

UFRRJ

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO

**ESTUDO REOLÓGICO E DA
BIOCOMPATIBILIDADE DAS MISTURAS
CMC/AMIDO E CMC/EPS E SEU USO COMO
VEÍCULO DE INOCULAÇÃO**

Marcio da Silva Coutinho

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**ESTUDO REOLÓGICO E DA BIOCOMPATIBILIDADE DAS
MISTURAS CMC/AMIDO E CMC/EPS E SEU USO COMO
VEÍCULO DE INOCULAÇÃO**

MARCIO DA SILVA COUTINHO

Sob a Orientação do Professor
Paulo Jansen de Oliveira

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração em Tecnologia Química.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2013

660.2

C871e

T

Coutinho, Marcio da Silva, 1974-
Estudo reológico e da
biocompatibilidade das misturas
CMC/amido e CMC/EPS e seu uso como
veículo de inoculação / Marcio da
Silva Coutinho. - 2013.

53 f.: il.

Orientador: Paulo Jansen de
Oliveira.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Engenharia Química, 2013.

Bibliografia: f. 48-54.

1. Engenharia química - Teses.
2. Misturas (Química) - Teses. 3.
Biocompatibilidade - Teses. 4.
Reologia - Teses. 5. Polímeros -
Teses. I. Oliveira, Paulo Jansen
de. II. Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Engenharia Química.
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

MARCIO DA SILVA COUTINHO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/02/2013

Paulo Jansen de Oliveira, D.Sc.; DEQ/UFRRJ
(Orientador)

Fabiola Oliveira da Cunha, D.Sc.; DEQ/UFRRJ

Carlos Wanderlei Piler de Carvalho, Ph.D.; Embrapa-CTAA

Parte deste trabalho foi publicado no seguinte periódico:

Marcio da Silva Coutinho ; Danielle Cristina Fernandes da Silva ; Gustavo Ribeiro Xavier ; Norma Gouvêa Rumjanek ; Paulo Jansen de Oliveira. **Rheological and Morphological Properties of Carboxymethylcellulose/Starch Blends With or Without ZnO and Their Applications as Inoculant Carrier**. Macromolecular Symposia , v. 319, p. 222-229, 2012.

Parte deste trabalho foi apresentada nas seguintes reuniões científicas:

Marcio da Silva Coutinho; Danielle Cristina Fernandes da Silva ; Gustavo Ribeiro Xavier ; Norma Gouvêa Rumjanek ; Paulo Jansen de Oliveira. **Propriedades Reológicas da Mistura Carboximetilcelulose/Amido e Suas Aplicações como Veículo de Inoculação**. 11 Congresso Brasileiro de Polímeros, Campos de Jordão-SP, v. 01. p. 2608-2613, 2011.

Danielle Cristina Fernandes da Silva ; Marcio da Silva Coutinho ; Gustavo Ribeiro Xavier ; Norma Gouvêa Rumjanek ; Paulo Jansen de Oliveira. **Estudo das Propriedades Reológicas de Misturas de Carboximetilcelulose/EPS e CMC/Amido: Aplicação como Veículo de Inoculação para Agricultura**. 11 Congresso Brasileiro de Polímeros, Campos de Jordão-SP, v. 01. p. 4394-4400, 2011.

Marcio da Silva Coutinho; Danielle Cristina Fernandes da Silva ; Gustavo Ribeiro Xavier ; Norma Gouvêa Rumjanek ; Paulo Jansen de Oliveira. **Efeito da Adição de ZnO nas Propriedades Reológicas de Misturas Entre CMC/Amido**. I Congresso Brasileiro de Reologia, Rio de Janeiro-RJ, v. I. p. 51-51, 2011.

Danielle Cristina Fernandes da Silva ; Marcio da Silva Coutinho; Gustavo Ribeiro Xavier ; Norma Gouvêa Rumjanek ; Paulo Jansen de Oliveira. **Efeito da Adição de Biopolímeros (EPS) nas Propriedades Reológicas de Misturas Entre CMC/Amido**. I Congresso Brasileiro de Reologia, Rio de Janeiro-RJ, v. I. p. 49-49, 2011.

Euan Russano ; Marcio da Silva Coutinho; Gustavo Ribeiro Xavier ; Norma Gouvêa Rumjanek ; Paulo Jansen de Oliveira. **Efeito da Quantidade de Íons Magnésio no Comportamento Viscoelástico da Mistura CMC/Amido**. I Congresso Brasileiro de Reologia, Rio de Janeiro-RJ, v. I. p. 53-53, 2011.

Danielle Cristina Fernandes da Silva ; Marcio da Silva Coutinho; Paulo Jansen de Oliveira. **Obtenção e Caracterização: Reologia da Mistura CMC/EPS**. XXI Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ, Seropédica – RJ, 2011.

Marcio da Silva Coutinho; Paulo Jansen de Oliveira ; Gustavo Ribeiro Xavier. **Investigação da Mistura Entre CMC/EPS: Comportamento Reológico, Caracterização e Potencial Uso como Veículo de Inoculação**. VI Fórum de Pós-Graduação da UFRRJ, Seropédica-RJ, 2011.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Hidrocolóides	3
2.2. Mistura de Polímeros	4
2.3. Inoculantes	5
2.4. Polímeros como Veículos de Inoculação	6
2.5. Carboximetilcelulose	7
2.6. Amido	8
2.7. Exopolissacarídeos	12
3. Objetivo	16
4. Materiais e Métodos	17
4.1. Materiais para Preparação das Misturas Poliméricas	17
4.2. Materiais para Obtenção dos Exopolissacarídeos	17
4.3. Equipamentos para Preparação das Misturas Poliméricas	17
4.4. Equipamentos para Obtenção dos Exopolissacarídeos	17
4.5. Preparação das Misturas	18
4.6. Obtenção dos Exopolissacarídeos	18
4.6.1. Pré-Cultivo	18
4.6.2. Cultivo	19
4.6.3. Isolamento e Quantificação dos EPS	19
4.7. Ensaio Reológicos	21
4.7.1. Ensaio Estacionários	21
4.7.2. Ensaio Dinâmicos	22
4.8. Ensaio DSC	23
4.9. Ensaio MEV	23
5. Resultados e Discussão	24
5.1. Comportamento de Fluxo das Misturas CMC/Amido	24
5.1.1. Rampa de Taxa de Cisalhamento Controlada	24
5.1.2. Efeito da Temperatura na Energia de Ativação e Índice de Comportamento de Fluido	27
5.2. Ensaio Dinâmicos das Misturas CMC/Amido	28
5.2.1. Varredura de Frequência	28
5.2.2. Fluência e Recuperação	34
5.3. Determinação de Entalpia de Transição	37
5.4. Comportamento Reológico das Mistura CMC/EPS sob Cisalhamento	40
5.5. Avaliação da Mistura CMC/Amido Compatibilizada	43
5.6. Análise Morfológica	45
6. Conclusão	47
7. Referências Bibliográficas	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Inoculante Turfoso _____	6
Figura 2: Molécula da Carboximetilcelulose (KÄISTNER, 1996) _____	7
Figura 3: Molécula da Glicose (SWINKELS, 1985) _____	9
Figura 4: Estrutura Química da Amilose (a) e Amilopectina (b) (CORRADINI, 2005) _	10
Figura 5: Modificação do Estado do Amido com Excesso de Água (BORNET, 1991) __	11
Figura 6: Soluções Aquosas de EPSGLU 3g/L (a) e 6g/L (b) (BONGIOVANI, 2008) __	13
Figura 7: Comportamento Viscoelástico de EPSGLU (BONGIOVANI, 2008) _____	14
Figura 8: Monômeros de EPS de <i>Sinorhizobium meliloti</i> (SKORUPSKA, 2006) _____	16
Figura 9: Curvas de Viscosidade em Função da Taxa de Cisalhamento, Para as Misturas CMC/Amido Não Compatibilizadas e Contendo 1% de ZnO _____	26
Figura 10: Variação do índice de comportamento de fluido em função do teor de CMC _	28
Figura 11: Comportamento do módulo de armazenagem em função da frequência angular para Misturas CMC/Amido Compatibilizadas e Não Compatibilizadas _____	29
Figura 12: Comportamento do módulo de perda em função da frequência angular para para as Misturas CMC/Amido Compatibilizadas e Não Compatibilizadas _____	30
Figura 13: Viscosidade Complexa em função da frequência angular para as Misturas CMC/Amido Compatibilizadas e Não Compatibilizadas _____	32
Figura 14: Ângulo de Perda em função da frequência angular para as Misturas CMC/Amido Compatibilizadas e Não Compatibilizadas _____	34
Figura 15: Variação do Ângulo de Perda em Função do Teor de CMC _____	34
Figura 16: Deformação em Função do Tempo para Misturas CMC/Amido Compatibilizadas e Não Compatibilizadas _____	36
Figura 17: DSC das Misturas CMC/Amido Compatibilizadas e Não Compatibilizadas _	39
Figura 18: Variação da Viscosidade EPS em Diferentes Concentrações _____	41
Figura 19: Variação da Viscosidade EPS em Função da Taxa de Cisalhamento _____	42
Figura 20: Variação da Viscosidade da Mistura CMC/EPS _____	42
Figura 21: Micrografias das misturas CMC/Amido Compatibilizadas e Não Compatibilizadas _____	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exopolissacarídeos produzidos por alguns microrganismos _____	15
Tabela 2: Composição de Meio de Cultura RDM _____	20
Tabela 3: Parâmetros Power Law e Viscosidade Aparente Misturas CMC/Amido Não Compatibilizadas _____	25
Tabela 4: Parâmetros Power Law e Viscosidade Aparente Misturas CMC/Amido Compatibilizadas _____	26
Tabela 5: Energia de Ativação de Misturas CMC/Amido Compatibilizadas e Não Compatibilizadas _____	27
Tabela 6: Dependência do Módulo de Armazenagem com a Frequência em Misturas de CMC/Amido Não Compatibilizadas _____	32
Tabela 7: Dependência do Módulo de Armazenagem com a Frequência em Misturas de CMC/Amido Compatibilizadas _____	33
Tabela 8: Ensaio de Fluência e Recuperação de Misturas CMC/Amido Compatibilizadas e Não Compatibilizadas _____	35
Tabela 9: Análise Térmica de Misturas CMC/Amido Compatibilizadas e Não Compatibilizadas _____	38
Tabela 10: Sobrevivência das Células de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> _____	45

LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS OU SÍMBOLOS

CMC – Carboximetilcelulose.

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial.

E_a – Energia de Ativação

EPS – Exopolissacarídeos.

EPS I – Succinoglucanas.

EPS II – Galactoglucanas.

EPSGLU - Botriosferana utilizando glucose como fonte de carbono.

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio.

G' - Módulo de Armazenagem.

G'' – Módulo de Perda.

GS – Grau Médio de Substituição.

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura.

NaCl – Cloreto de Sódio.

OH – Grupamento Hidroxila.

pH – Potencial Hidrogeniônico.

R – Constante dos Gases.

RMN – Ressonância Magnética Nuclear.

T – Temperatura Absoluta expressa em Kelvin.

ZnO – Óxido de Zinco.

τ - Tensão de Cisalhamento.

$\dot{\gamma}$ - Taxa de Cisalhamento.

K- Índice de Consistência.

n - Índice de Comportamento de Fluido.

$\eta_{a,100}$ – Viscosidade Aparente em Taxa de Cisalhamento de 100 1/s.

ω – Frequência Angular.

δ – Ângulo de Perda.

η^* - Viscosidade Complexa.

ΔH – Entalpia de Transição.

RESUMO

COUTINHO, Marcio da Silva. **ESTUDO REOLÓGICO E DA BIOCOMPATILIDADE DAS MISTURAS DE CMC/AMIDO E CMC/EPS E SEU USO COMO VEÍCULO DE INOCULAÇÃO** 2013, 54p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Esta dissertação teve como objetivo investigar as propriedades reológicas de misturas de carboximetilcelulose (CMC) e amido, com e sem óxido de zinco (ZnO), e da mistura Exopolissacarídeo/amido. Nesse estudo a reologia foi utilizada para explorar as propriedades estruturais e as interações intermoleculares desses materiais, permitindo a caracterização macroscópica das misturas. Associando os resultados de reologia de rampas de taxa de cisalhamento controlada e testes dinâmicos com os de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível correlacionar a microestrutura dos materiais com suas respostas reológicas. Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que a viscosidade diminuiu com o aumento do teor de amido nas composições e com a adição de 1% de ZnO.

Os ensaios de fluência e recuperação indicaram que aumentando o teor de amido, ocorre uma diminuição na elasticidade e na viscosidade zero. Os resultados também mostraram que na faixa de temperatura entre 25 e 70⁰C, ocorreu uma inversão no comportamento dos módulos de armazenagem e perda, obedecendo à equação de Arrhenius. A adição de ZnO afeta o comportamento viscoelástico e a morfologia das misturas estudadas, onde os melhores resultados de sobrevivência foram obtidos para as amostras com teores de 50/50 e 60/40 % (CMC/Amido).

Palavras-chaves: misturas; biocompatibilidade; miscibilidade, polissacarídeos; reologia.

ABSTRACT

COUTINHO, Marcio da Silva. **RHEOLOGICAL STUDY OF BIOCOMPATIBILITY FROM CMC/STARCH AND CMC/EPS BLENDS AND THEIR USAGE AS INOCULANT CARRIER**, 2013, 54p. Dissertation (Master in Chemical Engineering). Institute of Technology, Department of Chemical Engineering, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The aim of this work is to investigate rheological properties of carboxymethylcellulose (CMC) and starch blends, with and without zinc oxide (ZnO), and EPS/starch. In this study the rheology was used as tool for exploring structural properties and intermolecular interactions of the materials, allowing macroscopic characterization of the compositions.

Analyzing the results of rheology ramps controlled shear rate and dynamic tests with electron microscopy (SEM) was possible to correlate the microstructure of materials with their rheological responses. The results of this work shown that the viscosity of the compositions decreased as the amount of starch increased and with addition 1% ZnO. The creep tests and recovery showed that the elasticity and the viscosity zero shear rate decreased with increasing starch content in the blends. An inversion between viscous and elastic modulus was observed in the temperature range between 25^o and 70^oC. This behavior follows the Arrhenius equation. The addition of ZnO affects the viscoelastic behavior and the morphology of the blends. The best survival results were obtained for samples 50/50 and 60/40 wt% (CMC/Starch).

Keywords: blends; biocompatibility; miscibility; polysaccharides; rheology.

1.INTRODUÇÃO

A demanda por novos materiais com propriedades físico-mecânicas diferenciadas tais como: alto grau de biodegradabilidade, biocompatibilidade e estabilidade dimensional, e que, além disso, sejam oriundos de fontes renováveis, não tóxicos, passíveis de reciclagem e de baixo custo tem estimulado a investigação científica na área de biotecnologia e de biopolímeros, principalmente para o desenvolvimento de materiais aplicados à agricultura.

No que tange o desenvolvimento de novos materiais poliméricos, as misturas poliméricas, destacam-se a aplicação voltada à preparação de inoculantes rizobianos para sementes e para cana-de-açúcar. Neste caso, para o bom desempenho de um inoculante, torna-se essencial a biocompatibilidade entre o polímero e os microrganismos. Dentro da família dos polímeros, os polímeros naturais, tais como os exopolissacarídeos (EPS), produzidos por síntese microbiana apresentam elevada capacidade de formar géis e biocompatibilidade com os microrganismos. Essas duas características apresentam os EPS como potenciais substâncias a serem utilizadas como veículo de inoculação para agricultura.

Recentemente, misturas de Carboximetilcelulose/Amido foram testadas com sucesso como inoculante rizobiano para o melhoramento da fixação biológica de nitrogênio (FBN) no solo em substituição à Turfa, material tradicionalmente utilizado como veículo de inoculação e de fonte não renovável. (ROHR, 2007) Os trabalhos relatados na literatura apresentam resultados com estudo envolvendo carboximetilcelulose/amido, utilizando uma carboximetilcelulose de média viscosidade. Nessa direção, esta dissertação propõe investigar a mistura entre carboximetilcelulose/amido, utilizando uma carboximetilcelulose de elevada viscosidade e utilizar exopolissacarídeos na preparação de novas misturas com amidos, buscando o desenvolvimento de novas misturas que possam ser utilizadas como veículo de inoculação.

Neste contexto, a reologia foi utilizada como ferramenta para prever o comportamento das misturas de modo a buscar uma mistura com melhores propriedades viscoelásticas, capaz de apresentar maior estabilidade dimensional e compatibilidade com microrganismos. Através dos ensaios de reologia foi possível extrair importantes informações a respeito do armazenamento, processamento e aplicação dos materiais.

Além disso, foi possível o entendimento sobre a formação da rede gel e a influência destas estruturas no comportamento viscoelástico das misturas poliméricas.

De modo a compreender o efeito das microestruturas nas propriedades reológicas foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), para obtenção da morfologia das misturas. Além disso, foi realizada caracterização por calorimetria exploratória diferencial (DSC), para investigação de eventuais transições nas misturas em função da temperatura. Através da utilização destas técnicas de caracterização foi possível compreender como as estruturas formadas contribuíram para o estabelecimento de um ambiente favorável para a manutenção e sobrevivência dos microorganismos presentes no inoculante.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hidrocolóides

Os hidrocolóides ou gomas pertencem a uma classe de polissacarídeos que apresentam importantes características do ponto de vista tecnológico, em função de possuírem uma extensa gama de propriedades funcionais, atuando como estabilizantes, espessantes, gelificantes e crioprotetores (ERNANDES, 2005) A aplicação dessas gomas em diferentes setores industriais, tais como alimentício e farmacêutico, deve-se ao fato de que esses materiais podem apresentar diferentes propriedades físicas dependendo do meio em que se encontram. Esses materiais podem conferir alta viscosidade às soluções por criarem redes intermoleculares coesivas; neste caso, a mudança na viscosidade ocorre como resultado da natureza de alta massa molar polimérica das gomas e das interações estabelecidas entre as cadeias poliméricas, quando as gomas são dissolvidas ou dispersas. Estas características estão vinculadas à natureza hidrofílica destes polímeros.

As gomas de origem vegetal são obtidas de exsudados de árvores (gomas arábica e karaya), de sementes (gomas guar e locusta) e de frutas cítricas (pectina), enquanto as de origem marinha são obtidas de algas (alginato, ágar e carragena), e as de origem microbiana são obtidas através de processo fermentativo de substratos ricos em nutrientes (xantana, curdlana e levana). (KUMAR, 2007; ERNANDES, 2005 ; YASEEN, 2005; LOPES, 1991; COTTRELL, 1980).

Os polissacarídeos de origem microbiana apresentam propriedades físicas, estruturais e químicas bastante homogêneas quando comparadas às dos polímeros derivados de algas e plantas. A ampla faixa de propriedades físico-mecânicas dos biopolímeros de origem microbiana potencializa sua aplicação nos segmentos industriais de alimentos, farmacêutica, petrolífera, cosmética, têxtil, produtos agrícolas entre outros (GLICKSMAN, 1986).

Uma aplicação importante desses materiais é relatada por BORGES (2009), em estudo com a goma xantana, atuando como agente viscosificante em fluidos de perfuração e na recuperação terciária de poços de petróleo. Os resultados mostraram que as soluções de xantana são estáveis à variação do pH, força iônica e temperatura.

Outro aspecto relevante que viabiliza a substituição de polímeros sintéticos, de origens vegetal ou marinha por polímeros de origem microbiana, consiste no fato da produção ser independente de condições climáticas e suas propriedades físico-químicas serem pouco afetadas por variações nas condições climáticas, cultivo, produção, sendo suscetível a biodegradação natural, resultando em baixo impacto ambiental, diminuindo a poluição (GARCIA-CRUZ, 1997, ROSEIRO, 1992; (KAWAI, 1992). Além disso, as gomas de origem microbiana apresentam maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas, devido à especificidade do microrganismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros do processo fermentativo, como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo de fermentação e composição do meio de cultura (BONGIOVANI, 2008).

2.2. Misturas de polímeros: estratégia para obtenção de melhores propriedades físico-mecânicas e reológicas

A estratégia de preparação de misturas de hidrocolóides, visando a obtenção de géis, com boas propriedades físico-mecânicas, é muitas das vezes vantajosa, visto que possibilita reunir, num só material, a combinação de duas ou mais propriedades físico-mecânicas para a aplicação desejada (OPPERMANN *et al.*, 1992).

A incorporação de carboximetilcelulose (CMC), exemplo de hidrocolóide polieletrólito, em soluções de amido (hidrocolóide neutro), tem sido amplamente estudada, indicando que a CMC atua como agente modificador das propriedades reológicas do amido (YASEEN, 2005; ROHR, 2007) Segundo YOO (2005) as misturas de CMC e amido modificam as propriedades reológicas finais dos componentes, adequando os valores de viscosidade para seu processamento, aplicabilidade e estabilidade em soluções aquosas.

A literatura registra vários estudos referentes às propriedades viscoelásticas de misturas de hidrocolóides com amido. Os resultados destes estudos indicaram que a adição de hidrocolóides com características de polieletrólito, em particular o CMC, aumentam o módulo elástico da mistura, devido à formação de estrutura rígidas do tipo “*solid-like*” (ALLONCHE *et al.*, 1989 ; MARTINES PADILLA *et al.*, 2004 ; SUDHAKAR, 1996).

No estudo realizado por ABDULMOLA (1996) e por CHRISTIANSON (1981) com a mistura goma xantana/ amido, foi observado que o aumento do teor de goma xantana presente na mistura acarreta um aumento da viscosidade da mistura, influenciando também os processos de gelatinização e retrogradação do amido, sendo estes efeitos atribuídos às fortes interações da amilose com o hidrocolóide

ROSS-MURPHY (1995 e 1996) realizou um relevante estudo envolvendo misturas de goma xantana e goma guar em mistura com o amido. Os resultados mostraram que a mistura xantana/amido apresentou um caráter mais elástico quando comparado com a mistura guar/amido; sendo este resultado atribuído à presença de uma estrutura molecular conformacional rígida e ordenada, conferida pela goma xantana, possibilitando assim um maior reforço à estrutura tridimensional da pasta de amido.

2.3 Inoculantes

Os inoculantes agrícolas podem ser divididos em três principais categorias: os inoculantes rizobianos, os inoculantes com bactérias promotoras do crescimento e os inoculantes com microrganismos entomo-patogênicos. Essas tecnologias são fundamentais para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, visto que elas contribuem para reduzir a utilização de insumos como fertilizantes e pesticidas, reduzindo o impacto ambiental e o custo da atividade agrícola (PHILLIPS, 2004)

Segundo BASHAN (1998), os inoculantes bacterianos são formulações contendo uma ou mais estirpes bacterianas, sendo as principais funções a promoção do crescimento e desenvolvimento vegetal através de mecanismos como o biocontrole de agentes fitopatogênicos, otimização do crescimento pela produção de fitormônios, ocorrendo de forma concomitante ou não com a fixação do nitrogênio atmosférico.

Na produção de inoculantes rizobianos, torna-se necessária uma rigorosa seleção de estirpes com alto grau de eficiência, aliada à formulação de veículos de inoculação eficientes e com potencial para aplicações industriais (FERNANDES, 2006).

Atualmente o veículo de inoculação mais utilizado é a turfa, que encontra-se apresentada na Figura 1 e classificada como combustível fóssil de idade recente, sob o ponto de vista geológico, resultante da lenta decomposição de vegetais em ambiente aquoso (BRADY, 1989). As principais características que asseguram a aplicação da turfa, como veículo de inoculação, são o teor de matéria orgânica e a capacidade de retenção de água. Embora a turfa seja o veículo de inoculação mais utilizado, a mesma

apresenta algumas desvantagens que comprometem o desempenho dos inoculantes, tais como: em função da intensa aplicação da turfa, as turfeiras indicadas para a produção de inoculantes, estão se tornando cada vez mais raras, submetendo assim o material a percorrer longas distâncias (DEAKER *et al.*, 2004).

Em alguns países, em função de políticas adotadas para preservação de regiões de terras úmidas, a exploração de turfeiras é controlada ou proibida (TEMPRANO *et al.*, 2002).

Outro fator relevante no crescimento e manutenção das células rizobianas é o potencial hidrogeniônico (pH), as fontes de turfa utilizadas para a produção de inoculantes são bastante ácidas, tornando assim necessária a correção do pH utilizando carbonato de cálcio ou magnésio (DEAKER *et al.*, 2004).



Figura 1. – Inoculante Turfoso

2.4.Utilização de Polímeros como Veículos de Inoculação

Vários materiais têm sido testados como veículos de inoculação por apresentarem baixo custo, por exemplo, bagaço de cana, serragem, turfa derivada de cacau, casca de arroz, farelo de trigo, carvão vegetal, fosfato de rocha, pó de carvão, lignina entre outros (PANDLEY & MAHESHWARI, 2007).

DENARDIN & FREIRE (2000) e BASHAN e colaboradores (2002) em estudos com alginato e goma xantana, mostraram que esses polímeros, além de serem biodegradáveis e de baixo custo, promoveram o encapsulamento das células contendo microrganismos, liberando-as após a degradação do material. Os estudos mostraram que durante o encapsulamento as células são protegidas contra os estresses ambientais. Estas características representam um indicativo, em relação ao favorecimento da

multiplicação e sobrevivência das células quando aplicadas ao solo. Entretanto apresentaram baixo nível de sobrevivência dessas células por mais de 1 mês.

A literatura registra utilização de poliácridonitrila e goma arábica, como veículos de inoculação, os resultados destas pesquisas apresentaram baixo impacto científico e tecnológico, em função da incompatibilidade dos polímeros em sistemas aquosos contendo microorganismos (ROHR, 2007).

Considerando que esta dissertação versa sobre a mistura entre CMC/amido, a seguir serão abordadas algumas características desses materiais.

2.5. Carboximetilcelulose (CMC)

A carboximetilcelulose (CMC) é um típico hidrocolóide obtido através da reação de celulose com monocloroacetato de sódio. Em função de propriedades como solubilidade em água fria e quente, baixa a alta viscosidade em solução, capacidade de formação de filme, certo grau de adesividade, características de suspensão, retenção de água, resistência a óleos, gorduras e solventes orgânicos e capacidade de formação de gel, a CMC tem sido amplamente utilizada na indústria alimentícia no desenvolvimento e processamento de produtos (CANCELA, 2005).

A estrutura da CMC é baseada no polímero β -(1,4)-D-glucopiranosose da celulose (Figura 2) em função de diferentes metodologias de preparação a CMC pode apresentar diferentes graus de substituição, o grau médio de substituição (GS) dos grupamentos hidroxila (OH) apresenta valor acima de 0,5, podendo chegar até 0,9 OH/glucose, sendo este valor suficiente para alcançar as propriedades desejadas (FUJIMOTO, 2002).

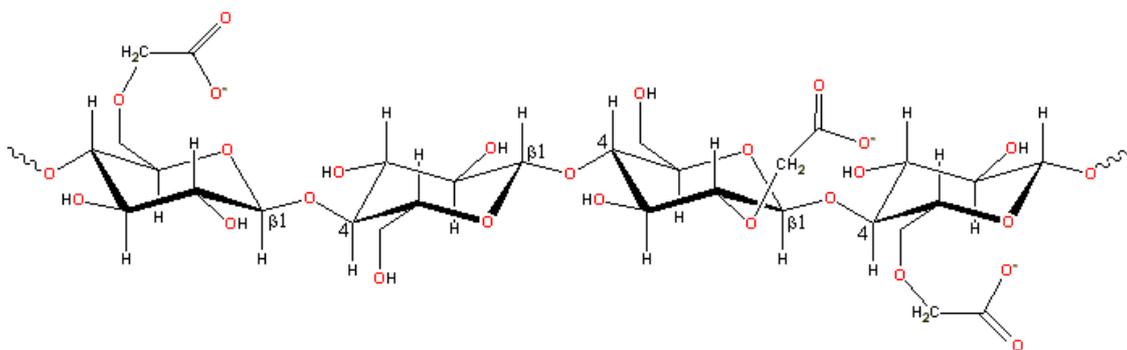


Figura 2. Molécula da Carboximetilcelulose (KÄISTNER, 1996)

As moléculas de CMC em baixas concentrações apresentam-se na maior parte em conformação estendida (*rod-like*) em função da repulsão eletrostática distribuída ao longo da cadeia principal do polímero, no entanto, com o aumento da concentração, as moléculas se enovelam, ocorrendo o emaranhamento conduzindo a formação de um gel termoreversível. Diminuindo a força iônica assim como reduzindo o pH, ocorre um decréscimo da viscosidade conduzindo o polímero a uma conformação ainda mais espiralada. (KÄISTNER, 1996).

A literatura registra que o tipo de CMC, a temperatura e particularmente a concentração, influenciam o comportamento reológico de dispersões de CMC (PILIZOTA, 1996). CANCELA (2005), em seus estudos de misturas de CMC e sucrose, constatou que todas as amostras com e sem sucrose, apresentaram comportamento não newtoniano e pseudoplástico, indicando que a pseudoplasticidade seja causada pela orientação das macromoléculas de CMC, em função do alinhamento à direção da força cisalhante (ROZEMA, 1974).

2.6. Amido

Amplamente utilizado na indústria de alimentos, o amido é um componente que apresenta elevado valor calórico e melhora as propriedades funcionais, em sistemas alimentícios, consiste em uma matéria-prima renovável, biodegradável, não tóxica, cuja obtenção pode ser através das raízes e dos tubérculos, como a mandioca e a batata, bem como dos cereais como, o trigo, o milho e o arroz (VAN DER BURGT *et al.*, 2000).

Adicionalmente, o amido pode servir de matéria-prima na indústria têxtil, podendo ser utilizado na elaboração de compostos farmacêuticos e de materiais termoplásticos biodegradáveis, bem como na produção de resinas naturais (CEREDA, 2001).

As unidades glicosídicas do amido recebem numeração de 1 a 6, como se apresenta na Figura 3, essas numerações facilitam a compreensão das propriedades e reatividade do amido (BULÉON, 1998; SWINKELS, 1985). O amido se apresenta na forma de discretos grânulos, com forma e tamanho dependentes de sua fonte botânica, sendo composto basicamente por duas macromoléculas: amilose e amilopectina, sendo a proporção entre amilose e amilopectina variável dependendo da sua fonte botânica. Estas proporções conferem características específicas ao amido (BILIADERIS, 1991).

A amilose é uma molécula essencialmente linear formada por unidades de D-glicose ligadas em α (1 \rightarrow 4) com um pequeno número de ramificações, podendo ser representada por uma estrutura linear com a possibilidade de formação de estruturas helicoidais, os valores de amilose reportados na literatura para amido de mandioca podem variar de 17,0 a 18,0% (SARMENTO, 1997), 13,6 a 23,8% (RICKARD, 1991), 17,9 a 23,6% (DEFLOOR, 1998), 8,5 à 25,4% (BERMUDEZ, 1997).

A amilopectina é uma molécula altamente ramificada formada por unidades de D-glicose ligadas em α (1 \rightarrow 4) e com 5 a 6% de ligações α (1 \rightarrow 6) nos pontos de ramificação, podendo ser representada por uma estrutura ramificada. O amido apresenta microestruturas compostas por regiões amorfa e cristalina, (amilose e amilopectina) sendo suas respectivas estruturas químicas apresentadas na Figura 4 (FRENCH, 1984).

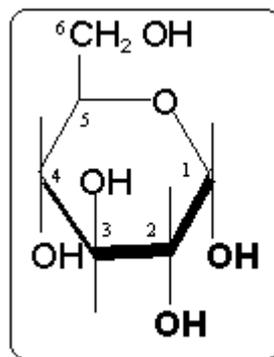


Figura 3. Molécula de Glicose (SWINKELS, 1985)

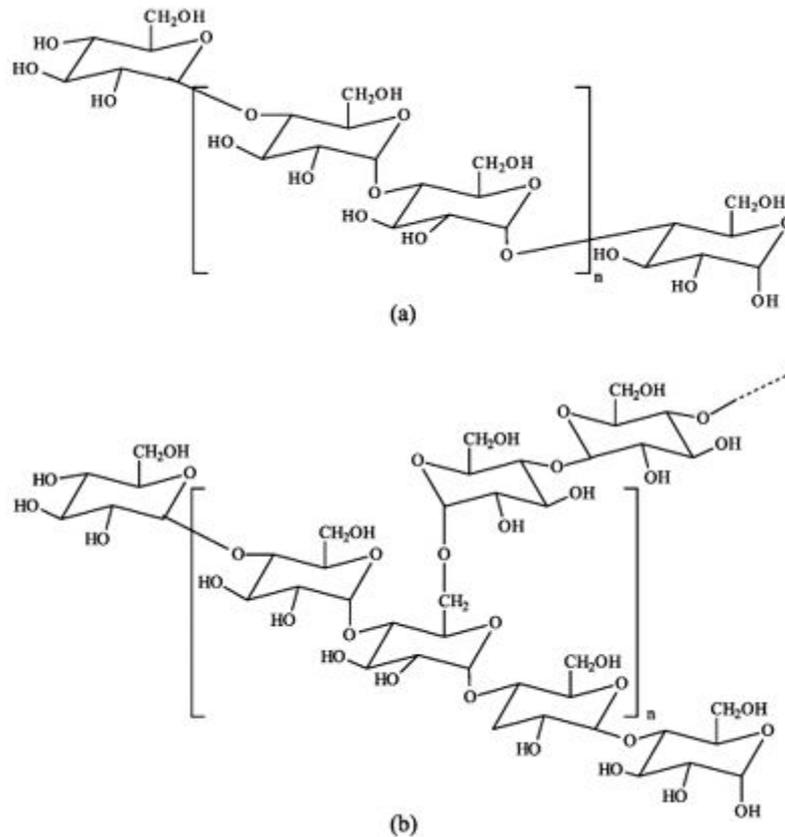


Figura 4. Estrutura Química da amilose (a) e amilopectina (b) (CORRADINI, 2005)

Os fenômenos de modificação estrutural no amido, dissolução e gelatinização, estão intimamente vinculadas aos seguintes fatores: relação água/amido, razão de aquecimento, morfologia, proporção amilose/amilopectina, taxa de cisalhamento, distribuição e tamanho dos grânulos (MESTRES, 1996).

Um dos fenômenos mais importantes no processamento do amido é a gelatinização. Abaixo da temperatura de gelatinização, os grânulos de amido nativos são insolúveis em água, apresentam parcial expansão em água fria, cerca de 10 à 20%, em função dos processos de difusão e absorção de água dentro das regiões amorfas, no entanto, trata-se de um processo reversível através da secagem (BILIADERIS, 1991).

Nas regiões amorfas, a expansão é mais expressiva para as macromoléculas de amilose, ocorrendo pouca expansão das macromoléculas de amilopectina, o fator limitante desta expansão está vinculado à restrição promovida pelas camadas essencialmente contínuas da amilopectina cristalina (MORRISON, 1995).

Quando o grânulo de amido é aquecido em excesso de água (>60%), as pontes de hidrogênio presentes nas regiões amorfas são rompidas conduzindo ao

intumescimento do grânulo. As ligações fortes, presentes na região miscelar, possibilitam que o grânulo permaneça inalterado até que estas se rompam em alguns pontos.

Nessa condição, a expansão dos grânulos torna-se irreversível, resultando no desaparecimento da ordem estrutural, constatada pelo fenômeno de perda da birrefringência, determinada através da técnica de microscopia de luz polarizada e pelo desaparecimento da cristalinidade evidenciada pela técnica de difração de raios-X (GARCIA, 1997). Caso os grânulos continuem a se expandir, a amilose é lixiviada para a fase aquosa entre os grânulos iniciando, assim, o processo de gelatinização, como mostra a Figura 5 (BILIADERIS, 1991).

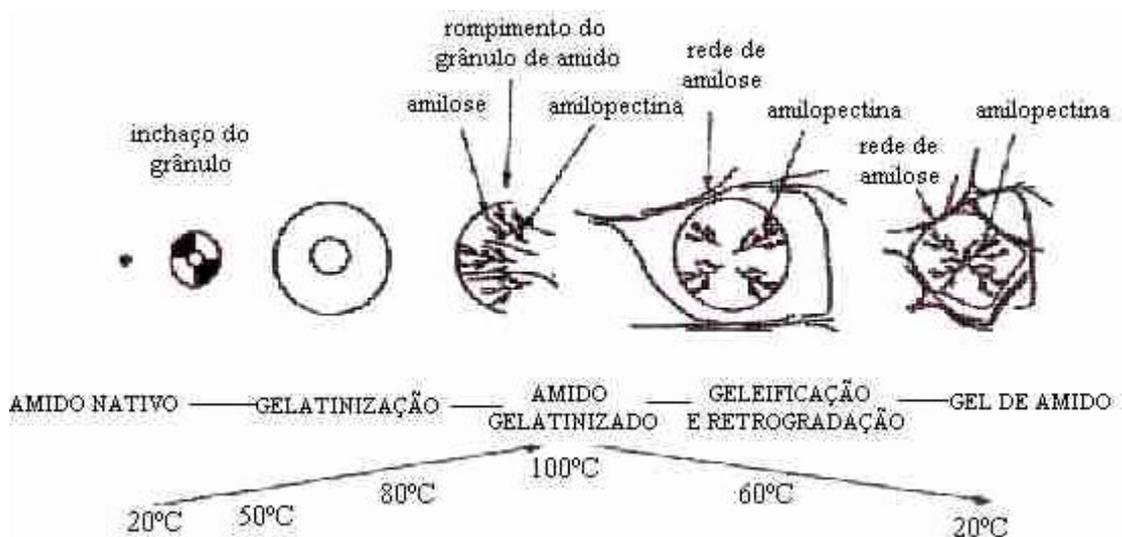


Figura 5. Modificação do estado do amido com excesso de água sob tratamento térmico Bornet (1991).

A literatura registra a utilização de diferentes técnicas para estudo dos processos de gelatinização e retrogradação do amido tais como: análise térmica (WADA *et al.*, 1979; SHIOTSUBO & TAKAHASHI, 1984; NAKAZAWA *et al.*, 1985; SLADE & LEVINE, 1987), difração de raios-X (ZOBEL *et al.*, 1988; I'ANSON *et al.*, 1988) e ressonância magnética nuclear (RMN) (CHINACHOTI *et al.*, 1991; GERMAN *et al.*, 1992).

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é particularmente indicada para investigar as transições de fase de sistemas água/amido, em função de permitir o estudo do processo de gelatinização do amido ao longo de uma extensa faixa de relação

água/amido, determinação das temperaturas de gelatinização acima de 100⁰C e fornecer uma estimativa das entalpias de transição envolvidas (BILLIADERIS, 1980).

2.7 Exopolissacarídeos: Definições, Propriedades e Fontes de Obtenção

Os exopolissacarídeos (EPS) são metabólitos secundários, produzidos principalmente durante a fase estacionária do crescimento microbiano, podendo ser homopolímeros ou heteropolímeros que geralmente são característicos de grupos de microrganismos (SUTHERLAND, 1998). Segundo ARANDA-SELVERIO e colaboradores (2010), quanto à classificação dos EPS, os homopolímeros, geralmente, são compostos por glucanas neutras; enquanto que os heteropolímeros são em sua grande maioria polianiônicos, devido à presença de ácido urônico.

A indústria dos segmentos de alimentos e farmacêutico vem há vários anos, utilizando alguns EPS produzidos por bactérias no desenvolvimento de produtos com características de origem biológica de obtenção rápida e barata (SUTHERLAND, 1998).

No setor farmacêutico, os EPS são utilizados como veículos para administração oral de medicamentos (BILLA *et al.*,2000), enquanto que no setor de alimentos, são utilizados como espessantes, em função de contribuir para o aumento da viscosidade de alimentos (RINAUDO, 2008).

As características físico-químicas dos polissacarídeos dependem da sequência em que os açúcares estão dispostos na molécula, da presença de resíduos iônicos e da forma como as cadeias se entrelaçam (KUMAR, 2007 ; VIJAYENDRA, 2008), ocorrendo a tendência de aumento da solubilidade dos polímeros em função da presença de ácidos ionizáveis na molécula, sendo a viscosidade das soluções de polissacarídeos modificadas pela presença de sais inorgânicos (DIAZ, 2004).

Em função de seu caráter hidrofílico, quando solubilizadas, as moléculas de EPS são capazes de se reorganizarem de duas maneiras distintas: a) pela retenção de moléculas de água – efeito de espessamento e b) pela construção de redes envolvendo zonas de ligação – efeito de gelificação (PENNA, 2004).

PADMANABHAN (2003) e TANFORD (1980) relatam em seus trabalhos que gelificação é um processo caracterizado por ligações físicas entre as cadeias poliméricas que mantém ou aumentam suas ligações com a água; por outro lado, na precipitação, as cadeias poliméricas se ligam através de grupos ou zonas hidrofóbicas, reduzindo assim sua interação com a água.

A caracterização dos EPS microbianos consiste em um fator muito importante para a determinação da aplicabilidade desses biopolímeros, como por exemplo, a avaliação reológica que fornece informações a respeito da estrutura molecular e de possíveis aplicações biotecnológicas (KACI *et al.*,2005).

A literatura mostra que EPS isolados de rizóbio, geralmente, apresentam comportamento não-newtoniano e pseudoplástico (KACI *et al.*,2005 ; ARANDA-SELVERIO *et al.*, 2010), entretanto, apesar do comportamento pseudoplástico, a viscosidade aparente de soluções de EPS de diferentes estirpes de rizóbios, pode variar em uma mesma taxa de cisalhamento, ampliando o potencial de aplicação biotecnológica desses biopolímeros (ARANDA-SELVERIO *et al.*, 2010),.

BONGIOVANI (2008), estudou a influência da fonte de carbono (glucose, sacarose e frutose) nas propriedades viscoelásticas do EPS, *Botryosphaeria* utilizando glucose como fonte de carbono (EPSGLU), as Figuras 6 e 7, ilustram o EPSGLU produzido pelo *Botryosphaeria rhodina*, em diferentes concentrações. Os resultados mostraram que apresenta características de gel forte nas temperaturas de 5 e 25⁰C, não sofrendo mudanças no comportamento reológico, mesmo em presença de cloreto de sódio (NaCl), indicando a viabilidade de sua utilização nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e biomédica.

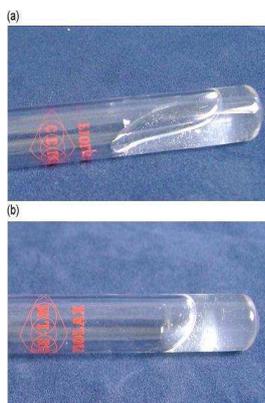


Figura 6 - Soluções aquosas do EPSGLU a temperatura de 25°C. (a) 3 g/L e (b) 6 g/L. (BONGIOVANI, 2008).

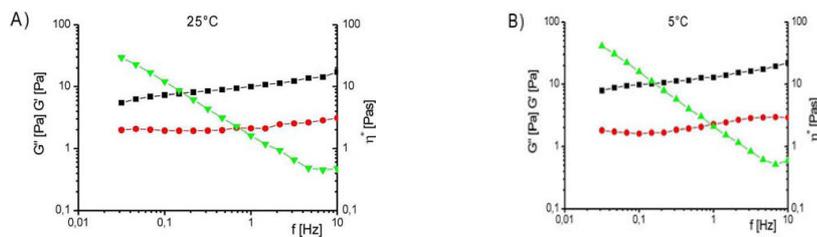


Figura 7 - Análise do comportamento viscoelástico do EPSGLU em 6 g/L; (A) em solução aquosa a 25°C; (B) em solução aquosa a 5°C (BONGIOVANI, 2008)

Os EPS bacterianos podem ser classificados em grupos de moléculas de acordo com suas propriedades químicas e reológicas. A Tabela 1 apresenta EPS de importância relevante com respectivos microrganismos precursores e características funcionais.

Grande parte dos hidrocolóides bacterianos, utilizados industrialmente, recebe a denominação de “goma”, tecnicamente considerado sinônimo de hidrocolóide, porém este termo tem sido mais aplicado aos biopolímeros que atuam como espessantes de soluções aquosas, mesmo em pequenas concentrações (CUNHA *et al.*, 2004).

As espécies de bactérias formadoras de nódulos em leguminosas diferem bastante em relação à capacidade e quantidade de EPS produzidos (SUTHERLAND, 1996; CASTELLANE & LEMOS, 2007). Os primeiros estudos em relação à composição química dos EPS rizobianos foram realizados na década de 1970, identificando a capacidade do *Rhizobium meliloti* (atualmente *Sinorhizobium meliloti*) em produzir elevadas quantidades de succinoglucanas, cujos monômeros foram identificados como glicose, galactose, ácido pirúvico e radicais O-acil na proporção 7:1:1:1 (BJORNDAL, 1971).

Alguns rizóbios são capazes de produzir elevadas quantidades de EPS, sendo a produção de EPS por isolados de rizóbio, função da forma de cultivo das culturas bacterianas (DUTA *et al.*, 2006). A formulação do meio de cultura influencia expressivamente na produção de EPS pelas estirpes rizobianas, diversas estirpes de rizóbio são capazes de produzir grandes quantidades de EPS em meios de cultura, variando em função do meio de cultura e, principalmente, pela fonte de carbono (TAVERNIER *et al.*, 1997 ; CASTELLANE & LEMOS, 2007) e de sais (DUTA *et al.*, 2005).

TABELA 1. Exopolissacarídeos produzidos por alguns microrganismos.

EPS	Características	Microorganismo	Referência
Alginato	Linear; Ácido	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Azotobacter vinelandii</i>	EVANS & LINKER, 1973 GORIN <i>et al.</i> , 1966.
Marginalana	Galactoglucana ácida	<i>Pseudomonas</i> sp	FETT <i>et al.</i> , 1995.
Xantana	Cadeia celulósica ramificada	<i>Xantomonas campestris</i>	JANSSON <i>et al.</i> , 1975
Gelana Welana Rhamsana	Linear; Ácido	<i>Sphingomonas</i> sp	SUTHERLAND, 1996
Amilovorana Stewartana	Ramificado; Ácido	<i>Erwinia</i> sp.	NIMITZ <i>et al.</i> , 1996
Acetana	Cadeia celulósica ácida ramificada	<i>Acetobacter</i> sp.	COLQUHOUN <i>et al.</i> , 1995
Succinoglucana Galactoglucana	Ramificado; Neutro Linear; Neutro	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	LEIGH & WALKER, 1994 GONZÁLES <i>et al.</i> , 1996
Polímero V2-7	Sulfatado	<i>Halomonas eurihalina</i>	BÉJAR <i>et al.</i> , 1998
Zooglana	Ramificado; Neutro	<i>Zoogloea ramigera</i>	TROYANO <i>et al.</i> , 1996
Ácido Colânico	Ramificado; Ácido Variável	<i>Escherichia coli</i> <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.	SUTHERLAND, 1969 CERNING, 1990 VAN DER BERG, 1995

Tabela Adaptada (SERRATO, 2008)

Estas características indicam a viabilidade de produção do EPS em condições controladas de laboratório, apresentando-se como uma alternativa de baixo custo para a produção de EPS, representando assim uma atividade alternativa para as empresas de inoculantes, principalmente no período de entressafra da soja, quando a produção de inoculantes é muito baixa no Brasil (FERNANDES *et al.*, 2010).

A espécie *S. meliloti* apresenta dois principais EPS exsudados: succinoglucanas (EPS I) e galactoglucanas (EPS II), o EPS II é um polímero formado por monômeros dissacarídeos formados por galactose-glicose ligados através de ligações do tipo β , as estruturas químicas dos EPS I e EPS II são apresentadas na Figura 8 (SKORUPSKA *et al.*, 2006), apresentando menor peso molecular que o EPS I, polímero formado por monômeros octassacarídeos, compostos por glicose-galactose (7:1), também ligados através de ligações do tipo β (BECKER *et al.*, 2002 ; SKORUPSKA *et al.*, 2006)

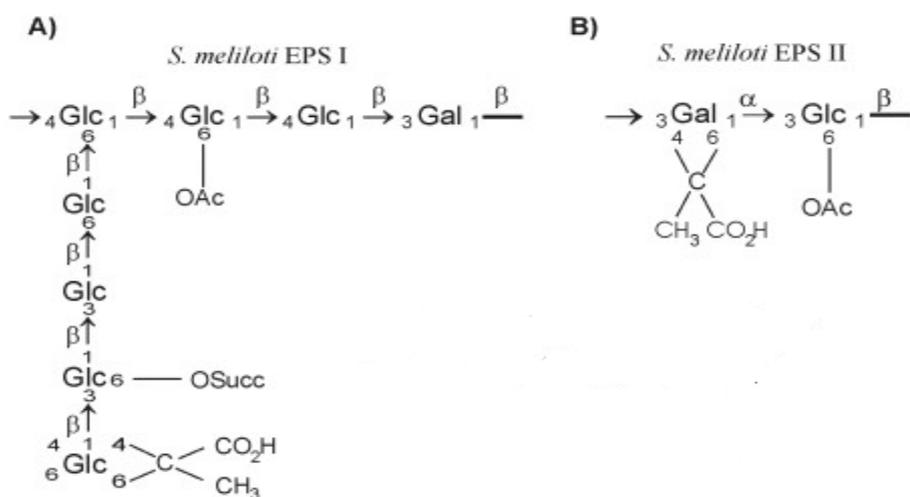


Figura 8- Monômeros de exopolissacarídeos de *Sinorhizobium meliloti* A: EPS I e B: EPS II (Glc-glicose ; Gal-galactose ; Succ-succinato ; Ac-acetil) figura retirada e adaptada de (SKORUPSKA *et al.*, 2006).

3. OBJETIVO

Este trabalho de dissertação teve como principal objetivo, estudar as propriedades reológicas das misturas entre CMC/amido e CMC/EPS.

Objetivos Específicos

Este trabalho teve como objetivos específicos:

- Estudar a interação carboximetilcelulose (CMC) e amido com e sem íons zinco e exopolissacarídeos (EPS), utilizando como ferramentas a reologia e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC);
- Estudar a biocompatibilidade do sistema CMC/EPS por testes de sobrevivência.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais (Preparação das misturas poliméricas)

- Carboximetilcelulose alta viscosidade (CMC) procedência Quimesp S.A ;
- Amido solúvel P.A. (modificado) procedência Vetec S.A;
- Óxido de Zinco P.A. procedência Vetec. S.A.;
- Água destilada;

4.2 Materiais (Obtenção dos exopolissacarídeos)

- Estirpes de *Rhizobium tropici* (BR520 e BR322), procedência da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia;
- Meio Líquido YME (pré-cultivo);
- Meio Líquido RDM com elementos traço e vitaminas (cultivo);
- Etanol 95^o GL;

4.3 Equipamentos (Preparação das misturas poliméricas)

- Autoclave;
- Liquidificador;
- Reômetro Oscilatório modelo RS1 (Thermo Haake, Alemanha), com geometria de placas paralelas PP35Ti.
- Banho de Aquecimento e Refrigeração modelo DC10 K10 (Thermo Haake, Alemanha).
- Calorímetro Exploratório Diferencial modelo DSC200F3 Maia (Netzsch, Alemanha).
- Microscópio Eletrônico de Varredura modelo JSM-6490-LV (Jeol, Japão).

4.4 Equipamentos (Obtenção dos exopolissacarídeos)

- Agitador Orbital.
- Estufa de Esterilização e Secagem.

- Thermo-Mixer Compact-Eppendorf (Eppendorf-Alemanha).
- Centrífuga Beckman modelo J2-21. (Beckman-Estados Unidos)
- Micropipeta (50 μ L).
- Filtro com membrana de celulose.
- Vidraria geral (tubo de ensaio, erlenmeyer, pipeta volumétrica e placa de petri).

4.5 Preparação das misturas

Misturas CMC/amido

A concentração da mistura usada foi de 64 g de mistura polimérica por litro de água destilada, variando a composição CMC/Amido de 100/0 a 20/80. Foram feitas também misturas poliméricas contendo ZnO, com teor de 1,0 % de mistura. Todas as amostras foram autoclavadas a 100°C e 1,3 Kgf/cm² durante 30 min.

Misturas CMC/EPS

Foram preparadas misturas contendo 1g/litro de CMC de alta viscosidade em água destilada, sob agitação constante e a temperatura de 25°C, por 10 min. Após a solubilização de todas as amostras de CMC, foram retiradas, duas alíquotas dessa solução, 20 ml, as quais foram adicionadas 5 e 10 mg do EPS, previamente preparado e descrito no item 4.6.3.

Foram preparadas duas soluções para *Bradyrhizobium japonicum* (BR 3267) – EPS-jap; *Rhizobium tropici* (BE 322) – EPS-trop; e do *Bradyrhizobium. elkanii* (BR 29) – EPS- elk. Os valores de massas do EPS e de CMC, utilizados para preparação das misturas CMC/EPS, foram baseados em testes preliminares conduzidos no laboratório, visando a adequação das misturas para realização dos ensaios de caracterização posteriores.

4.6 Obtenção dos exopolissacarídeos

4.6.1 Pré-cultivo

As estirpes de *Rhizobium tropici* foram pré-cultivadas por dois dias em tubos de ensaio contendo 10mL de meio YME líquido sob agitação constante de 150 rpm.

4.6.2 Cultivo

Após o crescimento do pré-inóculo, uma alíquota de 50µL foi inoculada em erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura líquido RDM (composição apresentada na Tabela 2). As bactérias foram cultivadas sob agitação constante de 150 rpm por três dias.

4.6.3 Isolamento e quantificação dos EPS

Estirpes bacterianas e condições de crescimento:

Foi montado um experimento para avaliar o crescimento e a produção de exopolissacarídeos e poli-hidroxibutirato por estirpes de rizóbio em dois meios de cultura diferentes. As estirpes bacterianas utilizadas foram: BR3267 de *Bradyrhizobium japonicum*; BR 29 de *B. elkanii* e BR 322 de *Rhizobium tropici*. As estirpes foram pré-cultivadas por 2 ou 4 dias respectivamente em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio YME líquido sob agitação constante de 150 rpm.

Após o crescimento do pré-inóculo, uma alíquota de 50 µL foi inoculada em Erlenmeyers com a capacidade de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido, onde os meios de cultura utilizados foram os meios YEM líquido (VINCENT, 1970) sem indicador e RDM (BISHOP *et al.*, 1976), cujas composições estão descritas nas tabelas 1 e 2. O meio RDM foi utilizado escolhido para este teste por ter sido utilizado por CASTELLANE e LEMOS (2007) para avaliar a composição monomérica de EPS de rizóbio.

O caldo de cultivo foi centrifugado sob temperatura de 40⁰C por 30 min. O sobrenadante foi separado do precipitado e uma alíquota de 10 mL do sobrenadante foi filtrada em membrana de celulose com poros de 0,22 µm para separar a solução de EPS das células. O filtrado foi lavado com etanol e centrifugado. O precipitado foi lavado por 6 vezes em 10 mL de etanol gelado, sendo ressuspenso novamente em etanol, seco a vácuo a 60⁰C e pesado .

Tabela 2. Composição de Meio de Cultura RDM

Reagentes Presentes	Concentração (mg/L)	Reagentes Presentes	Concentração (mg/L)
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,125	Ácido Trinitriloacético	7
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0043	Riboflavina	0,02
CoCl ₂	0,07	Ácido p-aminobenzóico	0,02
Na ₂ MoM ₄	0,125	Ácido Nicotínico	0,02
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,108	Mio-inositol	0,12
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005	Tiamina	0,02
CaCl ₂	5	Pantotenato de Cálcio	0,02
H ₃ BO ₃	0,145	Biotina	0,02
K ₂ HPO ₄	230	Piridoxina	0,02
MgSO ₄	100	Glutamato de Sódio	1100

Tabela Adaptada (BISHOP *et al*, 1976)

Preparação dos exopolissacarídeos.

As amostras que foram feitas a partir dos EPS precipitados e suspensos em água, no primeiro dia das análises dos EPS, todas as amostras foram suspensas em água em um termomixer a temperatura de 50°C sob agitação constante de 1400 rpm. A concentração das amostras era de 10 mg/mL.

As amostras foram ressuspensas em água nas mesmas condições acima, porém estavam na concentração de 5 mg/mL, exceto a amostra EPS 53.5b que tinha a concentração de 1 mg/mL.

Os EPS utilizados na preparação as amostras receberam a seguinte denominação:

- a) EPS produzido *Bradyrhizobium japonicum* (BR 3267) – EPS-jap.
- b) EPS produzido *Rhizobium tropici* (BE 322) – EPS-trop
- c) EPS produzido *Bradyrhizobium. elkanii* (BR 29) – EPS- elk

4.7 Ensaios Reológicos

4.7.1 Ensaios Estacionários

Foram realizadas rampas com taxa de cisalhamento controlada na faixa de 0 à 1000 1/s para obtenção do perfil de viscosidade em função da taxa de cisalhamento. Os ensaios foram realizados em diferentes temperaturas na faixa de 25 à 70⁰C, sendo os dados experimentais ajustados pelo modelo de Ostwald de Waele (Lei das Potências), Equação (1), um modelo de dois parâmetros, amplamente utilizado na literatura para descrever as propriedades de fluxo em fluidos não newtonianos, tanto em análises teóricas quanto em aplicações práticas da engenharia (BARNES *et al.*, 1991).

$$\tau = k.\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

Onde τ é a tensão de cisalhamento (Pa), $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento (1/s), K é o índice de consistência (Pa.s) e n o índice de comportamento de fluido (adimensional).

A viscosidade aparente ($\eta_{a,100}$) em taxa de cisalhamento de 100 1/s, foi obtida pela interpolação linear na curva de viscosidade em função da taxa de cisalhamento, em diferentes temperaturas (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70⁰C), que consiste num método de ajuste de curva utilizando polinômios lineares, descrito pela Equação (2), nas curvas de viscosidade.

$$y = a + bx \quad (2)$$

Onde y é a viscosidade dinâmica (Pa.s), x é a taxa de cisalhamento (1/s), a é o coeficiente linear (Pa.s) e b é o coeficiente angular (Pa.s²)

O efeito da temperatura na viscosidade aparente de fluidos em uma determinada taxa de cisalhamento, pode ser descrita pela relação de Arrhenius, na qual a viscosidade aparente decresce exponencialmente com a temperatura Equação (3) (RAO, 1999)

$$\eta_{a,100} = A.\exp(E_a/RT) \quad (3)$$

Onde $\eta_{a,100}$ é a viscosidade aparente (Pa.s) à 100 1/s, A é uma constante (Pa.s), R a constante dos gases ideais (8,3144 J/mol.K), T a temperatura absoluta (K) e E_a a energia de ativação (J/mol).

Posteriormente os resultados interpolados das viscosidades aparentes foram plotados em um gráfico em escala logarítmica, de viscosidade aparente versus inverso da temperatura (1/T) em graus Kelvin, obtendo-se relações lineares entre as grandezas, através da determinação do coeficiente angular das retas obtidas, utilizando-se em conjunto a equação (3), torna-se possível a determinação da energia de ativação de fluxo.

4.7.2 Ensaios Dinâmicos

i) Ensaios de Varredura de Amplitude

Foram realizados ensaios de varreduras de amplitude na faixa de 0,01 à 100 Pa com frequência fixa de 1,0 Hz a 25⁰C para determinação da região de viscoelasticidade linear.

ii) Ensaio de Varredura de Frequência

Foram realizados ensaios de varreduras de frequência na faixa de 0,06 à 291,6 rad/s com amplitude de tensão de 5 Pa a 25⁰C, dentro da região de viscoelasticidade linear.

iii) Ensaio de Fluência e Recuperação

Os ensaios de fluência e recuperação foram conduzidos à tensão constante de 5 Pa durante 180 s; posteriormente mantidos sob tensão de cisalhamento nula, durante 180 s para observação da recuperação das estruturas.

4.8 Ensaio de DSC

Para os ensaios de DSC foram utilizadas amostras com massa aproximada de 5mg. A faixa de varredura de temperatura foi de +30 à +250⁰C, utilizando uma razão de aquecimento de 10⁰C/min, sob atmosfera de nitrogênio e vazão de gás de 50 mL/min.

4.9 Ensaio de MEV

A morfologia das amostras foi observada utilizando MEV com elétrons secundários. As amostras foram previamente secas durante um período de 24 horas em estufa. Posteriormente, as amostras foram fraturadas em nitrogênio líquido e as superfícies foram metalizadas com ouro. As imagens foram obtidas com aceleração de 30 kV e com ampliações na faixa de 150 até 1000x.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Comportamento de Fluxo das Misturas CMC/Amido Compatibilizadas e Não Compatibilizadas.

5.1.1 Rampa de Taxa de Cisalhamento Controlada.

Os ensaios estacionários fornecem informações relevantes em relação à classificação do fluido, permitindo a distinção entre comportamento newtoniano e não-newtoniano, os dados da variação de tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, das composições não compatibilizadas e compatibilizadas utilizando 1% ZnO, mantendo a temperatura constante em 25⁰C. Os resultados foram ajustados através do modelo reológico de Ostwald de Waele (Equação (1)).

Os resultados apresentados nas Tabelas 3 e 4 mostram que todas as composições apresentaram comportamento pseudoplástico, já que os valores de índice de comportamento de fluido na faixa de 0,10 à 0,32. A forte influência da concentração do amido foi constatada pelo aumento da magnitude dos valores do índice de comportamento de fluido em função do teor de amido. Encontra-se estabelecido na literatura que em concentrações muito baixas, polímeros como o CMC encontram-se em sua conformação mais estendida, com as moléculas estão amplamente separadas e a viscosidade apresenta leve dependência em relação à taxa de cisalhamento. Por outro lado, em concentrações mais elevadas, as cadeias poliméricas estendidas começam a se entrelaçar e conseqüentemente, a viscosidade aumenta.

As cadeias enoveladas iniciam o entrelaçamento com posterior emaranhamento, estabelecendo pontos de contato físico, que modificam o comportamento de fluxo. Nesta dissertação, foi utilizada uma solução polimérica altamente concentrada (64 g/L), sendo os resultados apresentados na Tabela 3, há boa correlação com a predição teórica, sendo que os valores de viscosidade apresentam alta dependência com a taxa de cisalhamento, conforme indicado pelos gráficos apresentados na Figura 9.

Tabela 3 – Parâmetros do Modelo Ostwald de Waele e Viscosidade Aparente ($\eta_{a,100}$) de Misturas de CMC/amido Não-Compatibilizadas (T=25⁰C)

Concentração CMC (%)	Viscosidade Aparente (Pa.s)	^a K(Pa.s)	^b n	^c R ²
100	10,57	618,90	0,10	0,90
80	8,14	452,00	0,14	0,93
60	3,22	112,40	0,22	0,99
50	2,62	88,22	0,23	0,99
40	1,33	30,86	0,32	0,99

^a K: Índice de Consistência; ^b n:Índice de Comportamento de Fluido, ^c R²:Coeficiente de Correlação.

O comportamento reológico da composição CMC puro (100%) encontra-se em conformidade com o apresentado pelos polieletrólitos. A CMC é um polímero solúvel em água, dependendo de sua concentração na solução aquosa, pode apresentar elevada tendência a formação de gel, este fenômeno pode ser atribuído às fortes interações intermoleculares oriundas das pontes de hidrogênio estabelecidas entre a água e grupamentos carboxila e hidroxila encontrados em uma macromolécula de CMC.

O comportamento mais rígido apresentado pela composição de CMC puro pode ser atribuído ao tipo de arranjo formado pelas cadeias desse polímero.

Por outro lado, o amido é um hidrocolóide neutro, sendo a formação de uma estrutura estável possível somente através de interações atrativas entre as cadeias poliméricas.

Na Tabela 4 observa-se que aumentando a quantidade de amido, o índice de consistência diminui e que após a adição de 1% ZnO, a viscosidade aparente também diminuiu. Este efeito pode ser atribuído ao fato da estrutura macromolecular se tornar menos organizada quando o teor de amido aumenta.

Quando ocorre o aumento da taxa de cisalhamento, mesmo estruturas rígidas e organizadas como a CMC 100/0 são conduzidas a um processo de desestruturação com um decréscimo rápido da viscosidade, foi observado também que, ao passo que as composições com alto teor de amido se tornaram mais diluídas, ocorre uma diminuição da dependência da viscosidade em relação a taxa de cisalhamento, o comportamento reológico se aproxima do comportamento de fluxo newtoniano.

Tabela 4 –Parâmetros Power Law e Viscosidade Aparente ($\eta_{a,100}$) das Misturas de CMC/amido Compatibilizadas (T=25^oC)

Concentração CMC (%)	Viscosidade Aparente (Pa.s)	^a K(Pa.s)	^b n	^c R ²
100	9,24	534,40	0,10	0,90
80	6,12	301,50	0,14	0,96
60	3,10	108,20	0,22	0,98
50	1,80	51,76	0,27	0,99
40	1,31	33,16	0,29	0,99

^a K: Índice de Consistência; ^b :Índice de Comportamento de Fluido, ^c Coeficiente de Correlação.

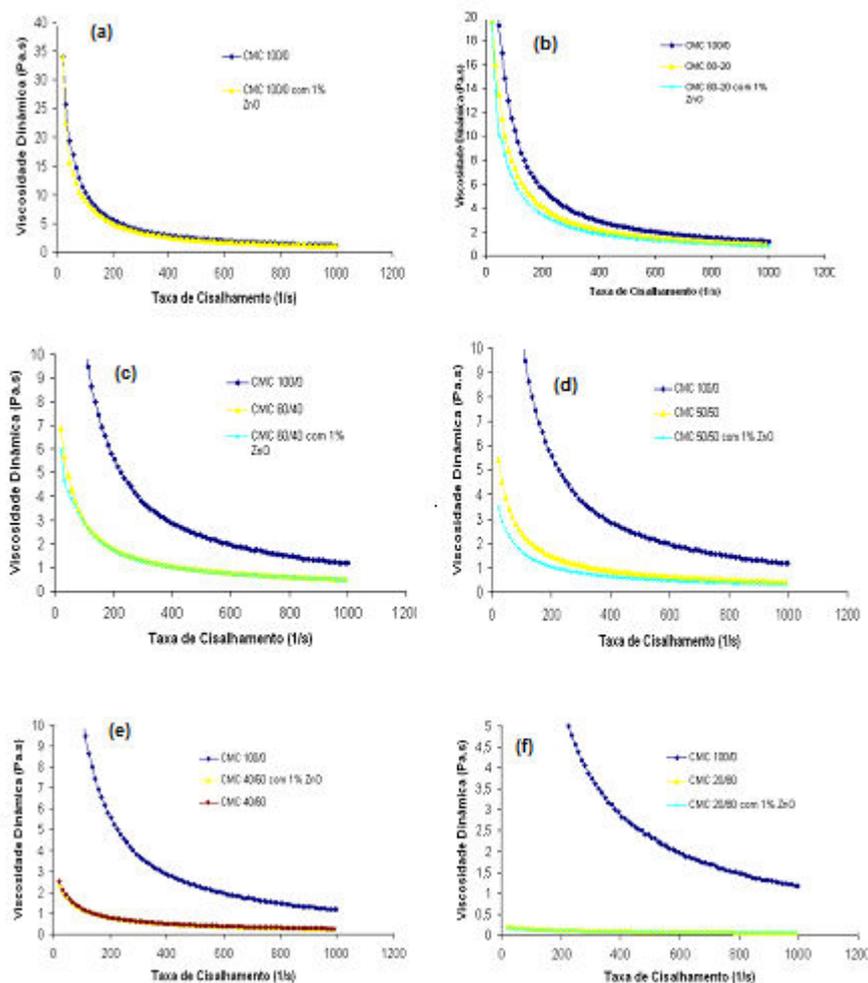


Figura 9. Curvas de Viscosidade em função da taxa de cisalhamento, para as misturas CMC/Amido não compatibilizadas e contendo 1% de ZnO: 100/0 (a), 80/20 (b), 60/40 (c), 50/50 (d), 40/60 (e), 20/80 (f)

5.1.2. Efeito da Temperatura na Energia de Ativação e Índice de Comportamento de Fluido

A temperatura exerce forte influência sobre a viscosidade aparente, índice de comportamento de fluido e índice de consistência. A Tabela 5 ilustra a energia de ativação de fluxo das misturas de CMC/Amido não compatibilizadas e contendo 1% ZnO. Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que a adição de ZnO diminui a energia de ativação, principalmente, para as composições ricas em CMC.

Tabela 5 – Energia de Ativação das Misturas CMC/amido Compatibilizadas e não-Compatibilizadas

Concentração CMC (%)	^a Energia de Ativação (J/mol)	^b Energia de Ativação (J/mol)
100	15,81	9,44
80	16,72	14,92
60	17,61	19,62
50	13,40	13,37
40	8,78	19,75

^asem ZnO; ^bcontendo 1% de ZnO.

Em relação aos parâmetros reológicos, através da Figura 10, observou-se que o índice de consistência diminui com o aumento da temperatura para ambas as misturas com e sem ZnO. Sendo verificado, um aumento representado por uma função polinomial, em função do teor de CMC.

Por outro lado, o índice de comportamento diminuiu com o aumento do teor de CMC, enquanto que aumentou linearmente com a temperatura, principalmente em amostras ricas em CMC. Para a composição 20/80 o índice de comportamento de fluido apresentou pouca dependência com a temperatura, aumentando o teor de CMC, o que levou a um aumento da pseudoplasticidade das composições estudadas.

Para as amostras ricas em amido, o comportamento se aproximou do comportamento de um fluido newtoniano ($n=1$), enquanto que a temperatura não modificou o comportamento de fluxo, indicando a baixa dependência do índice de comportamento de fluido em função da temperatura para amostras que apresentam alto

teor de amido. Este efeito pode ser atribuído às interações estabelecidas entre os íons zinco e grupamentos carboxila presentes nas macromoléculas de CMC, a interação carboxila-ZnO otimizou as interações entre grupamentos carboxila e hidroxila (amido) melhorando assim a interação com a fase amilácea.

Sendo assim, o aumento do teor de amido nas composições, reduziu o teor de CMC, e conseqüentemente reduziu a interação carboxila-ZnO, resultando numa diminuição da energia de ativação de fluxo (Tabela 5). Torna-se importante salientar que a energia de ativação de fluxo aumentou na composição 50/50, com subseqüente decréscimo na composição que apresentava teor de 40% em CMC, este comportamento anômalo pode ser atribuído a uma inversão de fase do sistema.

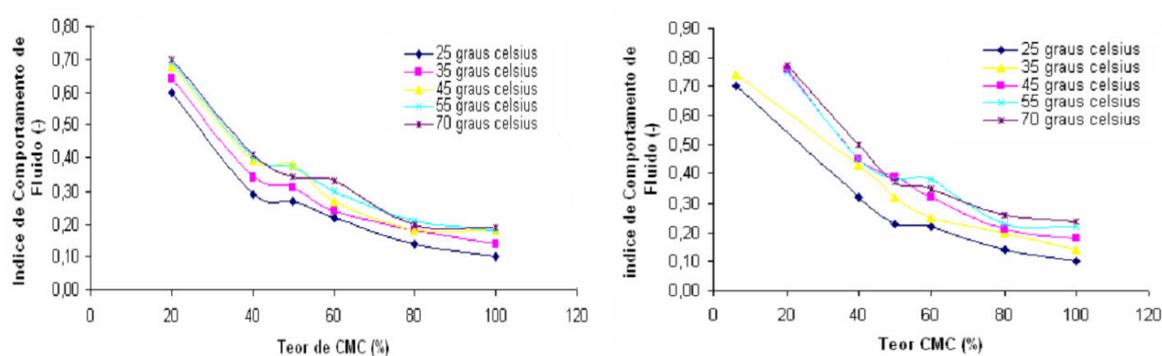


Figura 10. Variação do índice de comportamento de fluido em função do teor de CMC em diferentes temperaturas, para as misturas CMC/Amido contendo 1% de ZnO (a) e não compatibilizadas (b).

5.2 Ensaios Reológicos Dinâmicos das Misturas CMC/Amido Compatibilizadas e Não Compatibilizadas.

5.2.1 Varredura de Frequência

Através da literatura, torna-se amplamente conhecido que géis com alta resistência mecânica são, principalmente, formados por ligações químicas, onde os módulos de armazenagem e perda apresentam baixa dependência em relação à frequência, G' reflete a tensão armazenada no material durante a deformação e/ou cisalhamento, pronta para ser devolvida ao ambiente (MACHADO, 2002 ; OZKAN, 2002).

As Figuras 11 e 12 mostram que as magnitudes de G' e G'' aumentaram com o aumento da frequência angular (ω). SUPHANTHARIKA e colaboradores (2005) reportaram resultados similares com blendas de goma guar e goma xantana com amido, os pesquisadores explicaram este comportamento, em função da mais ordenada e rígida estrutura da goma guar e conformação da goma xantana.

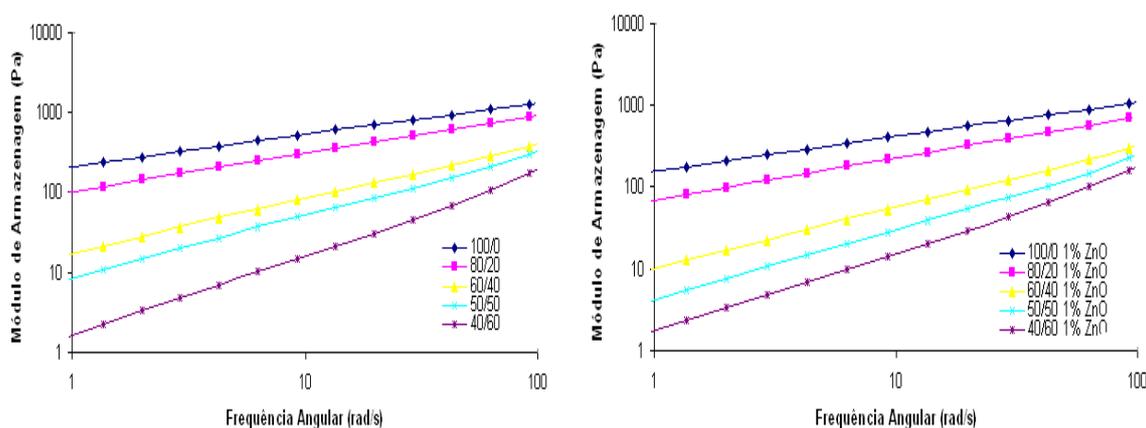


Figura 11. Comportamento do módulo de armazenagem (G') em função da frequência angular para as misturas CMC/Amido não compatibilizadas (a) e contendo 1% de ZnO (b)

O módulo de armazenagem pode ser considerado como um indicador primário do comportamento tipo gel, no entanto, observa-se, que com a presença do íon zinco a relação entre $G'(w)/G''(w)$ diminuiu, tal relação entre os módulos de armazenagem e perda, permite a determinação do ângulo de perda, através da Figura 11. observou-se a aproximação das curvas com a adição do ZnO, indicando que o nível de entrelaçamento é substancialmente reduzido, visto que o distanciamento entre as curvas sugere a formação de estruturas com características de predominância elástica. O aumento do ângulo de perda, conduz a formação de estruturas com predominância viscosa, tendo como consequência a diminuição da elasticidade da CMC com a adição de 1% de ZnO.

As misturas de CMC e amido, apresentam uma estrutura complexa, contendo regiões hidrofóbicas/neutras (isentas de carga) e regiões carregadas/polares de caráter hidrofílico, tendo a possibilidade de formação de múltiplas interações inter-moleculares no meio aquoso, considerando-se as interações atrativas entre as regiões hidrofóbicas e

regiões polares de caráter oposto e forças repulsivas entre regiões polares de mesmo caráter.

No processo de formação do gel, as moléculas se ligam umas as outras, enquanto mantém ou aumenta sua interação com a água. Por outro lado, no processo de precipitação, as moléculas se ligam expelindo e diminuindo sua interação com a água, as interações hidrofílicas favorecem o processo de gelificação, enquanto que as interações hidrofóbicas repelem água, reduzindo a gelificação e facilitando a precipitação (TANFORD, 1980).

No caso de macromoléculas com uma carga negativa (CMC), a ausência de cátions, resultará no domínio das interações repulsivas em relação às interações atrativas, conseqüentemente, ocorre uma redução no processo de gelificação. A adição do íon divalente (Zn^{++}), além de reduzir esta repulsão, pode adicionalmente, formar pontes iônicas intermoleculares entre os grupamentos carregados.

Estas interações podem conduzir à formação de uma estrutura de ligação cruzada, conhecida como *egg-box*, levando a um aumento significativo da gelificação do polímero. Por outro lado, o aumento contínuo da concentração do íon, pode acarretar a diminuição da gelificação, em função da diminuição das interações hidrofílicas e aumento nas interações hidrofóbicas, conduzindo a eliminação da gelificação, precipitação dos polímeros e a viscosidade da solução tenderá a assumir o valor da solução salina de partida (CLARE, 1993).

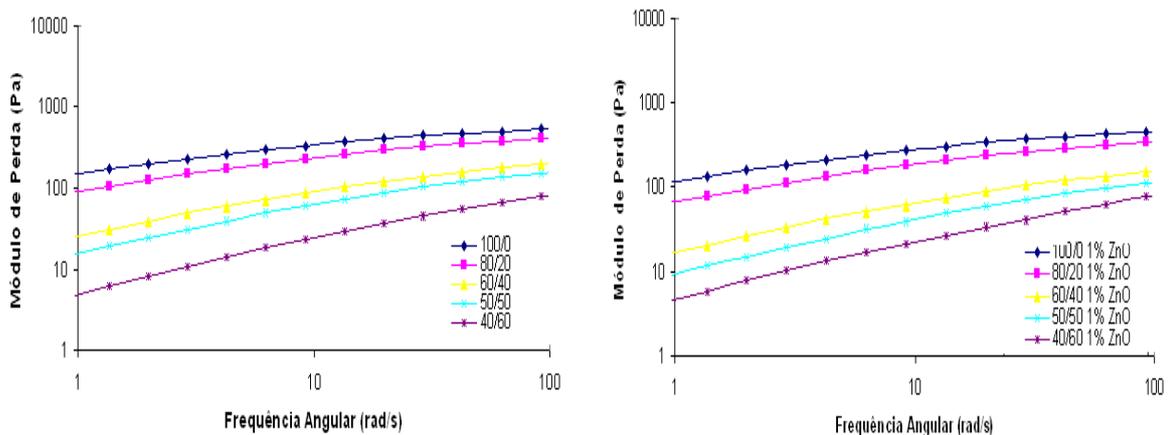


Figura 12. Comportamento do módulo de perda (G'') em função da frequência angular para as misturas CMC/Amido não compatibilizadas (a) e contendo 1% de ZnO (b)

A dependência dos módulos G' e G'' com a frequência angular pode ser descrita pela equação da Lei das Potências (Equações 3 e 4). Desse modo, a viscosidade complexa aparente (η^*50) pode ser calculada através de interpolação linear na curva de viscosidade em função da frequência angular.

$$G' = K' \cdot f^{n'} \quad (3)$$

$$G'' = K'' \cdot f^{n''} \quad (4)$$

Onde K'' e K' são constantes, n' e n'' são referenciados como expoentes de frequência e f a frequência angular (WU *et al*, 2010).

WINTER e CHAMBON (1986) consideraram um critério geral que basicamente consiste na dependência da frequência, baseado no modelo da Lei das Potências de ambos módulos G' e G'' , o valor dos expoentes de frequência indicam os seguintes estados: $n=0$ (polímero puramente elástico), $n=1$ (polímero puramente viscoso) e $n=0,5$, sugere um balanço entre ambos comportamentos e indica o ponto gel.

As magnitudes do K' aumentaram com o aumento do teor de CMC nas composições, conforme ilustrado nas Tabelas 6 e 7, enquanto que os expoentes de frequência aumentaram com o aumento do teor de amido.

O valor de n' para a composição 40/60 tanto não compatibilizada quanto a compatibilizada foi levemente superior a unidade, este fato pode estar atribuído a um aumento na viscoelasticidade da fase contínua da mistura de CMC/Amido, em função das propriedades dilatantes da macromolécula de CMC.

A Figura 13 mostra que os valores da viscosidade complexa aumentaram com o teor de CMC e diminuíram com o aumento da frequência angular. CANCELA e colaboradores (2005) reportaram resultados similares trabalhando com misturas de CMC e sacarose, os autores observaram que com o aumento da força cisalhante, a viscosidade dinâmica diminuía, o que estava relacionado com a orientação das macromoléculas de CMC, visto que as mesmas se alinham na direção do fluxo.

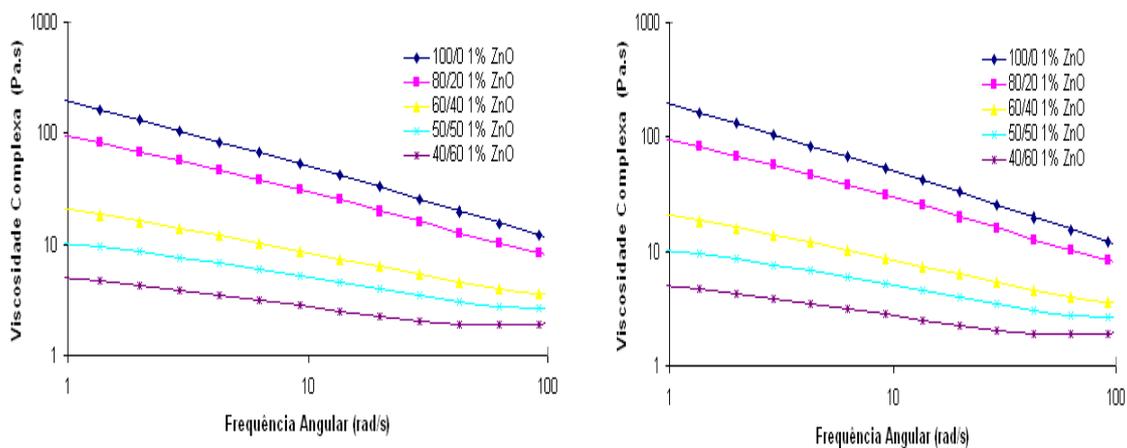


Figura 13. Viscosidade Complexa (η^*) em função da frequência angular para as misturas CMC/Amido não compatibilizadas (a) e contendo 1% de ZnO (b)

Tabela 6 –Dependência do módulo de armazenagem com a frequência em composições não compatibilizadas de CMC/Amido descrito pelo modelo da Lei das Potências (Power Law)

Teor CMC(%)	Viscosidade Complexa (Pa.s)	^a K'	^b n'	^c R ²
100	22,22	435,80	0,39	0,99
80	14,98	244,80	0,47	0,99
60	5,80	59,03	0,68	0,99
50	4,20	33,43	0,79	0,99
40	2,01	7,81	1,14	0,99

^a K': Constante; ^b n':Expoente de Frequência, ^c Coeficiente de Correlação

Tabela 7 – Dependência do módulo de armazenagem com a frequência em composições compatibilizadas de CMC/Amido descrito pelo modelo da Lei das Potências (Power Law)

Teor CMC (%)	Viscosidade Complexa (Pa.s)	^a K'	^b n'	^c R ²
100	18,16	338,20	0,41	0,99
80	11,85	174,80	0,51	0,99
60	4,34	37,03	0,76	0,99
50	2,94	17,71	0,93	0,99
40	1,89	8,00	1,10	0,99

^a K': Constante; ^b n':Expoente de Frequência, ^c Coeficiente de Correlação

O ângulo de perda (δ) pode ser determinado através da relação entre G''/G' . Para uma substância puramente viscosa, o ângulo de perda corresponde à 90^0 , enquanto que para uma substância puramente elástica, o ângulo de perda se igual a zero (SCHRAMM, 1994). A relação do ângulo de perda com a frequência angular está ilustrada na Figura 14.

Na Figura 15 é possível observar que com o aumento do teor de CMC, o valor do ângulo de perda diminuiu, indicando um aumento da contribuição elástica, o que já era esperado, uma vez que a CMC é um material mais elástico. Esse resultado está de acordo com os observados nos resultados de energia de ativação de fluxo. Exceto para a composição 40/60 (CMC/Amido), amostras não compatibilizadas, que apresentaram valores de ângulo de perda inferiores para toda a faixa de composição estudada, quando comparado às amostras compatibilizadas.

O comportamento viscoso aumentou com a presença do ZnO nas misturas de CMC/Amido, indicando que o aumento do teor de amido favorece a predominância do comportamento elástico, em função do aumento de interação entre as cadeias poliméricas de CMC e amido, promovido através da adição de ZnO. Neste caso é assumido que as cadeias poliméricas são submetidas à uma intensa atração intermolecular, conduzindo a geração de estruturas menos rígidas e mais flexíveis, dissipando de forma mais eficiente a energia aplicada.

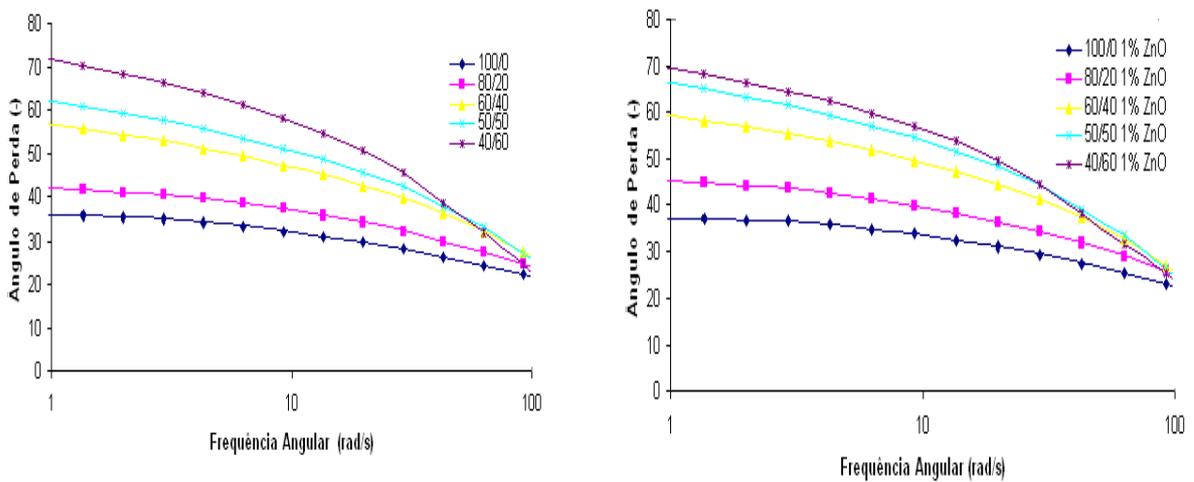


Figura 14. Ângulo de Perda (δ) em função da frequência angular para as misturas CMC/Amido não compatibilizadas (a) e contendo 1% de ZnO (b)

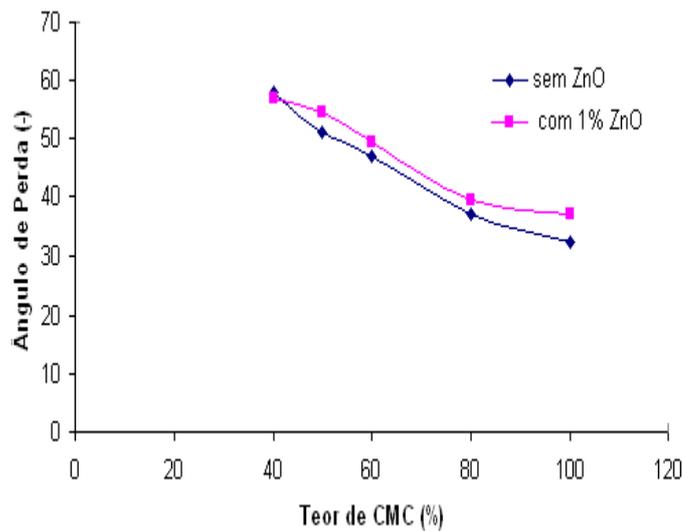


Figure 15. Variação do ângulo de perda (δ) com o teor de CMC (wt%), frequência angular (ω) de 9.2 rad/s

5.2.2 Ensaio de Fluência e Recuperação

A viscosidade zero e o tempo de relaxação foram determinados através do ensaio de fluência e recuperação, este teste permite a diferenciação entre respostas elásticas e viscosas das composições estudadas, introduzindo a dependência da tensão em ambos comportamentos elástico e viscoso de sólidos e fluidos (SCHRAMM, 1994).

Adicionalmente, ensaios conduzidos na região de viscoelasticidade linear fornecem relevantes informações concernentes aos processos de sedimentação e separação de fases.

Os resultados dos ensaios de fluência e recuperação das amostras CMC/Amido são apresentados na tabela 8. A adição de ZnO nas composições, conduz à uma diminuição nos valores de viscosidade zero, recuperação elástica e tempo de relaxação, sugerindo que os íons zinco atuam fortemente, em função das interações intermoleculares estabelecidas com a fase CMC, aumentando as interações entre as cadeias poliméricas presentes nas composições.

Quando ocorre aumento o teor de CMC nas misturas, aumenta a tendência de conferir as composições à estabilidade mecânica requerida para evitar a separação de fases, todas as composições apresentaram um aumento progressivo no valor da viscosidade zero, acentuando o caráter viscoelástico das composições, evidenciado pelo aumento no tempo de relaxação.

Tabela 8 – Ensaio de Fluência e Recuperação das Misturas de CMC/amido Compatibilizadas e não-Compatibilizadas

Concentração CMC (%)	^a Viscosidade Zero (Pa.s)	^a Recuperação Elástica (%)	^a Tempo de Relaxação (s)	^b Viscosidade Zero (Pa.s)	^b Recuperação Elástica (%)	^b Tempo de Relaxação (s)
100	7368,00	58,38	222,80	3904,00	55,54	193,90
80	1829,00	45,00	153,50	1451,00	44,18	132,10
60	188,20	23,20	84,51	86,69	14,27	56,88
50	65,63	12,38	42,37	35,20	7,85	13,63
40	5,65	1,49	6,27	13,31	2,80	11,39

^a sem ZnO; ^b contendo 1% de ZnO

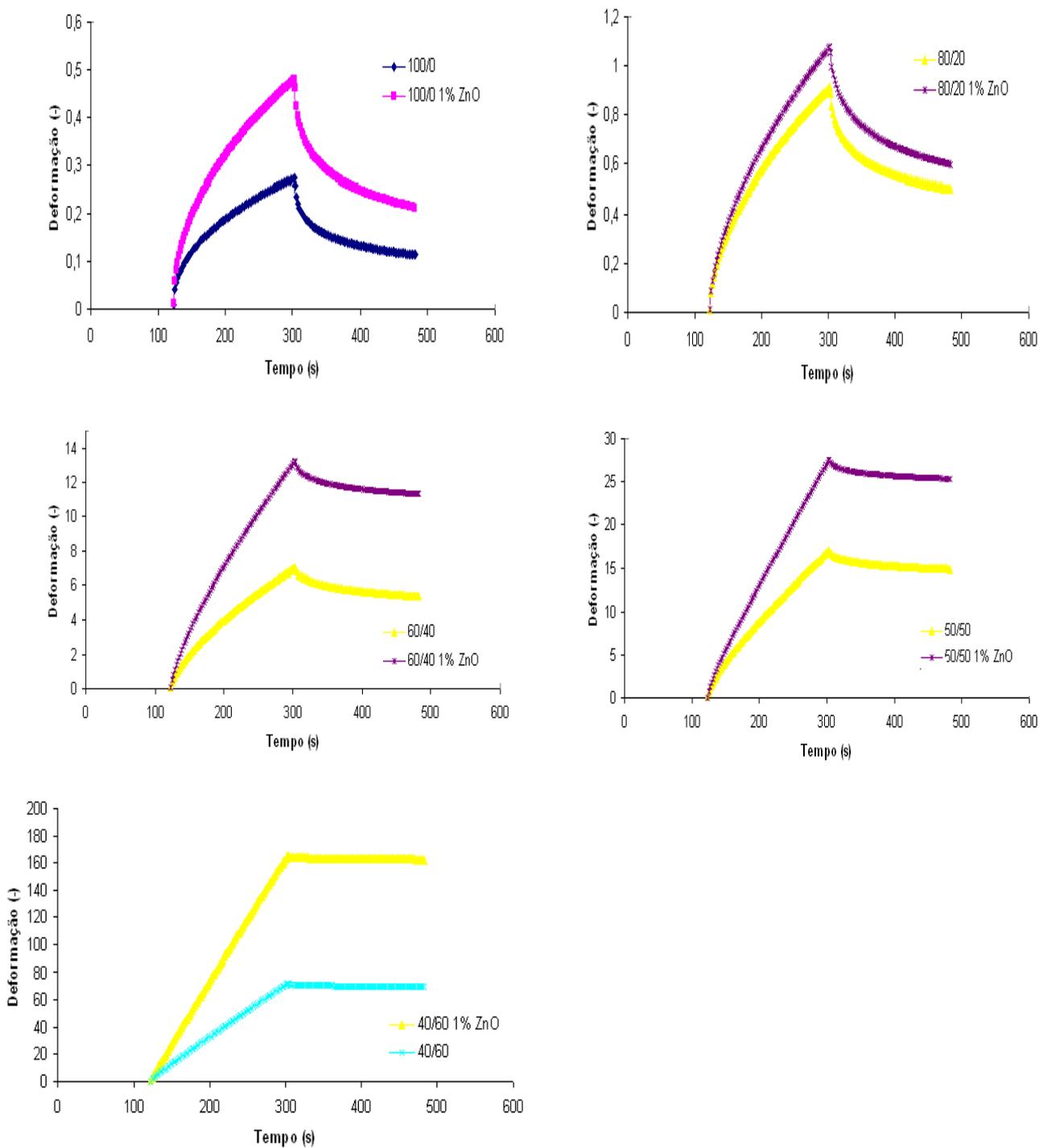


Figura 16. Deformação(-) em função do tempo para as misturas CMC/Amido não compatibilizadas e contendo 1% de ZnO.

5.3 Determinação de Entalpia de Transição

Cada composição investigada apresentou um evento endotérmico, onde a área dos picos obtidos dos ensaios de DSC, podem ser utilizadas para estimar a entalpia de transição (ΔH), o histórico térmico da amostra deve ser considerado para a determinação da ΔH (HATAKEYAMA, 1999). Na Tabela 9 são apresentados os valores das entalpias de transição, aumentando o teor de amido, os valores da temperatura de pico são deslocados para valores inferiores.

Por outro lado, os valores da entalpia de transição aumentaram com o aumento do teor de amido para as composições com teor de CMC até 60%, sendo este comportamento modificado em amostras rica em amido, o grânulo de amido é um material heterogêneo, especificamente, constituído por ambas estruturas linear (amilose) e ramificada (amilopectina), como consequência física, apresenta regiões distintas: amorfa e cristalina.

A variação de entalpia de uma transição pode ser interpretada como a quantidade correspondente de ordem cristalina (ou estrutura de dupla hélice) nas suspensões de amido que é rompida num processo de varredura de calor (FRENCH, 1984).

Todos os termogramas exibiram um pico endotérmico fino, que indicam a homogeneidade das composições estudadas. O pico endotérmico pode ser associado com a fusão do domínio cristalino do amido durante o processo de retrogradação, resultados similares foram encontrados com termogramas de DSC de filmes de amido de milho-CMC-nanoargilas (ALMASI *et al*, 2010) e filmes de amido de ervilha-CMC (MA *et al*, 2008).

O aumento da energia de transição das misturas com alto teor de CMC pode estar relacionado ao efeito de maior cristalização em função do alto grau de cristalinidade do CMC (GIMENO *et al*, 2004).

A energia de transição das misturas estudadas foi inferior quando comparado ao CMC puro, em função das interações entre o amido e CMC interromperem o rearranjo das cadeias poliméricas (SANGSUWAN *et al*, 2008).

Resultados similares foram registrados em termogramas de DSC de blendas de polietileno de alta densidade e polipropileno (RACHTANAPUN *et al*, 2004) e filmes de quitosana-MC com vanilina (SANGSUWAN *et al*, 2008).

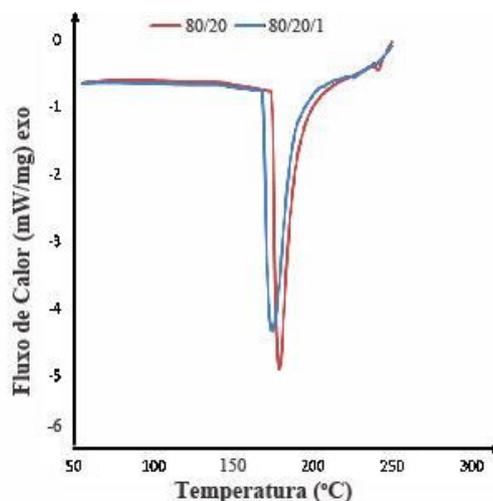
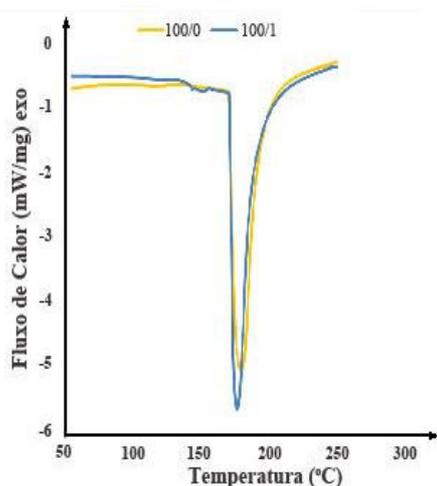
Os resultados apresentados na Figura 17 indicaram que a cristalinidade das misturas diminuiu com o aumento do teor de amido, que também depende do teor de

amilose no amido, estes resultados corroboram com os ensaios reológicos, indicando que as interações entre as cadeias poliméricas são aumentadas pela presença do ZnO.

Tabela 9 – Resultados da Análise Térmica em Blendas CMC/Amido Compatibilizadas e Não Compatibilizadas

Teor CMC (%)	^a Temperatura de Pico (°C)	^b Temperatura de Pico (°C)	^a Entalpia de Transição (J/g)	^b Entalpia de Transição (J/g)
100	179,4	176,1	-421,7	-398,7
80	178,5	174,2	-279,2	-292,0
60	175,8	175,6	-234,9	-140,5
50	171,0	174,8	-352,1	-170,4
40	170,4	173,7	-350,8	-138,6

^a, sem ZnO ^b com 1% ZnO



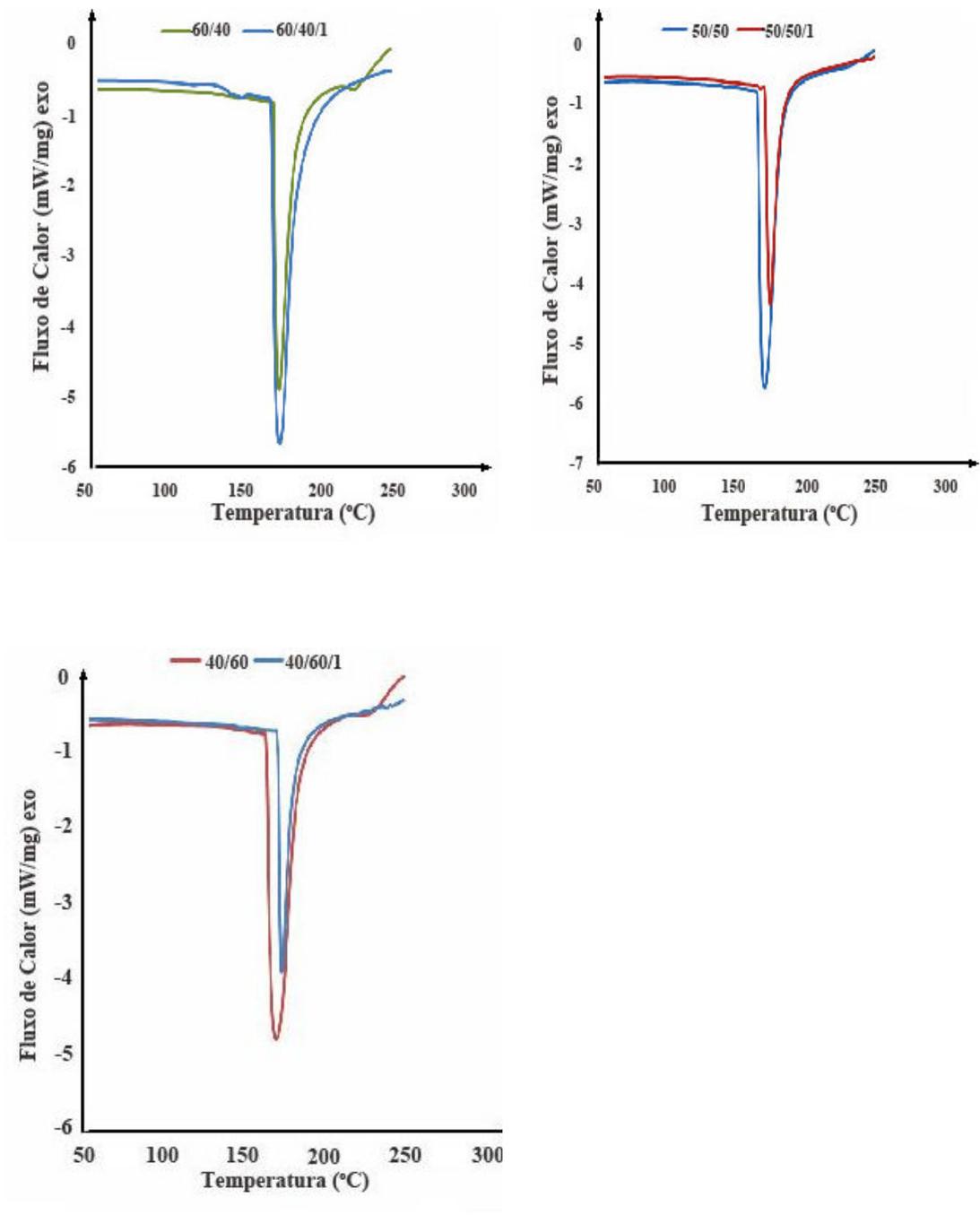


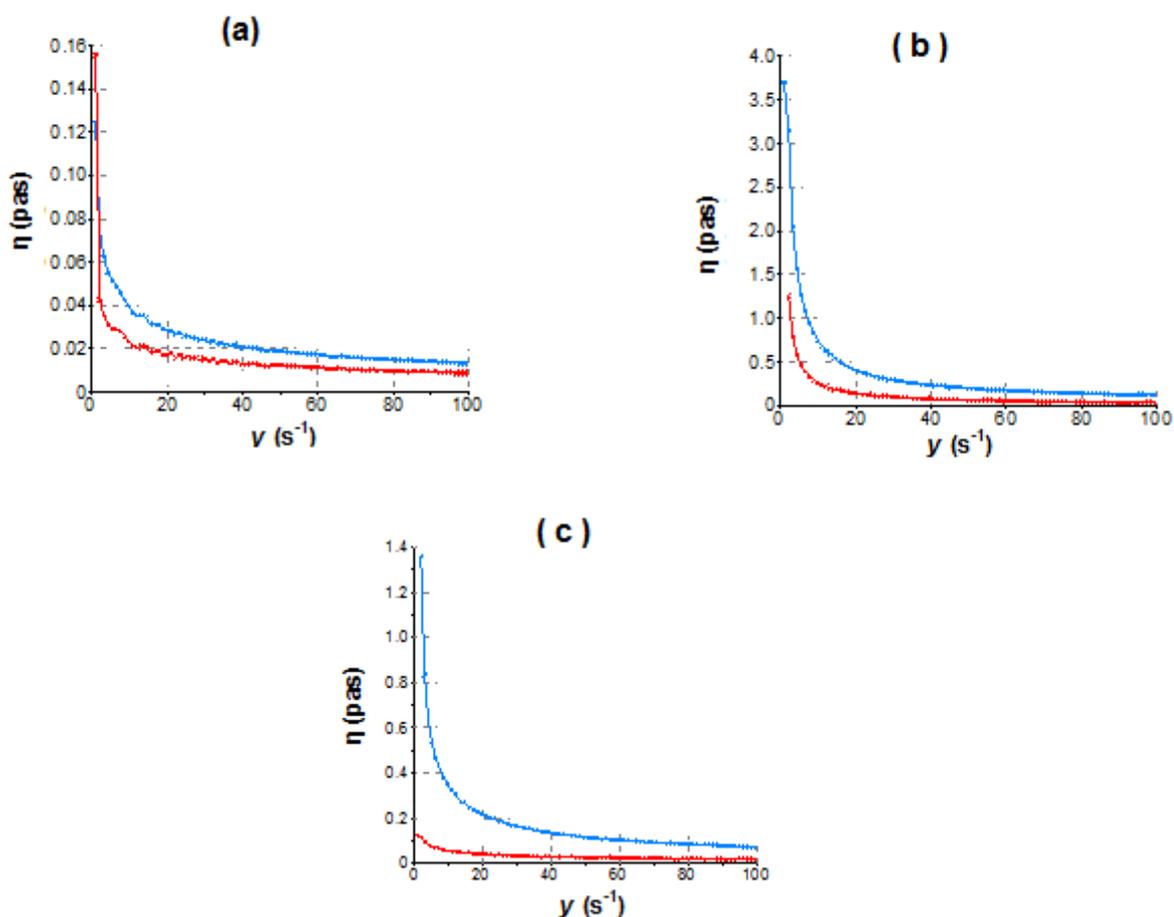
Figura 17. DSC para as misturas CMC/Amido não compatibilizadas e contendo 1% de ZnO

5.4 Comportamento reológico da mistura CMC/EPS sob cisalhamento contínuo: viscosidade

O perfil das curvas apresentadas na Figura 18 em que são mostradas a redução da viscosidade aparente com a taxa de cisalhamento, caracteriza que todas misturas estudadas apresentam comportamento de fluido pseudoplástico. É interessante notar que o comportamento pseudoplástico diminui acentuadamente quando a concentração de EPS na mistura diminui, embora somente uma pequena quantidade de biopolímero esteja presente na mistura. A diminuição da viscosidade com a redução da concentração era esperado uma vez que normalmente a viscosidade diminui com a concentração.

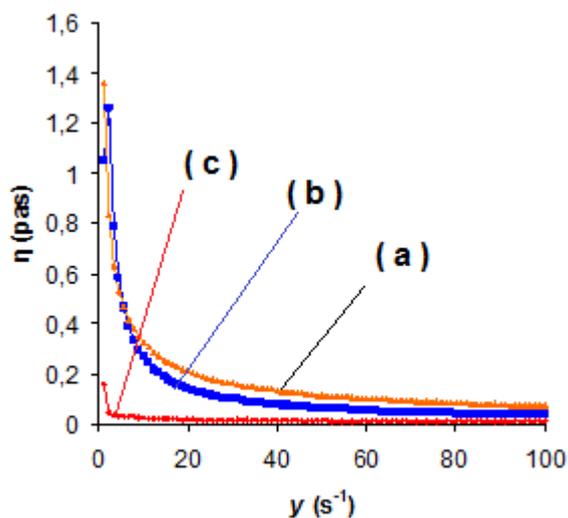
Comparando os perfis obtidos nas figuras observam-se valores diferentes de viscosidades, sugerindo que esse efeito possa ser decorrente ou da massa molecular do EPS formado ou da sua estrutura. Estudos preliminares de bancada com o muco produzido por essas bactérias mostraram que estes apresentavam, visualmente, diferentes elasticidades ao contato com o bastão de vidro. Essa evidência remeteu ao questionamento de que os polímeros formados pudessem possuir massa molecular diferente ou estruturas moleculares distintas.

Quanto a essas duas últimas hipóteses, os resultados das caracterizações do material, por espectroscopia na região do infravermelho, indicou se tratar de matérias com estruturas semelhantes, ou seja, há uma evidência que a síntese microbiana tem alta especificidade. No entanto, quanto a estrutura química ainda não é possível tecer maiores considerações, sendo necessária a utilização de outras técnicas, como por exemplo, a ressonância magnética nuclear (RMN).



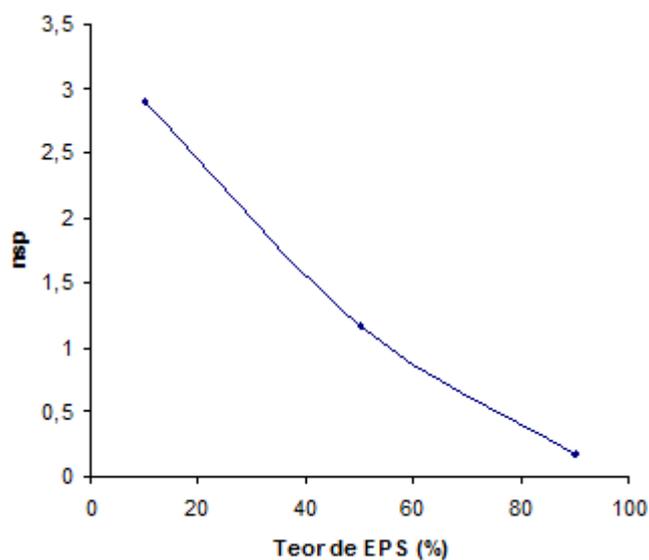
Figuras 18 a - b-c. Variação da viscosidade do EPS em diferentes concentrações em função da taxa de cisalhamento (A) CMC/EPS-jap, (B) CMC/EPS-trop e (C) CMC/EPS-elk. Azul- 5 mg/ml e Vermelho- 10 mg/ml e

A Figura 19 mostra de forma comparativa o comportamento da viscosidade dos diferentes EPS na mesma concentração. Observou-se que a misturas contendo EPS produzidas por *Bradiumhrizobium* apresentou a menor viscosidade, enquanto a produzido por *R.tropici* apresentou a maior viscosidade. Este resultado evidencia a influência da massa molar na viscosidade e o efeito da interação CMC/EPS.



Figuras 19. Variação da viscosidade do EPS em função da taxa de cisalhamento (A) CMC/EPS-trop , (B) CMC/EPS-elk .e (C) CMC/EPS-jap

De modo avaliar o efeito do EPS na redução da viscosidade de uma solução de CMC, (solução utilizada como inoculante para cana-de-açúcar) foi realizado um ensaio de viscosidade capilar dessas misturas, Figura 20 .



Figuras 20. Variação da viscosidade da mistura CMC/EPS na concentração de 1g/litro: Bactéria EPS-jao.

Na Figura 20 observou-se que a viscosidade da mistura diminuiu acentuadamente com o aumento da quantidade de EPS-jap na solução. Este resultado pode ser atribuído ao tipo de interação promovido pelo EPS na solução. Em solução ocorre o enovelamento das cadeias poliméricas, seja pelo aumento da interação intramolecular ou pelas forças repulsivas intermoleculares, em ambas as situações, evidencia-se o a redução da viscosidade da solução. Entretanto, para avaliar o tipo de associação e interação polímero-polímero e seus efeitos na sobrevivência de células são necessários ensaios experimentais complementares.

5.5 Avaliação da mistura CMC/Amido Compatibilizadas contendo ZnO e MgO e EPS/amido como Veículo para o Inoculante Rizobiano Sólido e sua eficiência em Comparação com a Turfa.

As composições selecionadas para esse experimento foram as composições CMC/amido nas proporções 50/50 compatibilizadas com 1% de ZnO e não compatibilizadas e as misturas EPS/amido são apresentadas na Tabela 10.

Para comparar a eficiência da sobrevivência das células nas misturas com CMC de alta viscosidade e nas misturas com EPS. Os resultados de sobrevivência foram comparados com dados da literatura (Rohr 2007) incluindo os resultados obtidos nas misturas com CMC de média viscosidade e com a turfa, substrato mais utilizado para a fabricação do inoculante rizobiano sólido no Brasil.

As sementes peletizadas receberam uma quantidade variável de células, em função do período inicial de incubação de 12 dias a que foram submetidos todos os inoculantes. Porém, todos os tratamentos receberam uma quantidade de células maior que de 6×10^5 células por sementes, que é a quantidade mínima de células rizobianas permitida pela legislação brasileira (RELARE, 2004).

Os resultados apresentados na Tabela 10, mostraram que os materiais poliméricos testados com CMC de alta viscosidade apresentaram resultados iguais ao CMC de média não compatibilizado. Esses resultados são compatíveis com o apresentado pelo CMC de média viscosidade compatibilizado com 1% de ZnO, apresentado por RHOR, 2007. Entretanto é interessante notar que o decaimento da sobrevivência ao longo da semana é mais lento na mistura CMC de alta viscosidade compatibilizada com ZnO.

Comparando as misturas não compatibilizadas, observou-se que para o CMC de média viscosidade obteve-se um valor de 7,23, para o número de células, valor inferior ao observado para mesma composição com CMC de alta viscosidade, 8,88. Este resultado sugere que o uso de CMC de alta viscosidade confere uma maior biocompatibilidade, a qual pode ser atribuída a maior interação entre as fases. Os resultados encontrados para o CMC de alta viscosidade são compatíveis com os apresentados pela turfa, indicando sua boa performance como veículo de inoculação.

Tabela 10. Sobrevivências das células de *Bradyrhizobium japonicum* (BR 3262), inoculadas nas misturas poliméricas CMC/amido e na mistura EPS/amido não compatibilizada.

- Médias da mesma coluna seguidas pela mesma letra são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Composição polimérica	Semanas de Incubação (Log n° células/mL)								
	1SI	2SI	3SI	4SI	5SI	6SI	8SI	10SI	12SI
CMC/amido (50/50) ^S	9,35 ^{a*}	9,19 ^a	8,84 ^a	8,33 ^a	9,36 ^a	8,40 ^{ab}	7,81 ^{ab}	8,25	8,64 ^{ab}
CMC/amido (50/50) ^S	9,97 ^a	8,31 ^a	7,82 ^a	7,72 ^a	7,32 ^{ab}	5,24 ^b	8,48 ^b	5,21	7,23 ^b
CMC/amido (50/50) ^c	9,99 ^a	9,89 ^a	8,76 ^a	8,75 ^a	8,56 ^a	8,40 ^b	8,51 ^a	8,57	8,65 ^a
CMC/amido (50/50) ^c	9,98 ^a	9,90 ^a	9,91 ^a	8,92 ^a	9,01 ^a	9,01 ^a	8,91 ^a	8,90	8,88 ^a
EPS/amido ^d	9,46 ^a	9,35 ^a	8,96 ^a	8,89 ^a	8,76 ^a	8,75 ^a	8,65 ^a	8,72 ^a	8,70 ^a
EPS/amido ^e	9,74 ^a	9,36 ^a	9,01 ^a	8,95 ^a	8,85 ^a	8,75 ^a	8,78 ^a	8,81 ^a	8,79 ^a
EPS/amido ^f	9,79 ^a	9,38 ^a	8,90 ^a	8,91 ^a	8,90 ^a	8,96 ^a	8,79 ^a	8,80 ^a	8,75 ^a
Turfa	9,93 ^a	10,1 ^a	10,1 ^a	9,46 ^a	9,99 ^a	9,16 ^a	8,93	8,43 ^a	8,96 ^a

*^S CMC de média viscosidade; *^S CMC de média viscosidade sem 1%ZnO, *^d EPS-jap (BR3262), ^e EPS-trop (BR322) , ^f EPS-elk, (BR29)

Analisando a sobrevivência das misturas com EPS, observou-se que todas as misturas apresentaram o mesmo desempenho e resultados compatíveis ao observado pela turfa, indicando que esses materiais podem ser utilizados como veículo de inoculação.

5.6 Análise Morfológica

A morfologia das misturas CMC/Amido foi explorada nesta dissertação com o objetivo de investigar os efeitos das interações promovidas pelo ZnO. As micrografias das misturas compatibilizadas e não compatibilizadas encontram-se na Figura 21 Em relação as misturas contendo 50% de CMC, a adição de ZnO provoca redução no tamanho médio de partículas da fase amido, aumentando sua dispersão na fase CMC, figura 21a. É interessante observar a presença de uma morfologia co-contínua,

observada nas amostras não compatibilizadas, figura 21b. Neste caso, os grânulos de amido se tornaram visíveis e o tamanho médio de partículas é maior, sugerindo uma baixa interação entre as fases poliméricas.

Aumentando o teor de CMC, amostra 60/40% CMC/Amido, observou-se que a adição do ZnO aumentou a distribuição da fase amido na fase contínua de CMC, sugerindo o efeito de interação entre as fases promovido pelo ZnO. A boa adesão entre as fases das misturas pode ser atribuída à interação estabelecida entre o grupamento carboxila da CMC e o óxido de zinco. Os resultados sugerem que esta interação facilita a interação do CMC com os grupamentos hidroxila presentes na cadeia polimérica do amido.

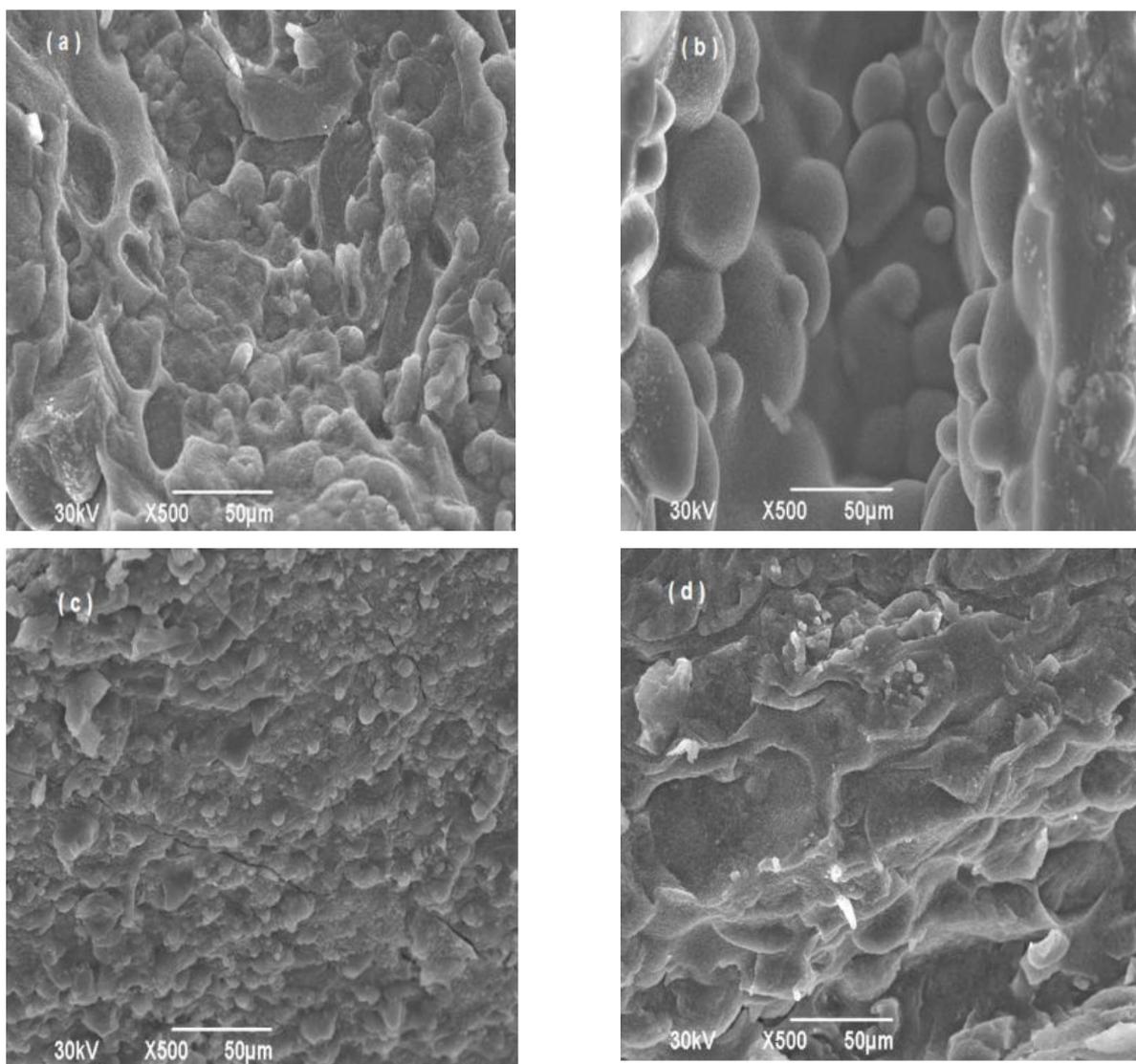


Figura 21. Micrografias das misturas CMC/Amido: (a) 50/50% com 1% ZnO (b) 50/50% sem 1% ZnO (c) 60/40% com 1% ZnO (d) 60/40% sem 1% ZnO

A literatura científica registra que o tamanho médio de partícula é uma função da razão de viscosidade da fase dispersa e matriz, considerando a tensão interfacial, viscosidade das blendas, fração volumétrica da fase dispersa e taxa de cisalhamento (LIU *et al*, 1998 ; WU, 1987; SERPE *et al*, 1990).

A Figura 21c, composição 60/40% não compatibilizada, revela um aumento na dispersão da fase amido, a diferença na morfologia para ambas blendas não compatibilizadas é atribuída a um aumento na fase CMC, que ocasionou na redução da coalescência na fase amido.

6.CONCLUSÃO

A adição de ZnO modificou as propriedades reológicas das misturas de CMC de alta viscosidade e Amido Modificado, como consequência da maior interação estabelecida entre os componentes poliméricos. A adição de ZnO reduz a energia de ativação de fluxo e a viscosidade zero, especialmente nas composições ricas em amido.

Estes resultados mostraram que o efeito da adição do ZnO nas propriedades reológicas das composições diminui quando o teor de amido diminui, sugerindo que o ZnO atua preferencialmente em composições ricas em CMC de alta viscosidade. Os ensaios de fluência e recuperação indicaram um aumento na deformação com o aumento do teor de amido, conduzindo a uma predominância de características viscosas, exceto para a composição 40/60%, em que foi observado um aumento da viscosidade e da elasticidade.

Para a composição 20/80%, embora tenha ocorrido uma diminuição na viscosidade zero, ocorreu um leve aumento na elasticidade, sugerindo a ocorrência e um processo de inversão de fase. No que tange aos testes de sobrevivências, biocompatibilidade, os resultados mostraram que as misturas contendo CMC de alta viscosidade, com e sem ZnO, apresentaram resultados compatíveis aos da turfa, sugerindo que este material apresenta potencial uso como veículo de inoculação. No que tange as misturas com EPS, produzidas por três bactérias diferentes, os resultados mostraram que as misturas apresentam boa biocompatibilidade com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* apresentando valores de sobrevivência compatíveis aos observados pela turfa.

7. REFERÊNCIAS

- ARANDA-SELVERIO, G.; PENNA, A.L.B.; CAMPOS-SÁS, L.F.; SANTOS JÚNIOR, O. dos; VASCONCELOS, A.F.D.; SILVA, M. de L.C. da; LEMOS, E.G.M.; CAPANHARO, J.C.; SILVEIRA, J.L.M.S. 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.
- ARAÚJO, C.R. **Cinética de decomposição térmica de compósitos com fibras de curauá**. Tese (Doutorado em Ciências) – EQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003
- BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**; First Edition, New York, USA; Elsevier, 1991.
- BASHAN, Y., Inoculants of Plant Growth-Promoting Bactéria for Use in Agriculture, **Biotechnology Advances**, v.16, no.4, p. 729-770, 1998.
- BERMUDEZ, J.J.H. **Valorización de las amilácea “no cereales” cultivadas en los pasises andinos: estudio de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de sus almidones y de la resistência a diferentes tratamientos estressantes**, (Trabajo de Grado), Facultad de Ingenieria de Alimentos, Universidad de Bogotá, Colômbia, 1997
- BEZZAN, A.L, Blendas Tenacificadas de Poliamida 6 e Copolímero de Polipropileno, Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) Universidade São Francisco, Itatiba, 2006.
- BILLA, N.; YUEN, K.H.; KHADER, M.A.A.; OMAR, A., Gamma-scintigraphic study of gastrointestinal transit and in vivo dissolution of a controlled release diclofenac sodium formulation in xanthan gum matrices, **International Journal of Pharmaceutics**, v.201, p. 109-120, 2000.
- BILIADERIS, C.G.; MAURICE, T.J.; VOSE, J.R., Starch gelatinization phenomena studied by differential scanning calorimetry. **Journal of Food Science**, 45, p.1669-1675, 1980.
- BILIADERIS, C.G. The structure and interactions of starch with food. **Can. Physiol. Pharmacol.**, v. 69, p. 60-78, 1991.
- BIRD, R. B., STEWART, W. E., LIGHTFOOD, E. N. **Fenômenos do Transporte**, Universidade de Wisconsin, edição internacional Wiley, 2005.

BISHOP, P.E.; GUEVARA, J.G.; ENGELKE, J.A.; EVANS, J.H. Relation between glutamine syntetase and nitrogenase activities in the symbiotic association between *Rhizobium japonicum* and Glycine max. **Plant Physiology**, 57, p. 542-546, 1976.

BJORNDAL, H.; ERBING, C.; LINDBERG, B.; FAHRAEUS, G.; LJUGGREN, H., Studies on an extracellular polysaccharide from *Rhizobium meliloti*, **Acta Chemica Scandinavica**, v.25, p.1281-1286, 1971.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 2.ed., 1.reimp. São Paulo: Livraria Varela, p.151, 1995.

BONGIOVANI, R.A.M., **Características Reológicas do Exopolissacarídeo Botriosferana Produzido pelo *Botryosphaeria rhodina*, MAMB-05 em Três Fontes de Carbono: Glucose, Frutose e Sacarose**, Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos- Engenharia e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. UNESP – Campus de São José do Rio Preto-SP, 2008.

BORGES, C.D.; VENDRUSCOLO, C.T.; MARTINS, A.L.; LOMBA, R.F.T., Comportamento Reológico de Xantana Produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni para Aplicação em Fluido de Perfuração em Poços de Petróleo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**:160-165, 2009.

BORNET, F. Technologie des amidons, digestibilité et effets métaboliques. **Cah. Nutr. Diét.**, v.27, n.3, p.170-178, 1991.

CANCELA, M.A.; ÁLVAREZ, E.; MACEIRAS, R., Effects of temperature and concentration on carboxymethylcellulose with sucrose rheology. **Journal of Food Engineering** 71, p.419-424, 2005.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v.42, p.1503-1506. 2007.

CEREDA, P. M. **Propriedades gerais do amido**, vol 1. Série culturas de tuberosas amiláceas latino americanas, Fundação Cargill, 2001.

CHINACHOTI, P.; WHITE, V.A.; LO, L.; STENGLE, T.R., Application of high resolution carbon-13, oxygen-17, and sodium-23 NMR to study the influences of water, sucrose and NaCl on starch gelatinization. **Cereal Chem.** 68, p.238-244, 1991.

CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E.S.; CARVALHO, A.J.F.; CURVELO, A.A.S.; MATTOSO, L.H.C., Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, V.15, n.4, p. 268-273, 2005.

COTTRELL, I. W.; KANG, K. S.; KOVACS, P. **Handbook of water-soluble gums and resins**. New York: Mc Graw Hill, CPKelco, KELCOGEL, Gellan Gum Book, 5^aed.,1980

DEALY, J.M.; WISSBURN, K.F., **Melt rheology and its role in plastics processing**. Van Nostrand Reinhold, New York, 1990.

DEFLOOR, I.; DEHING, I.; DELCOUR, J.A. Physico-chemical proprieties of cassava starch. **Starch Starke**, v.50, n.2-3, p.58-64, 1998.

DIAZ, P.S.;VENDRUSCOLO, C.T.;VENDRUSCOLO, J.L.S., Semin. v.25, p.15, 2004.

DUARTE, L. C.; JUCHEM, P. L.; PULZ, G. M.; BRUM, T. M. M.; LICCARDO, N. C., A.; FISCHER, A. C.; ACAUAN, R. B. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros. **Pesquisas em Geociências**, 30(2), p.3-15, 2003.

DUTA, F.P.; FRANCA, F.P. de; LOPES, L.M.D. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, p.391-399, 2006.

ERNANDES, F.M.P.G.; CRUZ, C.H.G. Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias**, v.26, n.1, p. 69-80, 2005.

FINKLER, M., **Desenvolvimento de Compósitos com Base em Rejeito de Tecidos de algodão e Acrílico em Matriz de Polietileno de Alta Densidade**, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais), Universidade de Caxias do Sul, 2005.

FRENCH D., **Physical and chemical organization of starch granules**. In "Starch : chemistry and Technology" 2 nd Ed. chap. 8. WHISTLER R.L. PASCHALL E.F. and BEMILLER J.N. Eds., Academic Press, 1984

FUJIMOTO, J.; REIS, E.A.O.; PETRI, D.F.S; FILHO, S.P.C., Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína, **Química Nova**, V.25, n.5, p. 757-761, 2002.

GALINDO-ROSALES, F.J.; RUBIO-HERNANDEZ, F.J., Static and dynamic yield stresses of aerosil 200 suspensions in polypropylene glycol, **Applied Rheology** 20 issue 2 22787, p.1-10, 2010.

GARCIA-CRUZ, C. H. **Produção de polissacarídeos bacterianos**. Tese (Livre Docência) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1997.

GARCIA, V.; GERÁRD, C.; BARRON, C.; COLONNA, P., Structural changes of cassava starch granules after heating at intermediate water contents. **Starck/Starke**, v.49, n.5, p.171-179, 1997.

GERMAN, M.L.; BLUMENFELD, A.L.; GUENIN, Ya.V.; YURYEV, V.P.; TOLSTOGUZOV, V.B., Structure formation in systems containing amylose, amylopectin and their mixtures. **Carbohydr. Polym.** 18, p.27-34, 1992.

GLICKSMAN, M. Hydrocolloid functionality in fabricated foods. **Food Technology, Chicago**, v.38, n.1, p.17-21, 1986.

HATAKEYAMA, T.; QUINN F.X., **Thermal Analysis Fundamentals and Applications for Polymer Science**, Second Edition, John Wiley & Sons, West Sussex, 1999

I'ANSON, K.J.; MILES, M.J.; MORRIS, V.J.; RING, S.G., A study of amylose gelation using a synchrotron X-ray source, **Carbohydr. Polym.** 8, p.45-53, 1988.

KACI, Y.; HEYRAUD, A.; BARAKAT, M.; HEULIN, T., Isolation and identification of an EPS-producing Rhizobium strain from and 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.

KÄISTNER, U.; HOFFMANN, H.; DÖNGES R.; HILBIG, J., Structure and solution properties of sodium carboxymethylcellulose, **Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.** 123-124 P.307-328, 1996.

KAWAI, H.; ISOBE, Y.; KORIBE, M.; TOKUDA, J.; TOKUNO, I.; ENDO, K.; KAWAI, F. Production of a Novel Extracellular Polysaccharide by a *Bacillus* Strain Isolated from Soil. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 56(6), 853-857, 1992.

KUMAR, A.S.; MODY, K.; JHA, B., J. **Basic Microbiol.**, v.47, p103, 2007.

LOPES, L.; ANDRADE, C. T.; MANO, E. B.; **Ciência. Hoje** ,12, p.65, 1991.

MACHADO, J. C. V. **Reologia e escoamento de fluidos**. 1. ed. Editora Interciência, p. 39-44, 95-107, 2002.

MACOSKO, C.W., **Rheology: principles, measurements and applications**, Wiley-VCH, New York, 1994.

MESTRES, C.; MOUQUET, C. **Principios físico-químicos de la viscosidad de almidones**. In: Conferencia Internacional de Almidón. Quito, 1996. Anais Quito, p.23-39, 1996.

MORRISON, W.R. Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. **Cereal Foods World**, v.40, p.437-446, 1995.

- MOTHÉ, C.G.; AZEVEDO, A.D., **Análise Térmica de Materiais**. I-editora, São Paulo – SP, p.300, 2002.
- NAKAZAWA, F.; NOGUCHI, S.; TAKAHASHI, J.; TAKADA, M., Retrogradation of gelatinized potato starch studied by differential scanning calorimetry, **Agric. Biol. Chem.** 49, p.953-957, 1985.
- OPPERMANN, W.;RONALD, S.H.E;PRUDHOMME, R.K., **Polyelectrolyte Gels-preparation and application**, Ed. ACS, Washington DC, cap. 10, p.150, 1992.
- PANDEY, P.;MAHESHWARI, D.K., Bioformulation of *Burkholderia sp* MSSP with a multispecies consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*, **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, p.213-222, 2007
- PENNA, A.L.B., Hidrocolóides-Usos em Alimentos, **Caderno de Tecnologia de Bebidas**, UNESP – São José do Rio Preto, 2004.
- PHIPPLIPS, P.W.B., An economic assessment of the global inoculant industry, **Crop Management**, 2004.
- PILIZOTA, V.; SUBARIC, D.; LOVRIC,T., Rheological properties of CMC dispersions at low temperatures. **Food Technology and Biotechnology**, 34, p.87–90, 1996.
- RAO, M.A., **Flow and Functional Models for Rheological Properties of Fluids Foods**, Maryland, Aspen Pub, 1999.
- REINER, M., The Deborah Number, **Physics Today** 62, 1964.
- RHOR, T.G, **Estudo Reológico da Mistura Carboximetilcelulose/Amido e sua Utilização como Veículo de Inoculação Bacteriano**, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química – Tecnologia Química) Instituto de Tecnologia – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- RICKARD, J.E., **Quality Aspects of Tropical Root Crop and Sago Starches**. In: Starch Chemistry and Starches, Hamilton, R.M. and E.F. Paschal, International Society Tropical Root Technology, Ghana, 1991.
- RINAUDO, M.,Main properties and current application of some polysaccharides as biomaterials, **Polymer International**, v.57, p.397-430, 2008.
- ROSA, D.S.;FRANCO, B.L.M.;CALI, M.R., Biodegradabilidade e propriedades mecânicas de novas misturas poliméricas, **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.11, p.82-88, 2001.
- ROSEIRO, J.C.; ESGALHADO, M.E.; AMARAL-COLLAÇO, M.T.; EMERY, A.N. Medium Development for Xanthan Production. **Process Biochem.**,27, 167-175, 1992.

ROZEMA, H.; BEVERLOO, W. A., Laminar isothermal flow of non-Newtonian fluids in a circular pipe. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technology**, 7(4), p.223–228, 1974.

SARMENTO, S. B. S. **Caracterização da fécula de mandioca (Marinhot esculenta C.) no período de colheita de cultivares de uso industrial**. Tese (Doutorado) – Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1997

SERRATO, R.V., **Caracterização Química e Estrutural de Exopolissacarídeos e Lipopolissacarídeos Produzidos por Bactérias Diazotróficas Endofíticas**, Tese (Doutorado em Ciências (Bioquímica – Dep. Bioquímica e Biologia Celular), Universidade Federal do Paraná, 2008.

SHIOTSUBO, T.; TAKAHASHI, K. , Differential thermal analysis of potato starch gelatinization, **Agric. Biol. Chem.** 48, p.9-17, 1984.

SKALAK, R.; CHIEN, S., **Handbook of bioengineering** McGraw-Hill Book Company, New York, 1987.

SKORUPSKA, A.; JANCZAREK, M.; MARCZAK, M.; MAZUR, A.; KRÓL, J., Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions, **Microbial Cell Factories**, v.5, np, 2006.

SLADE, L.; LEVINE, H., **Recent advances in starch retrogradation**. In *Industrial Polysaccharides – The Impact of Biotechnology and Advanced Methodologies*; Stivala, S.S., Crescenzi, V., Dea, I.C.M., Eds.; Gordon and Breach Science Publishers, New York, 1987.

STEFFE, J.F., **Rheological methods in food process engineering**, Second edition, Freeman Press, Michigan, 1996.

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

SWINKELS, J.J.M. (1985). Composition and properties of commercial native starches. **Starch/Stärke** 37 (1) p.1-5, 1985.

TAVERNIER, P.; PORTAIS, J.; SAUCEDO, J.E.N.; COURTOIS, J.; COURTOIS, B.; BARBOTIN, J.N. Exopolysaccharide and Poly- β -hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.21-26, 1997.

THOMAS, D.J.; ATWELL, W.A. **Starches: Practical Guides for the Food Industry**. Minnesota: Eagan Press, p.94, 1999.

VAN DER BURGT, Y. E. M; BERGSMA, J.; BLEEKER, I. P.; MIJLAND, P. J. H.; VAN DER KERK-VAN HOOFF, A.; KAMERLING, J. P.; VLIEGENTHART, J. F. G. Distribution of methyl substituents over branched and linear regions in methylated starches. **Carbohydrate Research**, Volume 312, Issue 4, November, p.201-208, 1998.

WADA, K.; TAKAHASHI, K.; SHIRAI, K.; KAWAMURA, A., Differential thermal analysis (DTA) applied to examining gelatinization of starches in foods, **J. Food Sci.**, 44, p.1366-1368, 1979.

WURZBURG, O.B. **Modified starches: properties and uses**. Boca Raton: CRC Press Inc., p.277, 1986.

YANOVSKY, Y.G., **Polymer rheology: theory and practice**. Chapman and Hall, New York, 1993.

YASEEN, E.I.; HERALD, T.J.; ARAMOUNI, F.M.; ALAVI, S., Rheological properties of selected gum solutions, **Food Research International** 38, p. 111-119, 2005.

ZOBEL, H.F.; YOUNG, S.N.; ROCCA, L.A., Starch gelatinization: An X-ray diffraction study, **Cereal Chem.** 65, p.443-446, 1988.

<http://fap01.if.usp.br/>, Acesso em 22/01/ 2012

www.colegiosaofrancisco.com.br, Acesso em 22/01/2012.