Caracterização Reológica e Coloidal de Xantana Biossintetizada a partir de Glicose

Rheological and Colloidal Characterization of Xanthan Biosynthesized from Glucose

Kátia M. de O. Almeida,^a Alan R. de Oliveira,^a Juliano R. Pereira,^a Jeferson G. da Silva,^a Humberto M. Húngaro,^b Mirian P. Rodarte,^b Priscila L. Sequetto,^a Ângelo M. L. Denadai^{a,*}

^a Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia, Departamento de Farmácia, Campus Governador Valadares, CEP 35010-177, Governador Valadares-MG, Brasil.

^b Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Campus Juiz de Fora, CEP 36036-900, Juiz de Fora-MG, Brasil.

*E-mail: angelo.denadai@ufjf.edu.br

Recebido em: 26 de Maio de 2020

Aceito em: 20 de Abril de 2021

Publicado online: 27 de Setembro de 2021

Xanthan gum is a polysaccharide biosynthesized by *Xanthomonas campestris* and is generally used as a thickener in the food and pharmaceutical industries. In the present work, samples of xanthan (duplicate) were biosynthesized from glucose and characterized from the structural, colloidal and rheological viewpoints intending to evaluate their aggregation state in aqueous solution, especially their thickening effect. Initially, the integrity of the compounds was confirmed by FTIR and TGA/DTA. In solution, the state of aggregation was evaluated by electrical conductivity, viscosity, light scattering (DLS) and zeta potential (ZP) titrations. Stationary and oscillatory rheological tests were used to evaluate the degree of structuring of the solutions, as well as the thickening effect. FTIR spectra and thermal analysis were similar to other samples described in the literature. Titrations showed a gradual increase in the hydrodynamic diameter (D_h), in the zeta potential module $|ZP|$ and in the viscosity (η), with two inflections, called critical overlap concentration ($c^* \approx 0.1$ g/L) and critical aggregation concentration ($c^{**} \approx 0.75$ g/L), which in turn separate three states of aggregation. The stationary rheological tests showed strong pseudoplastic behavior and reasonable thickening effect at 2.0 g/L. Finally, the oscillatory rheological studies showed that the suspensions at 2.0 g/L behaved as viscoelastic liquid type, with thickening effect attributed to the intermolecular structuration.

Keywords: Xanthan; biopolymer; rheology; thickener; aggregation.

1. Introdução

A xantana é um polissacarídeo de origem microbiana que tem atraído grande atenção das indústrias alimentícia, farmacêutica e petrolífera,¹⁻² desde sua descoberta em 1950, apresentando estimativa de produção mundial superior a 86.000 t/ano.³ Este fato se deve às suas importantes propriedades espessantes e ao seu baixo custo de produção.^{4,5}

Este biopolímero é geralmente obtido por processos de fermentação, utilizando cepas de bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459.⁶ Do ponto de vista estrutural, é ramificado, hidrofílico e possui elevada massa molar, possuindo estrutura primária composta por repetidas unidades sacarídicas D-glicose (D-Glc), D-manose-acetil-ester (D-Man-Ac), ácido glucurônico (AGlc) e D-manose-piruvato (D-Man-P). Sua cadeia principal é constituída de unidades β -D-glicose ligadas nas posições 1 e 4, apresentando estrutura idêntica à da celulose (Figura 1).⁶⁻⁸

Figura 1. Estrutura molecular de xantana

Por ser atóxica, biocompatível e estável numa ampla faixa de temperatura e pH, em 1969 a xantana foi aprovada para uso em alimentos nos Estados Unidos, pelo *Food and Drug Administration* (FDA).⁹ Em 1980, a Comunidade Econômica Europeia também incluiu o biopolímero na lista de emulsificantes e estabilizantes, com o código E-415.¹⁰ No Brasil, seu uso é permitido desde 1965, pelo Decreto de Lei nº 55871, da Legislação Brasileira de Alimentos, revisada pela Resolução CNS/MS nº 04 de 24 de novembro de 1988.¹¹ Os países que se destacam como maiores produtores do biopolímero são: Estados Unidos (empresas Merck e Pfizer), França (empresas Rhone Poulenc e Sanofi-Elf), Áustria (empresa Jungbunzlauer) e China (empresa Saidy Chemical).¹⁰⁻¹¹

A estrutura baseada em monossacarídeos é rica em hidroxilas e ligações éter, que apresentam elevada capacidade de formação de ligações de hidrogênio com moléculas de água, o que implica em elevado grau de hidratação e solubilidade aquosa. Os grupos piruvato e acetil, ligados às cadeias trissacarídicas laterais conferem ionicidade à xantana, a qual comporta-se como poliânion, geralmente ligado a Na⁺ e K⁺, que além de potencializar a solubilidade, também definem a conformação molecular.¹²

As propriedades coloidais e reológicas da xantana derivam-se, em grande parte, da presença de cargas ao longo da cadeia, que por sua vez levam a uma conformação helicoidal ordenada (simples ou dupla-hélice) em solução, onde as cadeias laterais trissacarídicas alinham-se à cadeia principal estabilizando a conformação por ligações não covalentes, além de possíveis fenômenos de agregação.^{12,13} Este fato, associado à extensa possibilidade de interação com moléculas de água, faz com que as cadeias possam sofrer uma significativa expansão no meio aquoso. A consequência é um pronunciado aumento da viscosidade de suas soluções aquosas, mesmo em baixas concentrações. Por esse motivo, é muito utilizada como espessante.^{3,13,14}

O biopolímero pode ser produzido de maneira relativamente fácil, empregando uma fonte de carbono, em condições controladas do processo fermentativo. Dentre os substratos mais estudados para a biossíntese, estão os resíduos agroindustriais, tais como: melaço de cana,¹⁵ soro do leite^{16,17} e os lignocelulósicos.¹⁸ Apesar da busca por fontes alternativas, glicose e sacarose ainda são os substratos mais utilizados para a produção comercial da goma.⁸ Isso pode ser justificado pela facilidade de se encontrar estes açúcares, além do produto da biossíntese ser mais puro e homogêneo.

O Brasil é um grande produtor de sacarose e de outros insumos oriundos do setor sucroalcooleiro, tais como extrato de levedura e álcool, que poderiam ser utilizados como matéria-prima na produção do composto.⁵ Apesar disso, quase toda a goma utilizada no país é importada, resultando em um alto custo anual. Em 2016, o Brasil chegou a importar 5,3 milhões de Kg, gastando 16 milhões de dólares.¹⁹ A capitalização mundial de mercado da xantana excede 400 milhões de dólares por ano,^{20,21} onde

65% do volume total produzido no mundo é usado pela indústria alimentícia, 15% pela indústria petrolífera e cerca de 20% para outras aplicações.²² Isto torna a implantação de indústrias especializadas na sua produção uma ação estratégica para atender à demanda nacional e internacional, a qual aumenta constantemente, com crescimento estimado a uma taxa anual de 5 a 10%.^{8,14,18}

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo, biossintetizar xantana a partir de glicose, utilizando o microrganismo *Xanthomonas campestris*, além de realizar sua caracterização, visando avaliar seu estado de agregação e comportamento reológico em solução aquosa. A glicose foi escolhida como substrato por ser uma fonte de carbono preferencial para a produção do biopolímero.^{8,10}

Sendo assim, as amostras de xantana foram biossintetizadas e caracterizadas do ponto de vista estrutural e coloidal em solução, buscando uma maior compreensão dos sistemas na escala molecular, supramolecular e reológica. Para a caracterização molecular foram identificados os principais grupos funcionais dos monômeros por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), enquanto que o comportamento térmico foi avaliado por análise termogravimétrica e análise térmica diferencial (TGA/DTA). Do ponto de vista coloidal, foi avaliado o tamanho, a carga superficial e a estabilidade das partículas e/ou de seus possíveis nanoagregados, utilizando medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS), medidas de potencial zeta (ZP) e condutividade elétrica. Os parâmetros reológicos das soluções de xantana foram avaliados por reologia estacionária, através da construção de curvas de fluxo e viscosidade e consequente identificação do tipo de fluido (Newtoniano, não-Newtoniano).²³ As contribuições elástica (G') e fluida (G'') dessas soluções foram avaliadas por reologia dinâmica oscilatória.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais, microrganismos e reagentes utilizados

Para a biossíntese da xantana foi elaborado um meio de cultivo mínimo para ser utilizado no preparo do inóculo e no processo de fermentação. O caldo foi composto de 1,5% (p/V) glicose, 0,5% (p/V) K₂HPO₄, 0,2% (p/V) NH₄Cl, 0,1% (p/V) NaCl, 0,01% (p/V) MgSO₄ e 0,1% (p/V) extrato de levedura, com ajuste de pH entre 7,0-7,2, a 25 °C. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C, por 15 minutos e armazenado sob refrigeração 10 °C. A estirpe utilizada foi *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* nº 1182 obtida da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico - IBSBF de Campinas/SP. Para o processo de precipitação foi utilizado álcool etílico 92 °GL. Para a caracterização físico-química da xantana produzida, foi utilizada água ultrapura tipo 1 no preparo das soluções, as quais foram mantidas em sonicator a 40 °C, por 60 min, para melhor solubilização.

2.2. Preparo do inóculo

O caldo de cultivo mínimo (20 mL) foi distribuído em erlenmeyer de 50 mL e adicionada uma alçada calibrada (10 µL) da estirpe. Em seguida, foi colocado em incubadora com agitação de 150 rpm, por 24 h, a 30 °C. Após o tempo de incubação, foi ajustada a densidade ótica do caldo fermentado para a concentração microbiana equivalente a 0,3 unidades, por espectrofotometria a 600 nm.

2.3. Fermentação

Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL, com 90 mL de caldo de cultivo mínimo, inoculado com 10 mL do inóculo, completando o volume para 100 mL. O cultivo foi realizado em duplicata, a 30 °C e agitação de 150 rpm por 72 h, obtendo-se as xantanas denominadas XantG₁ e XantG₂, que foram estudadas neste trabalho.

2.4. Precipitação e recuperação

Para a precipitação da xantana foi adicionado álcool etílico 96 °GL na proporção de 3:1 (álcool: meio fermentado). Após a precipitação, as amostras foram recuperadas por filtração a vácuo, utilizando filtros de tecido de nylon (abertura 77 microns e espessura 80 microns), previamente secos em estufa a 60 °C por 1 h. A secagem da goma foi feita em estufa a 60 °C por 12 h. O procedimento aqui utilizado foi similar ao descrito na literatura e conhecido por produzir amostra de pureza superior a 90%.^{10,24}

O aspecto do polímero biossintetizado é mostrado na Figura 2. Após biossintetizadas, as amostras XantG₁ e XantG₂ foram submetidas à caracterização físico-química no estado sólido e em solução/suspensão.

Figura 2. Aspecto físico da amostra de xantana

2.5. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Amostras de xantana XantG₁ e XantG₂ foram caracterizadas no estado sólido por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) para a identificação dos principais grupos funcionais presentes em sua estrutura,

por meio de comparação com espectro de FTIR de amostra de xantana comercial Sigma Aldrich®. Os espectros das amostras foram registrados utilizando um espectrômetro Perkin Elmer (Modelo Spectrum GX, Boston, MA, USA). As análises foram realizadas em um intervalo de número de onda de 4000 a 500 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e uma média de 12 varreduras, utilizando o programa Perkin Elmer Spectrum ES (versão do aplicativo: 10.03.08.0133). Os dados foram exportados para o *Microcal Origin*® 9.0 para edição.

2.6. Análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA)

O comportamento térmico dos biopolímeros foi avaliado no estado sólido por análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA). Foi utilizado um módulo DTA/TGA, STA7200RV da HITACHI. As condições analíticas foram: atmosfera oxidante (ar) a 300 mL/min, com rampa de temperatura de 10 a 800 °C, taxa de aquecimento de 10 °C/min e massa aproximada de 2 mg, em cadinhos de platina.

2.7. Estudo de estabilidade

Os estudos de estabilidade foram conduzidos por meio do monitoramento da condutividade elétrica de soluções 2 g/L (0,2% p/V), ao longo de 23 dias consecutivos, com o emprego do medidor de condutividade elétrica da S230 de SevenCompact™ da Mettler Toledo. As soluções foram mantidas em frasco fechado e somente abertas no momento da medida. Os valores de condutividade elétrica foram plotados em função do tempo.

2.8. Estudo de agregação das xantanas

Foram realizadas medidas de tamanho de partículas em solução aquosa (diâmetro hidrodinâmico, D_h) por espalhamento de luz dinâmico (DLS) em módulo fotométrico Zeta Sizer NanoZS90 da Malvern, a 25 °C, após 30s de equilíbrio térmico. Foi utilizada uma cubeta descartável de polietileno de 1 cm de caminho óptico, padrão Malvern, submetida a um feixe de luz monocromático (laser He-Ne de 4 mW de potência e comprimento de onda de 633 nm), com intensidade de luz espalhada medida a 90°. O D_h foi determinado pela média de 5 medidas independentes, cada uma delas obtida a partir da média de 5 contagens. O tratamento dos dados foi executado com o auxílio do programa *Microcal Origin*® 9.0. As medidas foram realizadas com amostras em diferentes concentrações: 0,005 g/L, 0,01 g/L, 0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,2 g/L, 0,5 g/L, 0,75 g/L, 1,0 g/L, 1,5 g/L e 2,0 g/L.

As mesmas amostras foram também submetidas à medidas de potencial zeta (ZP), utilizando o mesmo módulo Zetasizer NanoZS90, porém, empregando-se a técnica de Espalhamento de Luz Eletroforético, baseado no modelo

de Smoluchowski.²⁸ Foi utilizada cubeta capilar DPS1060. Os valores de ZP foram resultantes da média de 10 medidas independentes, obtidas a cada 10 contagens.

2.9. Determinação dos parâmetros reológicos das soluções

O efeito da concentração no comportamento reológico das soluções de XantG₁ e XantG₂ foi avaliado por reologia estacionária, à 25 °C, em taxa de cisalhamento igual a 95 s⁻¹, nas mesmas concentrações utilizadas nos experimentos de DLS, ou seja, de 0,005 à 2 g/L. As amostras foram analisadas utilizando-se um reômetro rotacional estacionário de taxa de tensão controlada DHR-1 da T.A. Instruments®, equipado com geometria placa-placa (PP25/S-SN 15782; d = 1.0 mm), com controle de temperatura através da placa com sistema Peltier (25,00 ± 0,02 °C).

Soluções das amostras XantG₁ e XantG₂ na concentração de 2 g/L foram também submetidas a ensaios reológicos estacionários de fluxo (modo rotacional), varrendo-se a tensão de cisalhamento (τ / Pa) em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$ / s⁻¹), à 25 °C. As amostras foram pré-cisalhadas por 30 s, com $\dot{\gamma}$ = 10 s⁻¹ e em seguida, submetidas a um ciclo de cisalhamento: de 10 a 1000 s⁻¹ e 1000 a 10 s⁻¹, em intervalos linearmente espaçados. Os dados foram inicialmente tratados usando o *software TRIOS*® da T.A. Instruments e posteriormente, exportados para o *software Microcal Origin*® 9.0 para edição final.

Foram também realizados ensaios reológicos dinâmicos oscilatórios. A primeira série de experimentos teve como objetivo a verificação da região de viscoelástica linear (LVE), ou seja, onde a estrutura do material é preservada, para posterior varredura de frequência. Para isso, foi realizada uma varredura crescente de deformação, na faixa de 1 à 100%, medindo-se os módulos de armazenamento (G' / Pa, parte real do módulo cisalhamento complexo) e de perda (G'' / Pa, parte imaginária do módulo cisalhamento complexo),²³ que visou também identificar se o fluido possui ou não uma tensão de escoamento τ_0 (Pa).

A segunda série de experimentos em modo oscilatório teve como objetivo monitorar os parâmetros G' e G'' em função da frequência de cisalhamento ω (Hz), entre 0 e 20 Hz, à temperatura fixa em 25 °C.

3. Resultados e Discussões

3.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho – FTIR

As amostras XantG₁ e XantG₂ foram caracterizadas por FTIR com o objetivo de comprovar a formação do polímero através da biossíntese. Para isso, os principais picos dos espectros das amostras foram comparados com aqueles da amostra de xantana comercial (Sigma Aldrich) e com espectros disponíveis na literatura. A Figura 3 mostra o perfil do espectro de infravermelho das três amostras na

região compreendida entre 4000 a 500 cm⁻¹. Como pode ser observado, os espectros de XantG₁ e XantG₂ apresentaram grande semelhança entre si e com o espectro da amostra comercial, sugerindo reprodutibilidade do processo.

Nos espectros das xantanas, a banda em torno de 3430 cm⁻¹ está relacionada ao estiramento dos grupos hidroxila $\nu(\text{O-H})$, presentes na estrutura dos carboidratos.²⁶ A banda 2924 cm⁻¹ refere-se ao estiramento do grupo metila $\nu(\text{C-H})$.²⁷ A banda observada na região de 1730 cm⁻¹ corresponde ao estiramento do grupo carbonila $\nu(\text{C=O})$ dos derivados de ésteres e dos ácidos pirúvico e outros ácidos carboxílicos. A banda em torno de 1627 corresponde ao estiramento de $\nu(\text{C=O})$ de cetona, presente no resíduo do ácido pirúvico. Sinais em 1412 cm⁻¹, referem-se à deformação angular $\delta_{\text{ang}}(\text{C-H})$ de metila,¹⁴ enquanto em 1060 corresponde ao estiramento dos grupos $\nu(\text{C-O})$ de álcool.²⁸ De acordo com as principais bandas observadas, as xantanas biossintetizadas apresentaram o mesmo padrão espectral em relação à xantana comercial, os quais estão coerentes com a literatura.

Figura 3. Espectro na região do infravermelho para as xantanas Xant Comercial, XantG₁ e XantG₂ na região 4000 a 500 cm⁻¹ em KBr

3.2. Análise térmica – TGA/DTA

As Figuras 4A e 4B mostram as curvas TGA/dTGA e DTA das amostras de XantG₁ e XantG₂. No presente estudo, as curvas TGA mostraram três eventos principais de decomposição térmica, similar ao observado para outras amostras relatadas na literatura.^{14,18}

Dos principais eventos observados, o primeiro foi endotérmico e os demais exotérmicos conforme observado na curva DTA. A análise das curvas TGA e suas derivadas (dTGA) mostrou que o primeiro evento ocorre na faixa de 30 °C a 170 °C, com temperatura de máxima de perda de massa (T_{peak}) em torno de 50 °C, com perdas de massa de 7% para XantG₁ e 11% para XantG₂, as quais foram atribuídas à desidratação.^{14, 18, 29, 30} O segundo evento ocorreu na faixa de 200 °C a 350 °C, com T_{peak} em torno de 275 °C, com perdas de massa de 37% para XantG₁ e de 40% para XantG₂,

Figura 4. A) Análise termogravimétrica (TGA) e sua derivada (dTGA); B) Análise térmica diferencial (DTA) da xantana XantG₁ e XantG₂ em atmosfera oxidante (ar)

atribuídas à degradação do biopolímero.^{14, 18, 29, 30} O terceiro evento ocorreu na faixa de 370 °C a 510 °C, com T_{peak} em torno de 445 °C para ambas as amostras e perdas de massa de 31% para XantG₁ e de 33% para XantG₂. Este evento pode ser atribuído à presença de substrato não bioconvertido, aderido à goma durante o processo de separação, conforme descrito por Da Silva e colaboradores (2018).¹⁸ No final do processo, XantG₁ apresentou massa residual de 23% e XantG₂ de 14% acima de 500 °C, sugerindo a incorporação de cátions Na⁺/K⁺, oriundos dos sais utilizados no meio de produção ou adicionados após fermentação.³¹ A diferença de perda de massa foi atribuída à dificuldade de controle do processo de recuperação por precipitação, que pode levar à incorporação de diferentes quantidades de cátions.

Comparando-se os valores de T_{peak} bem como os perfis termogravimétricos do presente trabalho com aqueles apresentados na literatura,^{14, 18, 29} foi possível observar algumas diferenças as quais foram atribuídas às diferentes condições operacionais utilizadas. Os dados aqui apresentados foram obtidos numa atmosfera de ar (oxidante) e maior vazão (300 mL/min), diferente do realizado nos demais trabalhos, onde o N₂ foi utilizado como gás de arraste. Portanto, o uso de ar numa vazão elevada pode favorecer a oxidação dos compostos orgânicos em diferentes etapas gerando um perfil de decomposição diferente, como o evento em 215 °C observado tanto na dTGA quanto na DTA.

3.3. Estudo de estabilidade química

A Figura 5 mostra o resultado de 21 medições de condutividade elétrica de soluções das amostras de XantG₁ e XantG₂ a 2 g/L, ao longo de 23 dias consecutivos. Como pode ser observado, os valores de condutividade elétrica praticamente não variaram, sugerindo estabilidade molecular em meio aquoso, dentro do período de estudo. É importante frisar que caso houvesse algum fenômeno de decomposição, a concentração de íons deveria aumentar ou diminuir no meio, levando a alterações na condutividade elétrica.

Figura 5. Valores de condutividade elétrica de XantG₁ e XantG₂ a 2 g/L a 25 °C, durante 23 dias

3.4. Investigação do estado de agregação das xantanas

Foi avaliado o estado de agregação das xantanas em solução, por meio de titulações, medindo-se o diâmetro hidrodinâmico (D_h), a viscosidade (η) e o potencial zeta (ZP) em função da concentração de xantana (Figuras 6-8).

Como pode ser observado nos três gráficos, existem duas concentrações críticas, c* (≈ 0,1 g/L) e c** (≈ 0,75 g/L), que separam três regimes de comportamento distinto de tamanho de partícula. Na literatura essas concentrações são denominadas concentração de sobreposição - c* e concentração de emaranhamento - c**. Os três regimes de concentração separados pelas duas transições são denominados diluído, semidiluído e concentrado.²¹

Na primeira região, ou seja, do início da titulação até c*, ocorre um pronunciado aumento do diâmetro hidrodinâmico das partículas (Figura 6), sugerindo a formação de agregados desde o início da adição de polímero. Nesta mesma faixa de concentração, observa-se também um rápido aumento da viscosidade do meio (Figura 7), atribuído ao aumento de tamanho das partículas. A Figura 8 mostra que as soluções de xantanas apresentaram valores de ZP negativos,

provavelmente devido à ionização dos grupamentos carboxilato. Porém, com o aumento da concentração, os valores tornaram-se mais negativos, alcançando o mínimo de -50 mV, próximo à c^* . Este aumento do módulo do potencial zeta é condizente com a formação de agregados moleculares, visto que tais estruturas devem possuir uma maior concentração de cargas negativas na superfície, que acarreta um valor mais negativo de potencial zeta. Alterações similares no ZP decorrentes de fenômenos de agregação são muito comumente encontradas na literatura. Por exemplo, aumento nos valores de potencial zeta ocorrem quando surfactantes iônicos sofrem micelização, devido ao acúmulo de cargas na superfície das micelas.³²

Figura 6. Valores do diâmetro hidrodinâmico de xantana xantG₁ e XantG₂ em função da concentração, medida por DLS, com ângulo de espalhamento de 90° a 25°C

Figura 7. Valores de viscosidade em função da concentração de xantana. Concentrações críticas: c^* (sobreposição) e c^{**} (emaranhamento) detectadas por medidas de viscosidade

Na faixa de concentração compreendida entre c^* e c^{**} , os valores de D_h e de ZP variam pouco, enquanto que a viscosidade continuou a aumentar. É válido salientar que tanto o potencial zeta,³³ quanto o tamanho de partícula,³⁴ são pouco afetados pela concentração, a menos que a composição do meio ou estrutura coloidal sofram alterações drásticas. Já a

Figura 8. Valores de potencial zeta de xantana XantG₁ e XantG₂ em concentrações de 0,005 a 2 g/L, medidos por PALS, com ângulo de dispersão de 173° , 25°C

viscosidade, por ser uma medida da resistência ao escoamento, é fortemente dependente da concentração do meio, pois quanto maior for a concentração de soluto, maior será a possibilidade de colisão e atrito entre as partículas durante o movimento do líquido.²² Assim, acredita-se que nesta região ocorre apenas um aumento da concentração dos agregados anteriormente formados, sem grandes alterações estruturais.

Acima da concentração de c^{**} , o tamanho de partícula volta a aumentar, provavelmente pela formação de estrutura tridimensional de emaranhados moleculares. A partir deste ponto, deve haver uma redução significativa do espaço entre as cadeias poliméricas, que restringe drasticamente seus movimentos. Desse modo, acima de c^{**} considera-se que o sistema encontra-se em regime concentrado. Resultados muito semelhantes foram encontrados em outros trabalhos. Milas e colaboradores (1990)³⁵ usando reologia, determinaram as duas concentrações críticas c^* e c^{**} de amostras de xantana, onde os valores encontrados foram, respectivamente, 0,126 g/L e 0,78 g/L para xantana nativa e 0,1 g/L e 0,6 g/L para xantana renaturada. Rodd e colaboradores (2000)³⁶ usando DLS relataram que c^* de xantana é aproximadamente 0,05 g/L e c^{**} cerca de 0,7 g/L. Nash e colaboradores (2002),³⁷ através da mesma técnica, encontraram o valor 0,6 g/L para a c^{**} .

3.5. Ensaios reológicos estacionários

As análises reológicas estacionárias foram realizadas com o objetivo de classificar as amostras quanto ao comportamento de fluxo. As Figuras 9A e 9B apresentam, respectivamente, as curvas de fluxo e de viscosidade para as amostras, na máxima concentração estudada, onde espera-se a formação de emaranhados tridimensionais (2,0 g/L). Conforme observado, os gráficos mostram forte comportamento pseudoplástico para as duas soluções, ou seja, a viscosidade diminui drasticamente com o aumento da taxa de cisalhamento.¹⁰ Acima de 400 s^{-1} , os valores de viscosidade são quase 15 vezes inferiores ao valor inicial, e as soluções assumem

comportamento praticamente Newtoniano, visto que suas viscosidades são aproximadamente constantes. Esse fato foi atribuído à desagregação dos emaranhados pelo cisalhamento, concomitante ao alinhamento das partículas em direção ao fluxo, com redução do atrito intermolecular.³⁸ A maior queda nos valores de viscosidade ocorre entre 10 e 200 s⁻¹, sendo que após 400 s⁻¹, os agregados entram em regime permanente de orientação molecular e desagregação. Este dado demonstra que estímulos mecânicos como agitação ou mistura são suficientes para se promover a desagregação dos emaranhados.

Os valores de viscosidade aqui obtidos foram comparáveis a outras xantanas relatadas na literatura produzidas a partir de substratos convencionais, e algumas vezes, até proporcionalmente maiores. Rotava e colaboradores (2009)³⁹ estudaram dez cepas de *Xanthomonas*, utilizando sacarose como fonte de carbono. Duas delas apresentaram valores de viscosidade de $\approx 1,8$ Pa.s para *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* e $\approx 0,9$ Pa.s para *X. axonopodis* pv. *manihotis*, para soluções aquosas a 30 g/L, a 25 °C e taxa de cisalhamento de 1,32 s⁻¹. A viscosidade máxima obtida para as xantanas XantG₁ e XantG₂ foram próximas de $\approx 0,15$ Pa.s., a 10,8 s⁻¹, para uma concentração quinze vezes menor.

Brandão e colaboradores (2008)⁴⁰ usaram *X. campestris manihotis* 1182 (mesma linhagem usada no presente estudo) e substrato caldo de cana e compararam com gomas obtidas a partir de sacarose. Em solução aquosa a 20 g/L, 25 °C e 25 s⁻¹, encontraram viscosidade aparente de 0,1 Pa.s (caldo de cana) e 0,5 Pa.s (sacarose). O valor obtido no presente estudo também é proporcionalmente superior a outros referentes a substratos alternativos, como por exemplo, Nery e colaboradores (2008)⁴¹, que empregaram *X. campestris mangiferaeindicae* e soro de leite, cuja viscosidade máxima foi de 0,057 Pa.s para soluções aquosas de 20 g/L de goma, a 25 °C e taxa de cisalhamento igual a 25 s⁻¹.

3.6. Ensaios reológicos oscilatórios

Muitos materiais apresentam um comportamento mecânico intermediário entre fluidos viscosos newtonianos

e sólidos elásticos hookeanos, sendo por esta razão, denominados viscoelásticos.⁴² A viscoelasticidade, por sua vez, é usualmente avaliada em termos dos módulos de elasticidade - G' (medida do comportamento sólido do material) e do módulo de perda - G'' (medida da fluidez do material), determinados através de experimentos reológicos oscilatórios.^{21,43,44} A Figura 10A mostra os valores de G' e G'' em função da amplitude de deformação $\gamma\%$, enquanto que a Figura 10B mostra os mesmos valores de G' e G'' em função da tensão de cisalhamento τ .

Como pode ser observado, os valores de G'' foram maiores do que os valores de G', indicando maior fluidez do que elasticidade, devido ao comportamento de "sol", nesta concentração utilizada. Contudo, o simples fato de se medir valores não nulos de G' é mais uma confirmação da existência de uma estrutura de interações intermoleculares capaz de armazenar energia mecânica e conferir certa rigidez ao fluido.

A partir da Figura 10A, foi determinado que o valor de amplitude de deformação que separa a região de viscoelasticidade linear (LVE) da região de viscoelasticidade não linear (NLVE) foi $\gamma\% \approx 70\%$. Observa-se também que as soluções apresentaram queda nos valores de G' e G'' tanto em função da taxa de deformação $\dot{\gamma}$ (Figura 10A) quanto em função da tensão de cisalhamento τ (Figura 10B). Esta queda nos valores de G' e G'' foi atribuída à existência de uma tensão de escoamento τ_0 , a partir da qual a estrutura de interações é rompida pelo cisalhamento. Os valores de τ_0 foram determinados pelo cruzamento das retas descritas na Figura 10B, de maneira similar ao realizado por Ong e colaboradores (2019).⁴⁴ Esses valores (0,25 e 0,27 Pa) são da mesma magnitude daqueles determinados por García-Ochoa e Casas (1994)⁴⁵ usando reologia estacionária; e daqueles determinados por Ong e colaboradores usando reologia oscilatória (2019).⁴⁴

Medidas reológicas oscilatórias também foram realizadas em função da frequência de oscilação (ω), conforme apresentado na Figura 11. Através deste gráfico, pode-se confirmar que as soluções de xantana, na concentração utilizada, se comportam como um fluido

Figura 9. A. Curva de fluxo; B. Curva de viscosidade para xantana XantG₁ e XantG₂ a 2,0 g/L, 25 °C. Faixa de taxa de cisalhamento: 10 a 1000 s⁻¹

Figura 10. A. Módulo de armazenamento $G'_{(\gamma\%)}$ e perda $G''_{(\gamma\%)}$ em função da amplitude de deformação ($\gamma\%$) para xantana XantG₁ e XantG₂; B. Mesmos valores dos módulos $G'_{(\gamma\%)}$ e $G''_{(\gamma\%)}$ em função da tensão de cisalhamento (τ) para XantG₁ e XantG₂

Figura 11. Módulos de armazenamento $G'_{(\omega)}$, e de perda $G''_{(\omega)}$ em função da frequência para xantana XantG₁ e XantG₂

viscoelástico,⁴⁶ com presença de estruturas emaranhadas capazes de se deslizarem umas sobre outras, uma vez que G' foi menor que G'' em toda a faixa de frequência, não sendo observado o “fenômeno de crossover”, ou seja, a interseção entre os dois módulos.

4. Conclusões

As xantanas biossintetizadas a partir de glicose são polieletrólitos capazes de se auto-organizar formando estruturas coloidais em solução aquosa, de modo a produzir elevada viscosidade e pseudoplasticidade. Os estudos de agregação apontaram para duas concentrações críticas, uma de sobreposição (c^*) em ≈ 0.1 g/L e a outra de emaranhamento (c^{**}) em ≈ 0.75 g/L, indicando a formação de emaranhados moleculares, os quais são responsáveis pela elevação da viscosidade das soluções, decorrente do aumento do diâmetro hidrodinâmico e do acúmulo de cargas na superfície das macromoléculas. O comportamento reológico estacionário mostrou-se um

tanto pseudoplástico, visto que houve drástica redução da viscosidade, atribuída à quebra dos emaranhados moleculares com o cisalhamento. Em 2 g/L as soluções apresentam-se como líquidos viscoelásticos, característicos de estrutura tipo “sol”. Contudo, os resultados mostraram que é possível alcançar efeito espessante significativo nesta concentração.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG: APQ-01293/14, APQ-03536-16, APQ-03623-17), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 311913/2017-2, 437418/2018-9, 550321/2012-8), Financiadora de Pesquisas e Estudos (FINEP 0633/13).

Referências Bibliográficas

- Dickinson, E.; Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids* **2003**, *17*, 25. [CrossRef]
- Ernandes, F. M. P. G.; Garcia-Cruz, C. H.; Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. *Semina: Ciências Agrárias* **2005**, *26*, 71. [Link]
- Vorhölter, F.-J.; Schneiker, S.; Goesmann, A.; Krause, L.; Bekel, T.; Kaiser, O.; Linke B.; Patschkowski T.; Rückert C.; Schmid J.; Sidhu V. K.; Sieber V.; Tauch A.; Watt S. A.; Weisshaar B.; Becker A.; Niehaus, K.; Pühler, A.; The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *Journal of Biotechnology* **2008**, *134*, 33. [CrossRef] [PubMed]
- Sutherland, I. W.; Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal* **2001**, *11*, 663. [CrossRef]
- Luvielmo, M. M.; Scamparini, A. R. P.; Xanthan gum: Production, recovery, properties and application. *Estudos Tecnológicos em Engenharia* **2009**, *5*, 50. [Link]

6. García-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Alcón, A.; Xanthan gum production: An unstructured kinetic model. *Enzyme and Microbial Technology* **1995**, *17*, 206. [CrossRef]
7. Jansson, P.; Kenne, L.; Lindberg, B.; Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydrate Research* **1975**, *45*, 275. [CrossRef][PubMed]
8. Rosalam, S.; England, R.; Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. *Enzyme and Microbial Technology* **2006**, *39*, 197. [CrossRef]
9. Katzbauer, B.; Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability* **1998**, *59*, 81. [CrossRef]
10. García-Ochoa, F.; Santos, V.; Casas, J.; Gómez, E.; Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances* **2000**, *18*, 549. [CrossRef] [PubMed]
11. Menezes, J. D. D. S.; Druzian, J. I.; Padilha, F. F.; de Souza, R. R.; Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de goma xantana. *Revista Eletrônica Em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental* **2013**, *8*, 1761. [CrossRef]
12. Sutherland, I. W.; Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology* **1998**, *16*, 41. [CrossRef][PubMed]
13. Wang, L.; Zhu, F.; Lu, D.; Rheological properties of sodium alginate and xanthan pastes on cotton with reactive dye in screen printing. *Textile Research Journal* **2013**, *83*, 1873. [CrossRef]
14. Faria, S.; de Oliveira Petkowicz, C. L.; de Moraes, S. A. L.; Terrones, M. G. H.; de Resende, M. M.; de França, F. P.; Cardoso, V. L.; Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *86*, 469. [CrossRef]
15. Bae, S.; Sugano, Y.; Shoda, M.; Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2004**, *97*, 33. [CrossRef][PubMed]
16. Kiosseoglou, A.; Papalamprou, E.; Makri, E.; Doxastakis, G.; Kiosseoglou, V.; Functionality of medium molecular weight xanthan gum produced by *Xanthomonas Campestris* ATCC 1395 in batch culture. *Food Research International* **2003**, *36*, 425. [CrossRef]
17. Nitschke, M.; Rodrigues, V.; Schinatto, L. F.; Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. Campestris* C7L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2001**, *21*, 82. [CrossRef]
18. da Silva, J. A.; Cardoso, L. G.; de Jesus Assis, D.; Gomes, G. V. P.; Oliveira, M. B. P. P.; de Souza, C. O.; Druzian, J. I.; Xanthan Gum Production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* IBSBF 1866 and 1867 from Lignocellulosic Agroindustrial Wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2018**, *186*, 750. [CrossRef][PubMed]
19. Gondim, T. S.; Pereira, R. G.; Fiaux, S. B.; Xanthan gum production by *Xanthomonas axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* from glycerin of biodiesel in different media and addition of glucose. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* **2019**, *41*, 43661. [CrossRef]
20. Pradella, J. G. D. C.; *Biopolímeros e intermediários químicos. Relatório Técnico 84396-205*, São Paulo: Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, 2006. [Link]
21. Wyatt, N. B.; Liberatore, M. W.; Rheology and viscosity scaling of the polyelectrolyte xanthan gum. *Journal of Applied Polymer Science* **2009**, *114*, 4076. [CrossRef]
22. Lopes, B. M.; Lessa, V. L.; Silva, B. M.; La Cerda, L. G.; Xanthan gum: properties, production conditions, quality and economic perspective. *Journal of Food and Nutrition Research* **2015**, *54*, 194. [Link]
23. Barnes, H. A.; Hutton, J. F.; Walters, K.; *An Introduction to Rheology*, 1st ed., Elsevier: New York, 1989.
24. Mudoi, P.; Bharali, P.; Konwar, B. K.; Study on the Effect of pH, Temperature and Aeration on the Cellular Growth and Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* Using Waste Residual Molasses. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* **2013**, *3*. [CrossRef]
25. Xu, R.; Methods to resolve mobility from electrophoretic laser light scattering measurement. *Langmuir* **1993**, *9*, 2955. [CrossRef]
26. Hashemi, M. M.; Aminlari, M.; Moosavinasab, M.; Preparation of and studies on the functional properties and bactericidal activity of the lysozyme-xanthan gum conjugate. *LWT - Food Science and Technology* **2014**, *57*, 594. [CrossRef]
27. Pooja, D.; Panyaram, S.; Kulhari, H.; Rachamalla, S. S.; Sistla, R.; Xanthan gum stabilized gold nanoparticles: Characterization, biocompatibility, stability and cytotoxicity. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *110*, 1. [CrossRef][PubMed]
28. Kumar, A.; Singh, K.; Ahuja, M.; Xanthan-g-poly(acrylamide): Microwave-assisted synthesis, characterization and in vitro release behavior. *Carbohydrate Polymers* **2009**, *76*, 261. [CrossRef]
29. Zohuriaan, M.; Shokrolahi, F.; Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing* **2004**, *23*, 575. [CrossRef]
30. Villetti, M.A.; Crespo, J.S.; Soldi, M.S.; Pires, A. T. N.; Borsali, R.; Soldi, V.; Thermal degradation of natural polymers. *Journal of thermal analysis and calorimetry* **2002**, *67*, 295. [Link]
31. Klaic, P. M. A.; Nunes A. M.; Moreira, A. da S.; Vendruscolo, C. T.; Ribeiro, A. S.; Determination of Na, K, Ca and Mg in xanthan gum: Sample treatment by acid digestion. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *83*, 1895. [CrossRef]
32. Hsu, C.-H.; Shau, S.-M.; Jeng, R.-J.; Chiu, H.-C.; Dai, S. A.; Conte, E. D.; Suen, S.-Y.; Determination of critical micelle concentration of dendritic surfactant synthesized via a selective ring-opening addition reaction. *Microchemical Journal* **2013**, *110*, 48. [CrossRef]
33. Medrzycka, K. B.; The effect of particle concentration on zeta potential in extremely dilute solutions. *Colloid & Polymer Science* **1991**, *269*, 85. [CrossRef]
34. Navabpour, P.; Rega, C.; Lloyd, C. J.; Attwood, D.; Lovell, P. A.; Geraghty, P.; Clarke, D.; Influence of concentration on the particle size analysis of polymer latexes using diffusing-wave spectroscopy. *Colloid and Polymer Science* **2005**, *283*, 1025. [CrossRef]
35. Milas, M.; Rinaudo, M.; Knipper, M.; Schuppiser, J. L.; Flow and viscoelastic properties of xanthan gum solutions. *Macromolecules* **1990**, *23*, 2506. [CrossRef]
36. Rodd, A. B.; Dunstan, D. E.; Boger, D. V.; Characterisation of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. *Carbohydrate Polymers* **2000**, *42*, 159. [CrossRef]

37. Nash, W.; Pinder, D.; Hemar, Y.; Singh, H.; Dynamic light scattering investigation of sodium caseinate and xanthan mixtures. *International Journal of Biological Macromolecules* **2002**, *30*, 269. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
38. Reinoso, D.; Martín-Alfonso, M. J.; Luckham, P. F.; Martínez-Boza, F. J.; Flow behavior and thermal resistance of xanthan gum in formate brine. *Journal of Petroleum Science and Engineering* **2020**, *188*, 106881. [[CrossRef](#)]
39. Rottava, I.; Batesini, G.; Silva, M. F.; Lerin, L.; de Oliveira, D.; Padilha, F. F.; Toniazzi, G.; Mossi, A.; Cansian, R. L.; Di Luccio, M.; Treichel, H.; Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. *Carbohydrate Polymers* **2009**, *77*, 65. [[CrossRef](#)]
40. Brandão, L. V.; Nery, T. B. R.; Machado, B. A. S.; Esperidião, M. C. A.; Druzian, J. I.; Produção de goma xantana obtida a partir do caldo de cana. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2008**, *28*, 217. [[CrossRef](#)]
41. Nery, T. B. R.; Brandão, L. V.; Esperidião, M. C. A.; Druzian, J. I.; Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. *Química Nova* **2008**, *31*, 1937. [[CrossRef](#)]
42. Gunasekaran, S.; Ak, M. M.; Dynamic oscillatory shear testing of foods — selected applications. *Trends in Food Science & Technology* **2000**, *11*, 115. [[CrossRef](#)]
43. Liu, S.; Zhang, H.; Fang, B.; Lu, Y.; Qiu, X.; Zhai, W.; Liwei, W.; Li, K.; Rheological and microrheological characterization of a novel amphoteric xanthan gum. *Journal of Dispersion Science and Technology* **2017**, *39*, 1018. [[CrossRef](#)]
44. Ong, E. E. S.; O’Byrne, S.; Liow, J. L.; Yield stress measurement of a thixotropic colloid. *Rheologica Acta* **2019**, *58*, 383. [[CrossRef](#)]
45. García-Ochoa, F.; Casas, J. A.; Apparent yield stress in xanthan gum solutions at low concentrations. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal* **1994**, *53*, B41. [[CrossRef](#)]
46. Walker, D.; Käs Dorf, B. T.; Jeong, H.-H.; Lieleg, O.; Fischer, P.; Enzymatically active biomimetic micropropellers for the penetration of mucin gels. *Science Advances* **2015**, *1*, e1500501. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]