

5.3 EFEITO DA ADIÇÃO DE SAIS NA VISCOSIDADE

Estudos sobre o efeito de adição de sais na viscosidade das soluções de polissacarídeos são importantes para predizerem a sua utilização em alimentos, já que a grande maioria, como sopas, maionese, molhos, entre outros, são adicionados de eletrólitos. Os resultados das curvas de viscosidade versus taxa de cisalhamento para o EPS de *M. loti* Semia 816 e das gomas comerciais xantana e gelana com adição de cloreto de potássio e cloreto de sódio nas concentrações de 0,1 mol L^{-1} e 1 mol L^{-1} são apresentados nas Figuras 9, 10, 11 e 12.

Figura 9 - Variação da viscosidade versus taxa de cisalhamento em solução aquosa (1% m/v), na presença de KCl 0,1 mol L^{-1} , do EPS produzido por *M. loti* Semia 816 em comparação as duas gomas comerciais

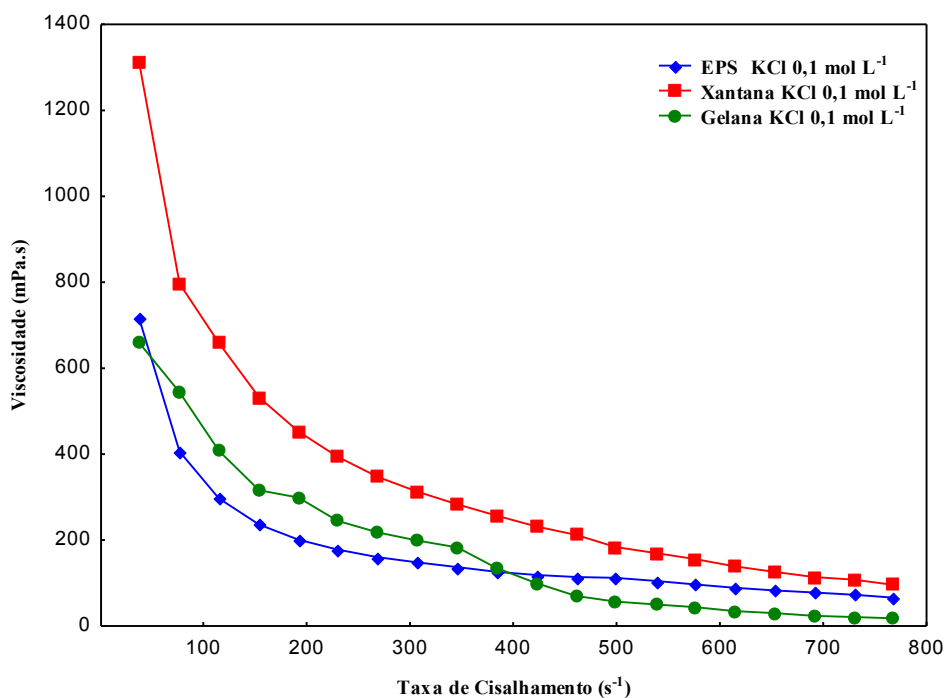


Figura 10 - Variação da viscosidade versus taxa de cisalhamento em solução aquosa (1% m/v), na presença de KCl 1 mol L⁻¹, do EPS produzido por *M. loti* Semia 816 em comparação as duas gomas comerciais

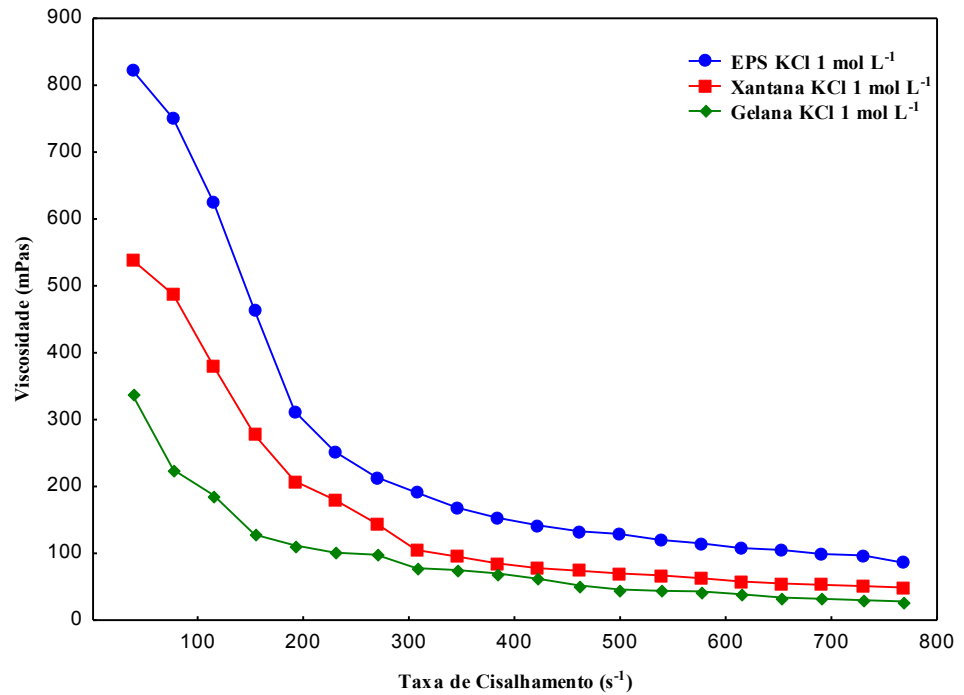


Figura 11 - Variação da viscosidade versus taxa de cisalhamento em solução aquosa (1% m/v), na presença de NaCl 0,1 mol L⁻¹, do EPS produzido pelo *M. loti* Semia 816 em comparação as duas gomas comerciais

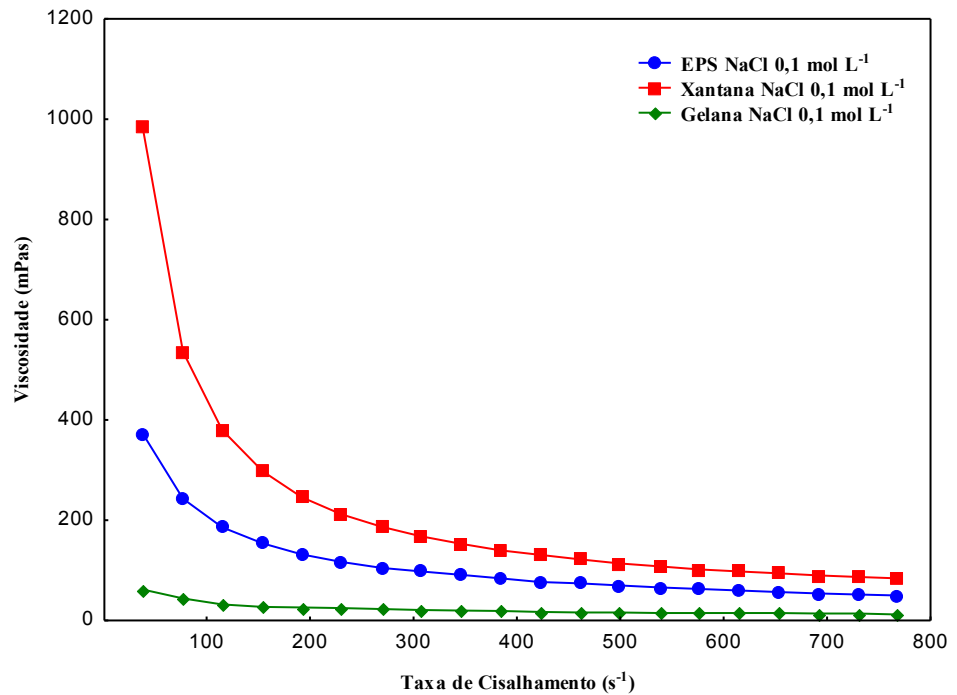
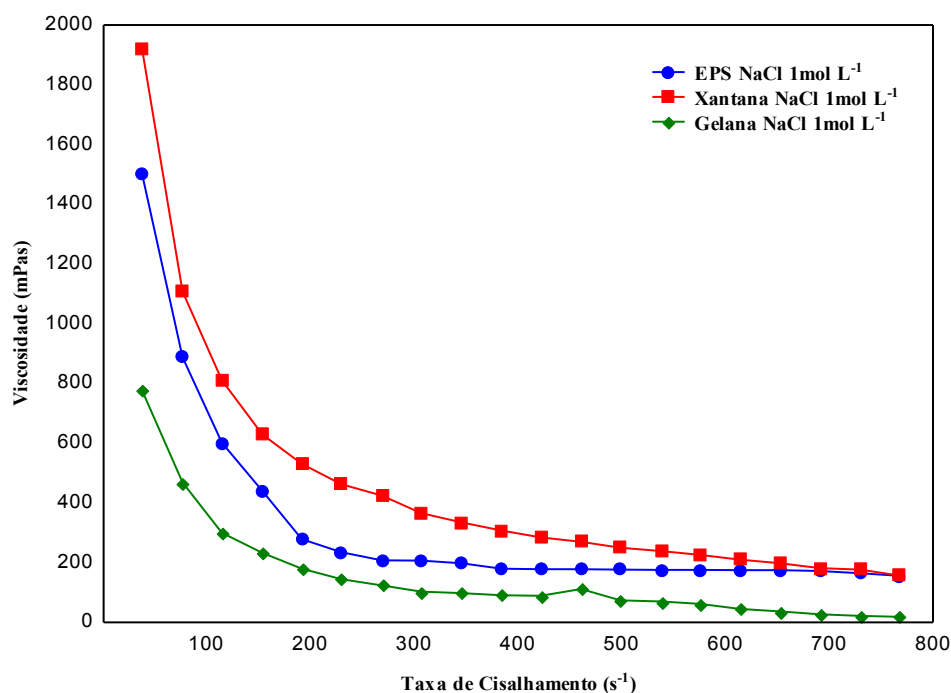


Figura 12 - Variação da viscosidade versus taxa de cisalhamento em solução aquosa (1% m/v), na presença de NaCl 1 mol L⁻¹, do EPS produzido pelo *M. loti* Semia 816 em comparação as duas gomas comerciais



O estudo reológico dos materiais, tanto no estado sólido quanto em solução aquosa, permite obter informações muito importantes a respeito das propriedades de escoamento e deformação.

Os resultados obtidos demonstram que a adição de sais mostram uma tendência de aumento da viscosidade aparente das amostras de xantana e do EPS de *M. loti* Semia 816, sendo a concentração que resultou em maior viscosidade para o EPS produzido pela bactéria *M. loti* foi a de 1 mol L⁻¹, independente do sal adicionado.

Verificou-se que a xantana apresentou uma tendência de valores superiores, quando comparada com o EPS produzido pela bactéria *M. loti* 816, com a adição de sais, conforme está evidenciado nas Figuras 9, 11 e 12. Segundo Liu e Norisuye (1988), a xantana comercial é vendida adicionada de íons, sendo cloreto de potássio geralmente o sal presente em maior concentração, que, conforme Morris (1996), pode ser utilizado para facilitar o processo de solubilização e ocasionalmente a modificação da viscosidade.

Na Figura 10, constata-se que o EPS da bactéria *M. loti* 816 apresentou viscosidade superior à goma xantana e à goma gelana, na presença de KCl 1 mol L⁻¹, o mesmo relatado por DIAZ (2002), que adicionou KCl em EPS produzido por *X. campestris*. Por outro lado, estas concentrações elevadas de íons provocaram a diminuição na viscosidade aparente da xantana, pois provavelmente a mesma já vem adicionada de KCl e possivelmente a concentração

(1 mol L⁻¹) ultrapassou a concentração crítica. Conforme Pelletier et al. (2001) isso provoca a desordenação da estrutura da molécula.

Na Tabela 5, pode-se observar que na concentração de NaCl 1 mol L⁻¹ o comportamento foi semelhante para a goma xantana e o EPS do *M. loti* Semia 816. As duas gomas tiveram sua viscosidade aparente aumentada com a adição deste eletrólito nessa concentração, a qual passou de 772 mPa.s para 1921 mPa.s e 570 mPa.s para 1502 mPa.s, respectivamente.

O EPS produzido pela bactéria *M. loti* Semia 816 sem a adição de sais apresentou viscosidade aparente de 570 mPa.s a uma taxa de cisalhamento de 38 s⁻¹, e com a adição de KCl 1 mol L⁻¹ e NaCl 1 mol L⁻¹, apresentou viscosidade de 823 mPa.s e 1502 mPa.s, respectivamente, sendo três vezes superior com a presença do eletrólito NaCl (Tabela 5).

Tabela 5 - Viscosidade aparente das soluções aquosas e salinas do EPS de *M. loti* Semia 816 e gomas comerciais xantana e gelana para a taxa de cisalhamento de 38 s⁻¹

EPS	Sem adição	Viscosidade (mPa.s)			
		0,1 mol L ⁻¹ KCl	1,0 mol L ⁻¹ KCl	0,1 mol L ⁻¹ NaCl	1,0 mol L ⁻¹ NaCl
<i>M. loti</i> Semia 816	570	715	823	373	1502
Xantana	772	1310	539	984	1921
Gelana	2895	559	585	62	777

Quando a concentração de íons na solução é alta pode ocorrer a desordem na conformação da estrutura, onde a cadeia lateral não está associada com as demais cadeias e sim projetada distante da cadeia principal (LIU; NORISUYE, 1988). A adição de NaCl e KCl nas duas concentrações molares possivelmente afetou a estrutura da goma gelana, talvez provocando um estiramento das cadeias, ocasionado também pelo cisalhamento aplicado (30 a 800 s⁻¹), causando um desordenamento ou modificações em sua estrutura, o que levou a uma diminuição na viscosidade (Figura 9, 10, 11 e 12). Segundo Rinaudo e Milas (1987), a diminuição da viscosidade após a adição de cloreto de sódio é comum com o comportamento de polieletrólitos devido à presença do resíduo de ácido manurônico. Entretanto, Xu e colaboradores (2015) adicionaram as soluções aquosas Al³⁺ e K⁺, as quais resultaram em aumento da viscosidade aparente e viscoelasticidade de xantana e gelana, promovendo a gelificação.

Andhare et al. (2017) caracterizaram e analisaram o comportamento reológico do succinoglicana produzida por *R. radiobacter* em solução a 1% em função da taxa de cisalhamento (0,01 a 1000 s⁻¹) a 25°C. Para verificar os efeitos de cátions monovalentes e divalentes, usaram NaCl (1% e 30%), MgCl₂, KCl e CaCl₂ (2% a 10%). Após a validação dos dados, a viscosidade se mostrou estável na presença de sal em todas as concentrações testadas. O mesmo foi verificado por Carmona et al. (2014), usando concentrações de NaCl até 0,5% em amostras de xantana.

5.4 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (IE₂₄)

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados IE₂₄ do EPS de *M. loti* Semia 816 em 24 h, utilizando óleo de arroz, soja, milho, girassol e canola, comparando com a goma xantana e a goma gelana comerciais na mesma concentração (1% m/v).

Tabela 6 - IE₂₄ para o EPS sintetizado por *M. Loti* Semia, comparando com a goma gelana e a goma xantana (comerciais).

Óleo vegetal	Goma Gelana	Goma Xantana	<i>M. loti</i> Semia 816
Arroz	76,2 ± 2,8 ^{a,A}	78,3 ± 1,5 ^{a,C}	72,7 ± 0,9 ^{a,BC}
Soja	76,9 ± 4,7 ^{a,A}	91,8 ± 4,5 ^{a,AB}	84,1 ± 1,0 ^{a,A}
Milho	75,6 ± 0,8 ^{b,A}	82,1 ± 2,3 ^{a,BC}	70,2 ± 1,2 ^{b,C}
Girassol	84,3 ± 2,3 ^{b,A}	99,3 ± 0,6 ^{a,A}	79,02 ± 3,4 ^{b,AB}
Canola	78,1 ± 1,1 ^{a,A}	77,7 ± 2,3 ^{a,C}	65,6 ± 0,8 ^{b,C}

*Valores (médias ± desvio padrão) com letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa a 95% de confiança (p<0,05); Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa a 95% de confiança (p<0,05).

De acordo com a Tabela 6 pode-se perceber que o IE₂₄ para o óleo de arroz não apresentou diferença significativa (p>0,05) entre as três gomas estudadas, sendo de 72,7%, 78,3% e 76,2% para o EPS de *M. loti* Semia 816, xantana e gelana, respectivamente. Resultado esse semelhante ao encontrado para o óleo de soja (Tabela 6), sem diferença significativa (p>0,05) para a goma xantana (91,8%), EPS (84,1%) e para goma gelana (76,9%).

Castellane et al. (2015) encontraram valores superiores de IE₂₄ para goma xantana (87,73%) quando comparado com o EPS de *Rhizobium* (78,5% e 51,83%), todavia usando 5 g L⁻¹ e proporção de óleo de 3:2 (v/v).

Quando avaliado o óleo de girassol, seu comportamento foi similar ao óleo de milho, com um maior IE₂₄ encontrado com a utilização da goma xantana comercial (99,3%), diferindo significativamente a 95% de confiança (p<0,05) da goma gelana (84,3%) e do EPS

(79,02%). Moretto et al (2015) encontraram IE₂₄ de 78,85% com isolados de *R. tropici*, na concentração de 5 g L⁻¹ de EPS, em óleo de girassol. Já Priyanka et al (2015) observaram que o EPS R-PS18 produzido por *Rhizobium* sp. PRIM-18P quase emulsionou completamente o óleo de girassol (96%), usando solução 0,5% m/v e solução de óleo 1:1 (v/v).

Ao avaliar o óleo de milho, observou-se que o mesmo apresentou IE₂₄ de 70,2% para o EPS de *M. loti* Semia 816, não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à goma gelana (75,6%) e diferindo significativamente ($p < 0,05$) da goma xantana (82,1%). Para o óleo de canola, gelana (78,1%) e xantana (77,7%) não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$), mas diferiram significativamente ($p < 0,05$) do EPS de *M. loti* Semia 816 (65,6%).

Ao concluir os testes realizados com a goma gelana, verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os cinco óleos estudados (Tabela 6), permanecendo uma média de IE₂₄ de 78 % entre os óleos.

A goma xantana comercial apresentou diferenças significativas entre os cinco óleos vegetais. Não diferiram entre si o óleo de soja (91,8%) e o óleo de girassol (99,3%). Do mesmo modo, comparando os resultados do óleo de milho com o óleo de soja, os mesmos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Já o óleo de arroz, apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao óleo de soja e girassol, não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) do óleo de milho e canola (Tabela 6).

Segundo a Tabela 6, ao estudar os cinco óleos das diferentes fontes vegetais, verifica-se que os mesmos apresentaram diferenças significativas quando utilizado o EPS produzido por *M. loti* Semia 816 na emulsificação. Nota-se que o óleo de soja com valor de IE₂₄ 84,1% foi semelhante ao encontrado para o óleo de girassol (79,02%), não diferindo entre si ($p > 0,05$). Quando avaliado o óleo de arroz, o mesmo apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao óleo de soja e não diferindo significativamente do óleo de girassol, milho e canola, com índices de emulsificação de 79,02%, 70,2% e 65,6%, respectivamente.

Os resultados se mostraram interessantes, uma vez que a relação EPS: óleo neste estudo foi menor (2:3 v/v) comparando ao estudado por Freitas et al. (2011) e Castellane et al. (2015), na proporção de (3:2 v/v), significando que uma menor quantidade de solução EPS produzido por *M. loti* Semia 816 é capaz de formar emulsões de forma eficaz. Também é importante destacar que não consta na literatura informações sobre a capacidade emulsificante de EPS produzido por *M. loti*.

De acordo com a literatura, as atividades emulsionantes de um EPS podem ser atribuídas a determinadas grupos funcionais no biopolímero, como por exemplo a presença de

ramnose ou acetil que proporcionam um pouco de hidrofobicidade ao EPS e, posteriormente, contribuem para a sua capacidade emulsionante (MAALEJ et al., 2016).

Para atuar como emulsificante um composto deve conter grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos, e quanto maior a capacidade emulsificante do material melhor a retenção de compostos. O EPS excretado pela bactéria *M. loti* Semia 816 é constituído por um arranjo de monossacarídeos como a glicose, galactose, manose e um teor considerável de ácido glicurônico, o qual influencia diretamente, pois torna o EPS altamente aniônico (polar). Contudo ainda apresenta cerca de 12% de proteína, possivelmente ligada covalentemente a esse arranjo molecular, o que pode contribuir para a sua capacidade emulsificante, apresentando-se como um excelente emulsificante natural.

Um critério para determinar a capacidade de estabilização de emulsão de um emulsionante consiste em avaliar a sua capacidade para manter pelo menos 50% do volume da emulsão original em 24 h após a sua formação (WILLUMSEN; KARLSON, 1997). Considerando este critério, o EPS produzido pela bactéria *M. loti* Semia 816 provou possuir propriedades promissoras, com capacidade de estabilizar emulsões para os óleos testados, permanecendo acima de 65% após 24 h.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EPSs

Conforme Francisco Junior (2008), informações adicionais sobre as estruturas químicas e características físico-químicas dos polissacarídeos é de fundamental importância para a sua utilização. A quantificação dos açúcares totais, proteínas totais e cinzas do EPS recuperado é apresentada na Tabela 7. Adicionalmente, também foram determinados para as gomas comerciais xantana e gelana, para fins de comparação.

Os teores de açúcares totais do EPS produzido neste trabalho com o processo de diálise apresentou valor de 82,54% em base seca, conforme a Tabela 7, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à goma xantana (87,78%), mas diferindo significativamente ($p < 0,05$) em relação à goma gelana (91,03%). Entretanto, a goma gelana não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à xantana comercial.

Tabela 7 - Teores de açúcares totais, proteínas totais e cinzas dos EPSs em base seca

EPS	Açúcares totais (%)	Proteínas totais (%)	Cinzas (%)
<i>M. loti</i> 816	82,54±0,35 ^b	11,31±0,9 ^a	5,99±0,87 ^a
Xantana	87,78±2,86 ^{a,b}	5,04±0,62 ^b	6,85±0,07 ^a
Gelana	91,03±2,45 ^a	3,23±0,93 ^b	5,44±0,50 ^a

*Valores (médias ± desvio padrão) com letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Aranda-Selverio et al. (2010) encontraram um teor de carboidratos em torno de 94,6% e 87% para *R. tropici* e *Mesorhizobium*, respectivamente. Já Monteiro et al. (2012) encontraram teores de açúcares totais de 85% e 80% para EPSs produzidos por *Rhizobium* e *Mesorhizobium*, respectivamente. Zhou et al. (2014) estudaram a produção de EPSs pela bactéria *R. radiobacter* S10 e encontraram um teor de açúcares de 84,5%.

Em relação ao teor de proteínas totais (Tabela 7), o EPS em estudo apresentou 11,31% em base seca, diferindo significativamente ($p < 0,05$) das gomas xantana (5,04%) e gelana (3,23%). O mesmo foi verificado por Ribeiro (2015), ao encontrar 11,31% de proteínas totais no EPS produzido pela bactéria *M. loti* Semia 816. Monteiro et al. (2012) e Aranda-Selverio et al. (2010) encontraram um teor de proteínas solúveis de 4% para espécies de *Rhizobium* e *Mesorhizobium*.

Na determinação de cinzas, os biopolímeros não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). O EPS em estudo apresentou teor de cinzas de 5,99%, não diferindo ($p > 0,05$) do encontrado para goma gelana comercial (5,44%) bem como ao apresentado pela xantana comercial, que apresentou um valor de 6,85% de cinzas. Zhou et al. (2014) determinaram um teor de cinzas de 0,32% no EPS de *R. radiobacter* S10.

Assim como a maioria dos EPSs produzidos por rizóbios, descritos na literatura (CASTELLANE et al., 2015; MONTEIRO et al., 2012; MORETTO, et al., 2015; SIMSEK, et al., 2009), foi possível observar um valor considerável de ácidos urônicos. Diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada entre o EPS produzido neste trabalho e a goma gelana, sendo encontrado teor de ácidos urônicos de 3,90±0,19% e 1,80±0,75%, respectivamente. Já quando comparado com a goma xantana (3,50±0,12%), não houve diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Castellane et al. (2015) encontraram, avaliando a composição de monossacarídeos de *R. tropici* 4077 e mutante 4077, valores de 4,58% e 0,08%, e 7,18% e 0,06%, respectivamente, para ácido glicurônico e galacturônico.

Monteiro (2011), ao caracterizar estruturalmente polissacarídeos produzidos por bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium*, encontrou teores de ácido urônico entre 0,8 e 12,7%. Moretto et al. (2015), na determinação da composição em monossacarídeos do EPS produzido por *Rhizobium* EPSLBMP-C04, encontraram quantidades de ácido glicurônico de 3,57%, e para *Rhizobium* EPSLBMP-C02 foi encontrado 10% de ácido galacturônico e traços de ácido glicurônico.

A presença de ácidos urônicos foi, desta forma, constatada para o EPS produzido pela bactéria *M. lotti* Semia 816. A presença de ácidos urônicos na molécula de EPS pode contribuir para a ionização do material e uma carga negativa do EPS. A presença de ácidos urônicos ou até mesmo piruvato determina o caráter polianiônico da maioria dos EPSs microbianos, promovendo assim alterações na sua conformação molecular e aumentando a sua solubilidade (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004; RADCHENKOVA et al., 2013).

De acordo com Castellane, Lemos e Lemos (2014), a presença de ácidos derivados de monossacarídeos (ácido glicurônico e ácido galacturônico), mesmo em baixas concentrações, torna um EPS ácido, e sua acumulação torna o heteropolissacarídeo altamente aniônico.

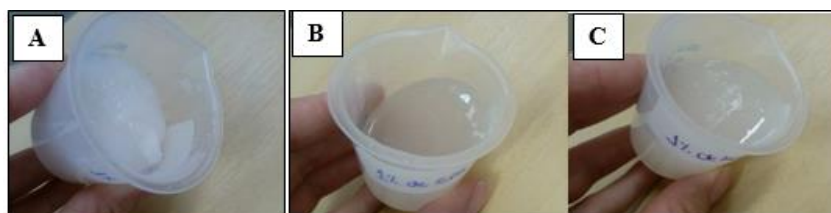
5.6 PERFIL DE TEXTURA INSTRUMENTAL DOS GÉIS FORMADOS

A partir da observação visual, o gel da goma gelana apresentou cor branca, com textura pegajosa. Contudo, era firme, mas muito frágil e tendia a quebrar facilmente (Figura 13A). Géis do EPS (Figura 13B) e da goma xantana comercial (Figura 13C) apresentaram aparência física semelhante, transparente e textura elástica.

A transparência da amostra é uma característica atraente de muitos géis. Este recurso pode ser modificado através de cores sintéticas, sólidos solúveis e sucos alimentares coloridos, de modo que o produto final possa possuir uma aparência translúcida (BANERJEE; BATTACHARYA, 2011).

A textura pode ser medida objetivamente (instrumentalmente) e subjetivamente (sensorialmente). A primeira é feita através de dispositivos instrumentais, os texturômetros, que imitam as condições de mastigação e apresentam correlação significativa com medidas de textura (SALDAÑA et al., 2015).

Figura 13 - (A) Gel proveniente da goma gelana; (B) Gel proveniente do EPS de *M. loti* Semia 816; (C) Gel proveniente da goma xantana



A partir das curvas força-deformação calculados pelo programa Texture Expert para TPA, cada tipo de gel mostrou diferentes características de textura. Na Tabela 8 são apresentados os valores médios com seus respectivos desvios-padrão para os atributos avaliados na análise instrumental do perfil de textura (TPA), dureza (DR), adesividade (AD), elasticidade (EL), coesividade (CS), gomosidade (GM) e mastigabilidade (MG) dos géis com adição dos hidrocoloides goma gelana, goma xantana e o EPS de *M. loti* Semia 816. As respostas das variáveis dependentes são médias de três repetições, sendo indicada a existência ou não de diferenças significativas a 95% de confiança.

Tabela 8 - Valores médios e desvios-padrão para os parâmetros dureza (DR), adesividade (AD), elasticidade (EL), coesividade (CS), gomosidade (GM) e mastigabilidade (MG), obtidas na análise instrumental do perfil de textura dos géis com adição de goma gelana (G), goma xantana (X) e EPS de *M. loti* Semia 816 (M) na concentração de 1% m/v.

EPS	Parâmetro					
	DR (g)	AD (N)	EL (%)	CS (%)	GM (N)	MG (N)
G	101,22±3,41 ^a	-3,83±0,99 ^a	0,93±0,90 ^a	0,60±0,06 ^a	60,90±9,30 ^a	57,06±7,40 ^a
X	6,50±0,35 ^b	-2,74±0,10 ^a	1,01±0,04 ^a	0,78±0,04 ^b	5,12±0,27 ^b	5,19±0,42 ^b
M	6,09 ±0,46 ^b	-1,60±1,65 ^a	1,35±0,32 ^a	0,93±0,08 ^b	5,71±0,95 ^b	7,93±3,02 ^b

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os EPSs a 95% de confiança ($p < 0,05$).

5.6.1 Dureza

Segundo Bourne (2002), dureza é a força necessária para deformar o produto em uma determinada distância. A dureza está relacionada com a resistência da estrutura do gel sob compressão (LAU; TANG, PAULSON, 2000).

O gel de gelana na concentração de 1% m/v claramente distinguiu-se dos outros géis. Um pico alto de dureza (101,22 g) foi observado, seguido por um pico mais baixo durante o primeiro ciclo de compressão. Isso está de acordo com a curva TPA encontrada por Koliandris et al. (2008) utilizando 0,6% de gel. Géis de xantana e do EPS de *M. loti* Semia 816, a uma concentração de 1% m/v, resultaram em valores de 6,50 g e 6,09 g, respectivamente, não apresentando diferenças significativas entre si, mostrando uma semelhança na resistência da estrutura do gel sob a compressão.

Com o resultado da análise (Tabela 8), para formar uma rede de gel com uma textura mais firme, coesa, a concentração de xantana, bem como a do EPS em estudo, deveriam ser superiores a 1% m/v.

5.6.2 Adesividade

É definida como o trabalho necessário para ultrapassar as forças de atração entre o material e a superfície da sonda. É dado pelo valor da área correspondente à força negativa. Analisando a Tabela 8, para o parâmetro adesividade não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os EPSs avaliados. Valor semelhante foi encontrado por Lima et al. (2013), ao analisar o perfil de textura de géis aquosos elaborados a partir da iota-carragenana da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* a 1,5% m/v, em que a adesividade foi $-1,37 \pm 0,001$.

5.6.3 Elasticidade

É uma medida em que a estrutura do gel é quebrada pela compressão inicial (SANDERSON, 1990). Quando se fala em elevada elasticidade, se refere quando a estrutura do gel é quebrada em poucos pedaços grandes, durante a primeira compressão. Enquanto a baixa elasticidade resulta do gel quebrando em pequenas peças, em grande quantidade. Géis menos elásticos, tais como pectina, carragenana e géis de ágar quebram mais facilmente durante a mastigação do que o gel de gelatina (MARSHALL; VAISEY, 1972). Os três géis analisados não diferiram significativamente a 95% de confiança ($p > 0,05$).

Segundo Nussinovitch (1997), os agentes não gelificantes, como a goma xantana e goma guar, e os agentes gelificantes, carragenana e goma de feijão de locusta, são usualmente combinadas para atingir o aumento da viscosidade ou propriedades superiores de géis alimentares, tais como uma maior elasticidade. A mistura de diferentes polissacarídeos oferece uma rota alternativa para o desenvolvimento de novas texturas. O interesse principal reside no

desenvolvimento de misturas sinérgicas com gelificação melhorada ou induzida (SAHA; BHATTACHARYA, 2010).

Já Nishinari et al. (1980) compararam géis de ágar (4,4% m/v) com géis de gelatina (25% m/v), e obteve uma elasticidade para os géis de ágar maior do que para géis de gelatina, enquanto que a força de fratura para géis de gelatina foi maior do que para géis de ágar. De acordo com Banerjee e Battacharya (2011), uma alta elasticidade é indesejável para produtos que são consumidos rapidamente, ou seja, produtos com vida útil reduzida.

5.6.4 Coesividade

Coesividade é uma medida do grau de dificuldade em que a estrutura interna do gel é quebrada ou a taxa na qual o material se desintegra em ação mecânica (BOURNE, 2002; SANDERSON, 1990; WOLF et al., 1989). A goma gelana (0,60%) se diferenciou significativamente ($p < 0,05$) da goma xantana (0,78%) e do EPS em estudo (0,93%). Segundo Handa, Takahashi e Froning (1998), isso indica o quanto a estrutura do gel permaneceu intacta após a primeira compressão, e para Antunes, Motta e Antunes (2003) a coesividade se relaciona com as forças envolvidas nas ligações internas do produto. Sendo assim, a estrutura de géis de xantana e do EPS de *M. loti* Semia 816 alcançaram uma coesividade maior do que a de géis da goma gelana.

5.6.5 Gomosidade

A gomosidade é caracterizada como a energia necessária para desintegrar um alimento semissólido para ser engolido sem ser mastigado e também definido como a força necessária para desintegrar o material (BOURNE, 2002; COSTA, 2015). Quanto maiores concentrações de biopolímero forem utilizadas na formulação de géis, maiores necessidades energéticas para desintegrar os géis serão requisitadas. Os resultados de dureza e gomosidade apresentam uma correlação, ou seja, com o aumento da dureza, conseqüentemente haverá aumento da gomosidade. Esse comportamento é conduzido pelas mesmas interações que governam a dureza e coesividade, pois a gomosidade é um produto destes dois parâmetros.

Os géis adicionados de goma xantana e do EPS de *M. loti* Semia 816 não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$), resultando em uma gomosidade de 5,12 N e 5,71 N, respectivamente. A gomosidade da goma gelana foi elevada (60,90 N), visto que esse comportamento se deve possivelmente pelas mesmas interações que influenciaram a dureza e a coesividade dos géis da gelana.

5.6.6 Mastigabilidade

Bourne (2002) define mastigabilidade como a força necessária para desintegrar o material. Apresenta uma relação com a gomosidade e a elasticidade, pois a mastigabilidade é produto desses dois parâmetros. Tem grande relação com a análise sensorial, onde é o número de mastigações necessárias para tornar o alimento com consistência adequada para ser engolido. Pode-se observar na Tabela 8 que não houve diferença significativa entre a goma xantana e o EPS em estudo, com valores de 5,19 N e 7,93 N respectivamente. Já a goma gelana comercial apresentou uma gomosidade de 57,06 N, enfatizando que a força e o tempo de mastigação necessário para desintegrar o gel é quase 11 vezes maior, quando comparado com a goma xantana e o EPS.

O gel da goma gelana parece ser um gel relativamente mais resistente, enquanto que um gel de xantana e EPS a 1% m/v comportam-se como um gel que possui características de tenacidade mais baixas.

Na indústria alimentícia, as gomas são usadas em concentrações baixas, entre 0,5 a 5% m/v, e de modo geral não contribuem para o aroma, paladar ou valor nutricional do produto (MENEZES et al., 2012; ROSALAM; ENGLAND, 2006). Contudo, exercem um papel importante no controle da textura, palatabilidade e na estabilização de muitos alimentos, principalmente os industrializados. Elas previnem ou retardam uma série de fenômenos físicos como a sedimentação de partículas sólidas suspensas no meio, a cristalização de açúcares, a agregação ou desagregação de partículas dispersas colaborando para uma maior aceitação do produto pelo consumidor (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009; MENEZES et al., 2012; PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011).

5.7 SINÉRESE DOS GÉIS COM ADIÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS

A sinérese nos géis é causada por um fenômeno natural designado pela expulsão de água a partir da estrutura do gel. Trata-se de um fenômeno indesejável que pode ser reduzido com a adição de hidrocoloides adequados. Conforme Sydansk (2007), a sinérese de um sistema gel-polímero depende de muitos fatores, do tipo e das quantidades dos componentes de polímero em gel, das condições de temperatura, pH, formação, água e cátions divalentes.

Os resultados obtidos na avaliação da gelana, goma xantana e do EPS produzido quanto à sinérese dos géis formados encontram-se representados na Tabela 9.

Os géis tipicamente utilizados em aplicações de modificação de perfil em alimentos partilham um fenômeno comum, denominado sinérese, no qual a fase solvente (água) se separa

da fase de gel, e como resultado ocorre o encolhimento do gel. A taxa desta separação determina o tempo de vida do gel sob qualquer dado conjunto de circunstâncias (ZHANG et al., 2015).

Tabela 9 - Sinérese (%) dos géis de xantana, gelana e do EPS sintetizado pela bactéria *M. loti* Semia 816 ao longo do armazenamento.

Dia	Goma	Sinérese (%)
1°	Xantana	NO
	Gelana	NO
	EPS	NO
2°	Xantana	NO
	Gelana	NO
	EPS	NO
3°	Xantana	NO
	Gelana	NO
	EPS	NO
4°	Xantana	NO
	Gelana	NO
	EPS	NO
5°	Xantana	1,99±1,40 ^{a,A}
	Gelana	NO
	EPS	1,78±0,92 ^{a,A}
6°	Xantana	2,52±1,15 ^{a,A}
	Gelana	0,36±0,32 ^{a,A}
	EPS	2,25±1,32 ^{a,A}
7°	Xantana	2,70±1,14 ^{a,A}
	Gelana	0,45±0,50 ^{a,A}
	EPS	2,32±1,32 ^{a,A}

*NO: Não Ocorreu;

*Letras minúsculas iguais para o mesmo dia de armazenamento indicam que não há diferença significativa entre os EPSs avaliados a 95% de confiança ($p>0,05$). Letras maiúsculas iguais para o mesmo EPS em dias de armazenamento diferentes indicam que não há diferença significativa ao longo do tempo a 95% de confiança ($p>0,05$).

A taxa de sinérese é definida como a diminuição do gel num dado tempo em relação ao peso inicial do gel (ZHANG et., 2015). Segundo a Tabela 9 todos os géis mostraram baixa sinérese, com valores menores que 3% após 7 dias de armazenamento não havendo diferença significativa entre as gomas em estudo, bem como os dias armazenamento. Com isso os géis só apresentaram sinérese a partir do 5° dia, como foi o caso da goma xantana e do EPS. No caso da goma gelana, apresentou água liberada somente a partir do 6° dia.

Braga e Cunha (2005) estudaram a sinérese de géis formados por xantana, caseinato e sacarose, onde a taxa de sinérese dos géis diminuiu à medida que as concentrações de xantana e sacarose aumentaram. Também foi observado um aumento da sinérese em função do tempo.

A sinérese é uma propriedade utilizada como um método simples para a medida da estabilidade de géis de amido, que envolve o desenvolvimento de água livre na matriz deste após resfriamento. Posteriormente ao armazenamento a baixas temperaturas, ocorre a expulsão de água destes géis de amido, em consequência da reassociação das cadeias de amilose e amilopectina, formando uma matriz de líquido por todo o gel (SWEEDMAN et al., 2013).

Do mesmo modo, a sinérese é uma propriedade negativa para géis e produtos produzidos a partir do amido vista como um indicador de deterioração, pois torna os géis e produtos mais rígidos, o que pode levar a rejeição destes produtos, tornando assim de grande importância a prevenção ou retardo desta (TENG; CHIN; YUSOF, 2011). Uma alternativa seria o uso desses hidrocolóides como acompanhantes nas formulações a base de amido, pois alguns têm a capacidade de envolver os grânulos de amido durante a gelatinização, retardando assim a sinérese. Segundo Chaisawang e Sphantharika (2006), isso pode ser atribuído a muitos fatores principalmente à estrutura molecular das gomas e as cargas iônicas existentes entre ambos (amido e goma).

6 CONCLUSÃO

O EPS produzido a partir da bactéria diazotrófica *Mesorhizobium loti* Semia 816 utilizando glicerol residual como fonte de carbono foi caracterizado quanto às suas propriedades reológicas, perfil de textura, sinérese dos géis e capacidade emulsificante, bem como composição química, comparando com as gomas comerciais xantana e gelana.

Soluções aquosas a 1% m/v do EPS e das gomas xantana e gelana apresentaram um comportamento pseudoplástico, evidenciado pelo bom ajuste dos dados experimentais ao modelo de Ostwald-de-Waele, com valores de “n” menores que 1 para todas as gomas. As viscosidades observadas para uma taxa de cisalhamento de 38 s^{-1} foram de 772 mPa.s, 2895 mPa.s e 570 mPa.s, respectivamente, para xantana, gelana e EPS de *M. loti* Semia 816.

A viscosidade de soluções aquosas a 1% m/v foi afetada pela presença de sais, com tendência de redução de viscosidade para gelana e aumento de viscosidade para xantana e EPS de *M. loti* Semia 816. Para este último, a adição de KCl 1 mol L^{-1} e NaCl 1 mol L^{-1} elevou a viscosidade aparente da solução a 38 s^{-1} para 823 mPa.s e 1502 mPa.s, respectivamente, sendo três vezes superior com a presença do eletrólito NaCl.

O EPS de *M. loti* Semia 816 foi capaz de formar emulsões com os óleos vegetais testados (arroz, soja, girassol, milho e canola), com valores de índice de emulsificação em 24 h superiores a 65%, com destaque para o óleo de soja (84,1%) e óleo de girassol (79,02%), indicando potencial de aplicação na formação e estabilização de emulsões.

Os géis de xantana e EPS (1% m/v) demonstraram comportamentos similares quanto aos parâmetros de textura instrumental (dureza, adesividade, elasticidade, coesividade, gomosidade e mastigabilidade), entretanto os géis de gelana (1% m/v) mostraram-se bem mais resistentes. A sinérese dos géis foi baixa, com valores inferiores a 3% após 7 dias de armazenamento, indicando seu potencial em retardar a sinérese em géis.

Quanto à sua composição o EPS de *M. loti* Semia 816 apresentou teores de proteínas bem superiores (11,31%) aos encontrados na gelana (3,23%) e xantana (5,04%), enquanto que os teores de ácidos urônicos (3,90%) e açúcares totais (82,54%) foram similares aos encontrados para xantana (3,50% e 87,78%, respectivamente).

Desta forma, o EPS de *M. loti* Semia 816 mostrou propriedades similares à goma xantana, portanto com potenciais aplicações em diversas áreas, como alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos e meio ambiente, demonstrando poder constituir uma alternativa a produtos comerciais já existentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHAYUTHAKAN, P.; SUPHANTHARIKA, M.; RAO, M. A. Yield stress components of waxy corn starch–xanthan mixtures: Effect of xanthan concentration and different starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 469-478, 2006.
- ALMEIDA, M. S. **Avaliação e caracterização de goma xantana sintetizada a partir de resíduos aquícolas e de glicerol como fonte de carbono**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Ambiental) – Universidade Tiradentes – Aracajú.
- AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 179-186, 2009.
- ANDHARE P.; DELATTRE, C.; PIERRE, G.; MICHAUD, PHILIPPE; PATHAK, H. Characterization and rheological behaviour analysis of the succinoglycan produced by *Rhizobium radiobacter* strain CAS from curd sample. **Food Hydrocolloids**, v. 64, p. 1-8, 2017.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. Farmacotécnica: Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. **Editorial Premier**, p. 398-400, 2000.
- ANTUNES, A. E. C.; MOTTA, E. M. P.; ANTUNES, A. J. Perfil de textura e capacidade de retenção de água de géis ácidos de concentrado protéico de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.183-189, 2003.
- AOAC, **Official Methods of Analysis**, 17th ed. Washington, DC. Association of Official Analytical Chemists, 2000. CD-ROM.
- AOAC, **Official Methods of Analysis**.17th ed. Gaithersburg, MD. Association of Official Analytical Chemists, 2003. CD-ROM.
- ARANDA-SELVERIO, G. **Propriedades reológicas de exopolissacarídeos produzidos por bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium***. 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto – SP.
- ARANDA- SELVERIO, G.; PENNA, A. L. B.; CAMPOS-SÀ, L. F.; JUNIOR, O. S.; VASCONCELOS, A. F. D.; SILVA, M. L. C.; LEMOS, E. G. M.; CAMPANHARO, J. C.; SILVEIRA, J. L. M. Propriedades reológicas e efeito da adição de sal na viscosidade de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*. **Química Nova**, v. 33, p. 895-899, 2010.
- AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2^a ed., São Paulo: Artmed, 2005.
- BAE, Y.; OHA, I.; LEE, S.; YOO, S.H.; LEE, H.G. Rheological characterization of levan polysaccharides from *Microbacterium laevaniformans* **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 10–13, 2008.

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

BANERJEE, S.; BHATTACHARYA, S. Compressive textural attributes, opacity and syneresis of gels prepared from gellan, agar and their mixtures. **Journal of Food Engineering**, v. 102, 287-292, 2011.

BEMILLER, J. N. Pasting, paste, and gel properties of starch-hydrocolloid combinations. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 386-423, 2011.

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

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**, v. 39, p.151-161. 1987.

BOURNE, M. C. **Food texture and viscosity: Concept and measurement**. New York: Academic Press, 2002.

BRAGA, A. L.M.; CUNHA, R. L. The effect of sucrose on unfrozen water and syneresis of acidified sodium caseinate–xanthan gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 33–38, 2005.

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

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

CARMONA, J. A.; RAMIREZ, P.; CALERO, N.; MUÑOZ, J. Large amplitude oscillatory shear of xanthan gum solutions. Effect of sodium chloride (NaCl) concentration. **Journal of Food Engineering**, v.126, p. 165-172, 2014.

CASTELLANE, T. C. L. **Obtenção e avaliação de mutantes *exoZ-* e *phbB-* envolvidos no metabolismo de polímeros de carbono em *Rhizobium tropici* Semia 4080 com potencial biotecnológico**. 2011. 115 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, São Paulo - SP.

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**, v. 42, n. 10, p. 1503-1506, 2007.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. Determinação da massa molecular de exopolissacarídeos produzidos por estirpe mutante de *Rhizobium tropici*. **Ciencia & Tecnologia: FATEC-JB**, v. 8, Edição Especial, 2016.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 191–197, 2014.

CASTELLANE, T. C. L.; CAMPANHARO, J. C.; COLNAGO, L. A.; COUTINHO, I. D.; LOPES, E. M.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. M. Characterization of new exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 361-369, 2017.

CASTELLANE, T. C. L.; PERSONA, M.R.; CAMPANHARO, J. C.; LEMOS, E. G. M. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 515-522, 2015.

CHAI SAWANG, M.; SUPHANTHARIKA, M. Pasting and rheological properties of native and anionic tapioca starches as modified by guar gum and xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 5, p. 641 – 649, 2006.

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

CHOI, S. G.; KERR, W. L. Water mobility and textural properties of native and hydroxypropylated wheat starch gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n. 1, p. 1-8, 2003.

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

COSTA, R. A. S. **Efeito da adição de hidrocolóides (goma guar e goma xantana) nas propriedades de textura e sinérese de géis de amido de araruta**. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Campus Junvino Oliveira, Itapetinga – BA.

COVIELLO, T. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 119, p. 5-24, 2007.

DEVI, S. E.; VIJAYENDRA, S. V. N.; SHAMALA, T. R. Exploitation of rice bran, an agro-industrial waste, for the production of intra- and extra-cellular polymers by *Sinorhizobium meliloti* MTCC 100. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1 p. 80-84, 2012.

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

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**, v. 25, n.1, p. 15-28, 2004.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at surfaces and the influence on the properties of dispersed system. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 25–39, 2003.

DING, G.B.; NIE, R. H.; LV, L.H.; WEI, G. Q.; ZHAO, L. Q. Preparation and biological evaluation of a novel selenium-containing exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613. **Carbohydrate Polymers**, v. 109, p. 28-34, 2014.

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

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

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

FARIA, L. H. G. B. **Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias isoladas de amostras de solo**. 2002. 162 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto – SP.

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

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

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ALMEIDA, J. P. S.; PASSOS, S. R.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G. R. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios isolados de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1465-1471, 2010.

FERREIRA, M. O. **Purificação da glicerina bruta obtida a partir da transesterificação do óleo algodão**. 2009. 127 f. Dissertação (Mestrado Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - RN.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Compendium of food additives specifications**, addendum 7. Rome: FAO/WHO, 1999.

FRANCISCO JUNIOR, W. E. Carboidratos: Estrutura, Propriedades e Funções. **Química Nova na Escola**, n. 29, p. 8-13, 2008.

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

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

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; TORRES, C. A. V.; CRUZ, M.; SOUSA, I.; MELO, M. J.; RAMOS, A. M.; REIS, M. AM.. Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolated *Enterobacter* strain A47 DSM 23139. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 159-165, 2011.

FRIZZO, M. L. S. **Seleção e caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* l. e *Lotus uliginosus* schkuhr.** 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre- RS.

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

GEISE, J. Developments in beverage additives. **Food Technology**, v. 49, n.9, p. 64-72, 1995.

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

HANDA, A.; TAKAHASHI, N.K.; FRONING, G.W. Heat-induced egg white gels as affected by pH. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 3, p. 403-407, 1998.

HLEAP, J. I.; VELASCO, V. A. Análisis de las propiedades de textura durante el almacenamiento de salchichas elaboradas a partir de tilapia roja (*Oreochromis* sp.). **Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario**, v. 8, n. 2, p. 46-56, 2010.

HUSSAIN, A.; ZIA, A. M.; TABASUM, S.; NOREEN, A.; ALI, M.; IQBAL, R.; ZUBE, M. Blends and composites of exopolysaccharides: Properties and applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 10-27, 2016.

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**, v. 156, p. 522-531, 2005.

KAMBOUROVA, M.; MANDEVA, R.; DIMOVA, D.; POLI, A.; NICOLAUS, B.; TOMMONARO, G. Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by

Geobacillus tepidamans V264 isolated from Bulgarian hot spring. **Carbohydrate Polymers**, v.77, p338-343, 2009.

KARR, D. B.; RONG-TI, L.; REUHS, B. L.; EMERICH, D. W. Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation. **Planta**, v. 211, p. 218-226, 2000.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 81-84, 1998.

KIM, H. S.; PATEL, B.; BEMILLER, J. N. Effects of the amylose–amylopectin ratio on starch–hydrocolloid interactions. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1438-1448, 2013.

KOLIANDRIS, A.; LEE, A.; FERRY, A-L.; HILL, S.; MITCHELL, J. Relationship between structure of hydrocolloid gels and solutions and flavour release. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p.623-630, 2008.

KLAIC, P. M. A.; VENDRUSCOLO, C. T.; FURLAN, L.; MOREIRA, A. S. Ion exchange as post-fermentative process enhancer of viscosity of xanthan produced by *Xanthomonas arboricola* pv pruni. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 118-126, 2016.

KRSTONOSIC, V.; DOKIC, L.; DOKIC, P.; DAPCEVIC, T. Effects of xanthan gum on physicochemical properties and stability of corn oil in- water emulsions stabilized by polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2212–2218, 2009.

KUMAR, A. S.; MODY, K.; JHA B. Bacterial exopolysaccharide – A perception. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, p. 103-117, 2007.

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.

LAU, M. H.; TANG, J.; PAULSON, A. T. Texture profile and turbidity of gellan/gelatin mixed gels. **Food Research International**, v. 33, p. 665-671, 2000.

LIMA, T. B.; HOLANDA, M. L.; CAETANO, L. F.; MAGALHÃES, H. C.; CASTRO, G. M. C.; BENEVIDES, N. M. B. Perfil de textura de géis aquosos elaborados a partir da iota-carragenana da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 331-335, 2013.

LINDSTROM, J. E.; BARRY, R. P.; BRADDOCK, J. F. Microbial community analysis: A kinect approach to constructing potential carbon source utilization patterns. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 231-239, 1998.

LIU, W.; NORISUYE, T. Order-disorder conformation change of xanthan in 0.01M aqueous sodium chloride: dimensional behavior. **Biopolymers**, v. 27, p. 1641-1654, 1988.

LOPES, L.; ANDRADE, C. T. Polímeros de origem microbiana: Polissacarídeos bacterianos. **Revista de Química Industrial**, v. 703, p. 19-23, 1995.

LOPES, L.; ANDRADE, C. T.; MANO, E. B. O valor das gomas para as indústrias. **Ciência Hoje**, v. 12, n. 71, p. 65-67, 1991.

LUVIELMO, M. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Goma xantana: Produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, n. 1 p. 50-67, 2009.

MACHADO JR, F. R. S.; MICHELON, M.; DALCANTON, F.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Biomass production by *Yarrowia lipolytica* as a source of lipids: Bench scale cultivation on raw glycerol-based medium. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 3, p. 1253-1260, 2015.

MAALEJ, H.; HMIDET, N.; BOISSET, C.; BAYMA, E.; HEYRAUD, A.; NASRI, M. Rheological and emulsifying properties of a gel-like exopolysaccharide produced by *Pseudomonas stutzeri* AS22. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 634- 647, 2016.

MAALEJ, H.; MOALLA, D.; BOISSET, C.; BARDAA, S.; AYED, H. B.; SAHNOUN, Z.; REBAIC, T.; NASRI, M.; HMIDET, N. Rheological, dermal wound healing and in vitro antioxidant properties of exopolysaccharide hydrogel from *Pseudomonas stutzeri* AS22. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.123, p. 814-824, 2014.

MARCOTTE, M.; TAHERIAN, H. A. R.; RAMASWAMY, H. S. Rheological properties of selected hydrocolloids as function of concentration and temperature. **Food Research International**, v. 34, n. 8, p. 695- 703, 2001.

MARSHALL, S. G.; VAISEY, M. Sweetness perception in relation to some textural characteristics of hydrocolloid gels. **Journal of Texture Studies**, v. 3, p. 173-185, 1972.

MCCLEMENTS, D. J. Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 173–177, 2000.

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

MELO, I.R.; PIMENTEL, M.F.; LOPES, C.E.; CALAZANS1, G.M.T. Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis* **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 45-51, 2008.

MENEZES, J. D. S.; DRUZIAN, J. I.; PADILHA, F. F.; SOUZA, R. R. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 8, n. 8, p. 1761-1776, 2012.

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

MILES, M. J.; MORRIS, V. J.; ORFORD, D.; RING, S. G. The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. **Carbohydrate Research**, v. 135, p. 271-281, 1985.

MONTEIRO, N. K. **Caracterização estrutural de polissacarídeos produzidos por bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium***. 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, Campus São José do Rio Preto, São José do Rio Preto - SP.

MONTEIRO, N. K.; EXPOSTI, D. T. D.; SILVA, M. L. C.; LEMOS, E. G. M.; CAMPANHARO, J. C.; SILVEIRA, J. L. M. Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p.705-708, 2012.

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**. 4.ed. Rio de Janeiro: Ed LTC, 2004, 512 p.

MORAES, I. C. F.; FASOLIN, L. H.; CUNHA, R. L.; MENEGALLI, F. C. Dynamic and steady-shear rheological properties of xanthan and guar gums dispersed in yellow passion fruit pulp (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*). **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 3, p. 483 - 494, 2011.

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

MORETTO, C., CASTELLANE, T.C.L., LOPES, E.M., OMORI, W.P., SACCO, L.P.; LEMOS, E.G.M. Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by 178 four isolates of rhizobia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 291– 298, 2015.

MORRIS, E. R. Rheology of xanthan: Suspension of particles and stabilization of emulsions. **Food & Ingredients Journal of Japan**, v. 167, p. 31-36, 1996.

MUNHOZ, M. P.; WEBER, F. H.; CHANG, Y. K. Influência de hidrocolóides na textura de gel de amido de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 403-406, 2004.

NISHINARI, K.; SAYED, EL. T.; CHATAIN, D.; LACABANNE, C. Rheological properties of pullulan by TSCr. **Rheology**, New York: Ed. Plenum press, 1980, p.533-537.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Food Science and Technology**, v. 18, p. 252-259, 2007.

NUSSINOVITCH, A. **Hydrocolloid applications—gum technology in the food and other industries**. London: Blackie Academic and Professional, 1997, p. 765-778.

OLIVEIRA, J. D. **Efeito da fonte e concentração de nitrogênio na produção de biopolímero por *Aureobasidium pullulans***. 2010. 152 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro - RJ.

OZTURK, B.; MCCLEMENTS, D. J. Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. **Current Opinion in Food Science**, v. 4, p. 1-6, 2016.

PALANIRAJ, A.; JAYARAMAN, V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Food Engineering**, v. 106, p. 1-12, 2011.

PASQUEL, A. Gomas: Utilização e aspectos reológicos. **Boletim da SBCTA**, v. 33 p. 86-97, 1999.

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.

PRADELLA, J. G. C. 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.redetec.org.br/wp-content/uploads/2015/02/tr06_biopolimeros.pdf. Acesso em 24 de set. 2015, 16:45:00.

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

PRIYANKA, P.; ARUN, A. B.; ASHUWINI, P.; REKHA, P.D. Versatile properties of an exopolysaccharide R-PS18 produced by *Rhizobium* sp. PRIM-18. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, p. 215-221, 2015.

PROMÉ, J. C.; FERRO, M.; DEBELLÉ, F.; PROMÉ, D.; KRISNAN, H. B. The pivotal role of tandem mass spectrometry in structural determinations of nod factors produced by *Rhizobia*. Nod factors produced by wild-type strains of *Mesorhizobium huakii* and *Rhizobium* sp. *mus10*. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 219, p. 703-716, 2002.

RADCHENKOVA, N.; VASSILEV, S.; PANCHEV, I.; ANZELMO, G.; TOMOVA, I.; NICOLAUS, B.; KUNCHEVA, M.; PETROV, K.; KAMBOUROVA, M. Production and properties of two novel exopolysaccharides synthesized by a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 31-43, 2013.

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

RIBEIRO, V. A. **Produção e caracterização de exopolissacarídeos a partir de bactérias diazotróficas cultivadas em meios à base de glicerol residual**. 2015. 192 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Campus de Rio Grande, Rio Grande – RS.

RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V. Exopolysaccharides produced by *Rhizobium*: Production, composition and rheological properties. **Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry**, v. 4, p. 1-6, 2016.

RINAUDO, M.; MILAS, M. Physicochemical properties of polysaccharides in relation to their molecular structure. **Industrial Polysaccharides**, p. 217-223, 1987.

RIOS, D. A. S.; BORBA, T. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, J. F. M. Rice parboiling wastewater in maximization of carotenoids bioproduction by *Phaffia rhodozyma*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, p. 401-410, 2015.

ROLLER, S.; DEA, I. C. M. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, p. 2161-277, 1992.

ROSA, C. F.; MICHELON, M.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Production of a rhamnolipid-type biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* LBM10 grown on glycerol. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 9012-9017, 2010.

ROSA, C. F. C.; MICHELON, M.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Effect of medium composition on changes of surface tension during cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* LBM10 growing on glycerol. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 5, n. 4, p. 41-46, 2015.

ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 197-207, 2006.

ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp para a produção de goma xantana**. 2005. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Campus Erechim, Erechim - RS.

SAHA, D.; BHATTACHARYA, S. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: A critical review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 6, p. 587-597, 2010.

SALDAÑA, E.; BEHRENS, J.H.; SERRANO, J. S.; RIBEIRO, F.; ALMEIDA, M. A.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. Microstructure, texture profile and descriptive analysis of texture for traditional and light mortadela. **Food Structure**, v. 6, p. 113-20, 2015.

SANDERSON, G. R. Gellan gum. **Food gel: Elsevier Science Publishers**, p. 201-232, 1990.

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

SANTOS, E.; MICHELON, M.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Evaluation of the composition of culture medium for yeast biomass production using raw glycerol from biodiesel synthesis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 432-440, 2012.

SANTOS, E. O.; MICHELON, M.; GALLAS, J. A.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Raw glycerol as substrate for the production of yeast biomass. **International Journal of Food Engineering**, v. 9, p. 413-420, 2013.

SILVA, C. M.; BORBA, T. M.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* using raw glycerol as an additional carbon source. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, Article 18, p. 1-17, 2012.

SILVA, C. M.; BORBA, T. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, J. F. M. Raw glycerol and parboiled rice effluent for carotenoid production: Effect of the composition of culture medium and initial pH. **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, p. 489-496, 2016.

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

SILVA, M. F.; FORNARI, R. C. G.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F. F.; CICHOSKI, A. J.; CANSIAN, R. L.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 119-123, 2009.

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

SOUSA, M.; DANTAS, I. T.; FELIX, A. K. N.; SANT'ANA, H. B.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Crude glycerol from biodiesel industry as substrate for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 2, p. 295-301, 2014.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

SOUZA, E. E. **Síntese e caracterização de membranas de celulose regenerada a partir de celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar para produção de cuprofan.** 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG.

SHIH, I.; CHEN, L.; WUB, J. Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 111–117, 2010.

SPIER, F.; BUFFON, J. G.; BURKERT, C. A. V. Bioconversion of raw glycerol generated from the synthesis of biodiesel by different oleaginous yeasts: Lipid content and fatty acid profile of biomass. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 415-422, 2015.

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

SWEEDMAN, M. C.; TIZZOTTI, M. J.; SCHAFFER, C.; GILBERT, R. G. Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v.92, p. 905-920, 2013.

SYDANSK, R. **Polymers, Gels, Foams, and Resins: Petroleum Engineering Handbook**, ed. 2, Richardson, TX: SPE, 2007.

SUN, F.; HUANG, Q.; WU, J. Rheological behaviors of an exopolysaccharide from fermentation medium of a *Cordyceps sinensis* fungus (Cs-HK1). **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 506-513, 2014.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative. **International Dairy Journal**, n. 11, p. 663-674, 2001.

TENG, L. Y.; CHIN, N. L.; YUSOF, Y. U. Rheological and textural studies of fresh and freeze-thawed native sago starch-sugar gels. I. Optimization using response surface methodology. **Food Hydrocoloids**, v. 25, p. 1530-1537, 2011.

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**, v. 7, n. 2, p. 181-204, 2005.

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

TRINDADE, A. R.; MUNHOZ, P. A.; BURKERT, V. A. C. Raw glycerol as an alternative carbon source for cultivation of exopolysaccharide-producing bacteria. **Journal of Applied Biotechnology**, v. 3. n. 2. p. 61-73, 2015.

TRIVENI, R.; SHAMALA T. R.; RASTOGI, N. K. Optimised production and utilisation of exopolysaccharide from *Agrobacterium radiobacter*. **Process Biochemistry**, v. 36 p. 787–795, 2001.

VETTORI, M. H. P. B.; FRANCHETTI, S. M. M.; CONTIERO, J. Structural characterization of a new dextran with a low degree of branching produced by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B dextranase. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 1440– 1444, 2012.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, p. 415-423, 1997.

WOLF, C. L.; BEACH, S.; LA VELLE, W. M.; CLARK, R. C. Gellan gum/gelatin blends. US patent 4876105, 1989.

XU, L.; DONG, M.; GONG, M.; GONG, H.; SUN, M.; LI, Y. Effects of inorganic cations on the rheology of aqueous welan, xanthan, gellan solutions and their mixtures. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 147-154, 2015.

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

YADAV, K. L.; RAHI, D. K.; SONI, S. K. Bioemulsifying potential of exopolysaccharide produced by an indigenous species of *Aureobasidium pullulans* RYLF10. **PeerJ Preprint Archives**, v. 1, p. 1-6, 2014.

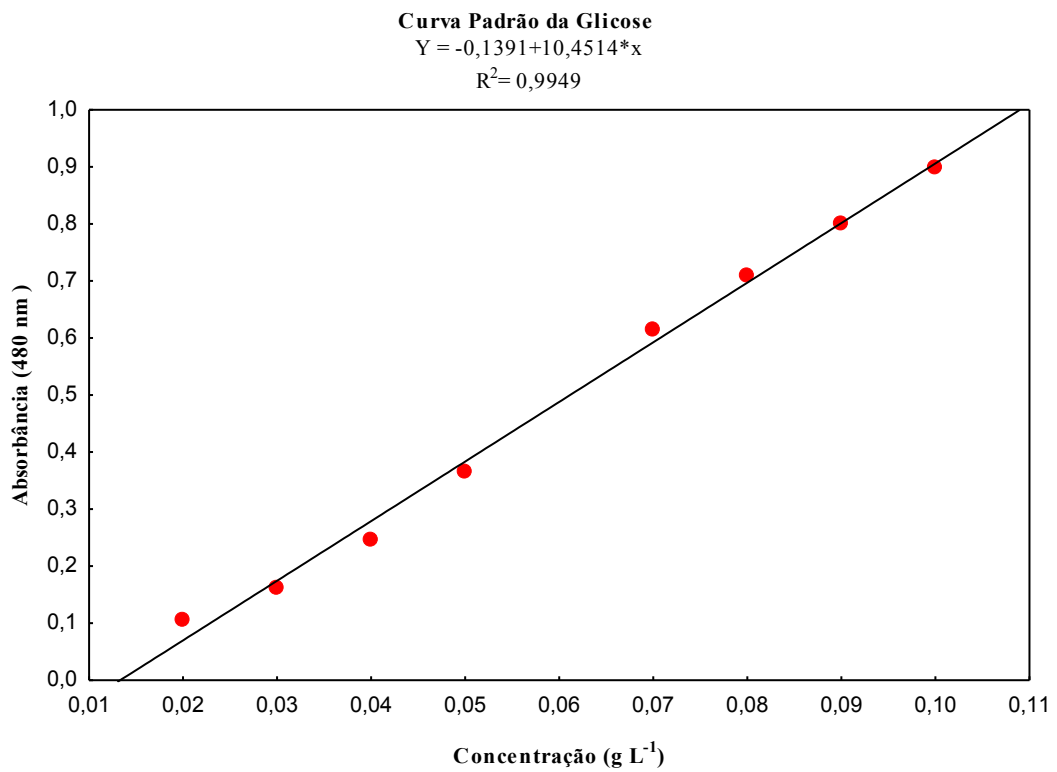
YAMIN, F. F.; LEE, M.; POLLAK, L. M.; WHITE, P. J. Thermal properties of starch in corn variants isolated after chemical mutagenesis of inbred line B73. **Cereal Chemistry**, v. 76, n.2, p. 175-181, 1999.

YOUNES, A.; ACHOMAK W.; MAROL, C.; HEULIN, T. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflower roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3393-3398, 2000.

ZHANG, G.; CHEN, L.; GE, J.; JIANG, P.; ZHU, X. Experimental research of syneresis mechanism of HPAM/Cr³⁺ gel. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 483, p. 96-103, 2015.

ZHAO, L.; CHEN, Y.; REN, S.; HAN, Y.; CHENG, H. Studies on the chemical structure and antitumor activity of an exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 637–643, 2010.

ZHOU, F.; WU, Z.; CHEN, C.; HAN, J.; AI, L.; GUO, B. Exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey and their rheological properties. **Food Hydrocolloids**. v. 36, p. 362-368, 2014.

APENDICE I**Figura I. 1 - Curva padrão da glicose para determinação de açúcares totais.****Figura I. 2 - Curva padrão do ácido glicurônico para determinação de ácido urônico.**