



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0406309-0 B1

(22) Data do Depósito: 05/11/2004

(45) Data de Concessão: 25/07/2017



(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO TIPO XANTANA, USO DAS BACTÉRIAS XANTHOMONAS ARBORICOLA OU XANTHOMONAS ARBORICOLA PRUNI E USOS DO BIPOLÍMERO OBTIDO

(51) Int.Cl.: C12P 19/06; C12R 1/64; C12N 1/20

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO

(72) Inventor(es): CLAIRE TONDO VENDRUSCOLO; ANGELITA DA SILVEIRA MOREIRA; JOÃO LUIZ SILVA VENDRUSCOLO

**PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO TIPO XANTANA, USO DAS
BACTÉRIAS *Xanthomonas arboricola* ou *Xanthomonas arboricola* pruni E
USOS DO BIOPOLÍMERO OBTIDO**

[001] Refere-se a presente invenção a um processo de produção de biopolímeros tipo xantana, a partir de culturas de cepas bacterianas de *Xanthomonas arboricola* ou *Xanthomonas arboricola* pruni, em meios nutritivos submersos utilizando águas residuais e derivados do processamento de arroz e de arroz parboilizado. Neste processo de produção prepara-se o inóculo em meio pré-determinado com baixa concentração de sacarose ou glicose, o qual posteriormente é transferido para um meio líquido de fermentação contendo, macro e micronutrientes, vitaminas do complexo B, vitamina E e/ou nicotinamida, além de alta concentração de carboidratos, principalmente sacarose. Este meio é submetido a condições específicas de aeração e agitação, temperatura e controle de pH. Após a fermentação os biopolímeros são insolubilizados, pela adição de sais e solventes orgânicos polares, separados e secos, e pulverizados na granulometria desejada para o uso.

[002] Biopolímeros microbianos são polissacarídeos obtidos por processos biotecnológicos com utilização de fungos, leveduras ou bactérias. A importância e potencialidade do uso de biopolímeros nos mais diversos segmentos industriais como agentes espessantes, estabilizantes, gelificantes e emulsificantes em alimentos, fármacos, tintas, defensivos agrícolas, indústria petrolífera e outros, é um consenso na literatura pertinente. Observa-se nesses setores uma contínua substituição dos polissacarídeos convencionais por produtos de origem microbiana, por varias razões, como possibilidade de modificação de suas características reológicas através do controle dos parâmetros de fermentação, independência climática, controle de qualidade dos lotes, entre outras.

[003] A xantana consiste em um polissacarídeo aniônico, extracelular, de alto peso molecular, $2 \cdot 10^6$ a $12 \cdot 10^6$ gmol^{-1} , formada por unidades pentassacarídicas que podem ser repetidas de 2000 a 6000 vezes, é produzido por fermentação aeróbica de culturas de *Xanthomonas campestris*, comercialmente pelo uso do patovar campestris. É formada pelos monossacarídeos D-manose, D-glicose e

ácido D-glicurônico, além de radicais pirúvico e acético. A principal característica da xantana é sua capacidade de modificar a reologia ou o comportamento de fluxo das soluções. Suas propriedades são determinadas por sua composição química, arranjos e ligações moleculares. O Brasil segue a tendência mundial de
5 incremento no consumo de xantana, mesmo sendo esta totalmente importada. Até o presente, apesar de dispor de uma diversidade de bactérias capazes de produzir biopolímeros, e de ser o principal produtor mundial dos insumos mais utilizado para esta produção, sacarose e álcool, o Brasil ainda não produz xantana.

A descoberta do biopolímero xantana ocorreu nos Estados Unidos da
10 América, nos anos 50, motivada pelo interesse em gomas hidrossolúveis produzidas por microrganismos, quando se observou que a cepa NRRL B 1459 de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* produzia colônias extremamente gomosas. A primeira patente de produção de xantana por *Xanthomonas campestris* pv *campestris* data de 1961 (US 3 000 790). A esta seguiram-se
15 inúmeras outras, da U.S. Secretary of Agriculture e de companhias como a Esso Research, Jersey Production Research Co., Kelco Co., Rhone Poulenc Industries, Pfizer Inc., Standard Oil Co., Sanofi-Société Nationale Elf Aquitaine, sobre processo de fermentação (US 3 020 206; US 3 251 749 US 3 328 262; US 3 391 060; US 3 391 061; US 3 485 719; FR 2 342 339; FR 2 414 555; US 4 282 321; EP
20 66 961; EP 66 377; US 4 352 882; US 4 328 310; US 4 400 467; US 4 407 950; US 4 407 951; FR 2 671 097), sendo todas referentes à *Xanthomonas campestris*; e processos nos quais se utilizam para produção de inóculo meio contendo 3g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3g.L⁻¹ de extrato de malte, 5g.L⁻¹ de peptona; 10g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de Agar com incubação entre 24 e 72h em temperatura de 25 a
25 30°C. E como meio de produção são utilizados meios contendo 0,01% a 0,5% de sais minerais como K₂HPO₄ e MgSO₄; 0,1% a 0,5% de ácidos orgânicos como ácido succínico e 0,01% a 1% de compostos orgânicos como farelo de soja, uréia e nitratos. Como fonte de carbono são utilizados, sacarose, melaço de cana-de-açúcar, resíduos das agroindústrias cafeeira e de batata, soro de leite, entre
30 outros. Outras patentes como (US 3 119 812; US 3 773 752) tratam de métodos de recuperação do polímero com álcoois, com ou sem adição de sais.

No Brasil, a primeira patente de processo de produção de xantana encontra-se registrada com data de depósito de 1982 (registro original na Alemanha); sob nº PI8203879-1, seguida desta encontra-se outra sobre processo, datada de 1988 e de nº PI8805325-3, onde a depositária é a UNICAMP, e o
5 terceiro e ultimo registro de processo é do ano de 2000, sob nº PI0007342-3, sobre produção de goma xantana por fermentação a partir de mandioca, batata e resíduos da agroindústria cafeeira. Todos estes registros de patente nos indicam que a produção foi e continua sendo feita com a utilização de *Xanthomonas campestris*. Os polímeros resultantes apresentam a seguinte composição:
10 manose, glicose e ácido glicurônico, além de radicais pirúvico e acético. As xantanas comerciais, a despeito de todas suas excelentes qualidades, não são capazes de formarem géis verdadeiros quando utilizados isoladamente. Somente apresentam esta capacidade quando em associação com galactomananas e glucomananas. Também estes mesmo polímeros não apresentam aumento de
15 viscosidade com acréscimo de temperatura, o que é desejável para inúmeras utilizações; apresentam, ainda, baixa tolerância à adição de sais, de 0,001 a 1%, geralmente apresentando decréscimo de viscosidade para percentuais acima de 1%, o que significa prejuízo principalmente se aplicação for na exploração e recuperação de petróleo ou na produção de alimentos. Todos os polímeros
20 produzidos por *Xanthomonas campestris* apresentam redução de viscosidade com aumento de temperatura.

Devido à inovação do uso de *Xanthomonas arboricola* combinada à inovação do meio de fermentação, este com utilização de águas residuais da industrialização do arroz como a parboilização, adicionadas de derivados e
25 subprodutos como farelos de arroz, em fermentação aeróbica, obtém-se um novo biopolímero. Foi provado que o uso combinado desta bactéria a este meio específico produz biopolímero do tipo xantana diferenciado da xantana comercial pela presença de ramnose na sua composição. Como melhoria este polímero apresenta-se mais resistente à temperatura e com maior viscosidade, além de
30 extremamente eficiente no que se refere à compatibilidade com sais, que em sua maioria duplicam a viscosidade das soluções aquosas do biopolímero a 1% e 3%

e com adição de sais 0,2 a 10%. A maior vantagem da aplicação deste biopolímero é na exploração de petróleo, onde são necessários polímeros com viscosidades elevadas e com determinada resistência à temperatura. A aplicação em alimentos também é beneficiada pela redução da quantidade exigida, pois a
5 simples presença de sais existente nas formulações de produtos é suficiente para aumentar a viscosidade. A figura 01 mostra exemplos de viscosidade de caldos de fermentação de duas cepas de *Xanthomonas arboricola*. As figuras 02 e 03 mostram as viscosidades obtidas com as soluções aquosas de biopolímeros a 25°C, produzidos pela mesma cepa em diferentes tempos (24, 48 e 72h), na
10 concentração de 1%, e por diferentes cepas de *Xanthomonas arboricola*, na concentração de 3%. Estas mesmas figuras mostram o comportamento pseudoplástico destas soluções. A figura 04 mostra o comportamento da viscosidade frente ao aumento de temperatura apresentado por biopolímeros de diferentes cepas de *Xanthomonas arboricola*. Os anexos 01 e 02 mostram os
15 fluxogramas de produção do biopolímero, com presença de células e purificado ou sem células.

Refere-se a presente invenção a um processo de produção de biopolímeros do tipo xantana, a partir de culturas liofilizadas de cepas bacterianas de *Xanthomonas arboricola* ou *Xanthomonas campestris* pv *pruni*, isoladas de tecidos
20 necrosados de espécies do gênero *Prunus*, em meios nutritivos submersos, submetidos às condições adequadas de produção. Neste processo de produção prepara-se o inóculo em meio pré-determinado com baixa concentração de sacarose ou glicose, o qual é submetido à agitação moderada em temperatura de melhor desenvolvimento desta bactéria (15 a 35°C); posteriormente, o inóculo é
25 transferido para um meio líquido de fermentação contendo, no todo ou em parte, macro e micronutrientes provenientes de águas de cozimento e/ou maceração de arroz com casca, ou ainda águas residuais de processamento de arroz parboilizado, sendo o meio ainda adicionado de derivados como farelo de arroz e/ou farelo de trigo e também de vitaminas do complexo B, vitamina E e/ou
30 nicotinamida, além de alta concentração de carboidratos, principalmente sacarose. Este meio é submetido a condições específicas de aeração e agitação,

temperatura e controle de pH. Finalmente, após a fermentação ser completada entre 24 e 72h, é feita a separação de células (quando exigida) por centrifugação do meio fermentado; posteriormente os biopolímeros são insolubilizados, pela adição de sais e solventes orgânicos polares, principalmente álcoois de dois ou
5 três carbonos, separados e secos; ou, alternativamente, os polímeros podem ser secos diretamente, quando permitida a presença de células, e pulverizados na granulometria desejada para o uso.

Como resultado mais expressivo da utilização da *Xanthomonas arboricola*, são obtidos biopolímeros que possuem uma composição diferenciada das xantanas
10 atualmente comercializadas por apresentarem ramnose, o que lhes confere a capacidade de formarem géis verdadeiros mesmo quando utilizados isoladamente. Estes biopolímeros apresentam, ainda, mais alta viscosidade em soluções aquosa do polímero natural e aumento de viscosidade para adição de sais em concentrações 0,5 a 6,0%. E para determinadas condições de processo, pode-se
15 obter um aumento de viscosidade das soluções do biopolímero com o aumento de temperatura, o que é incomum para as xantanas atualmente comercializadas. Outra vantagem é a redução do custo de produção pelo aproveitamento de águas residuais, como mencionado.

Para melhor entendimento do processo ora proposto, são descritas, a seguir,
20 suas diferentes etapas, pormenorizadamente.

O processo consiste das seguintes etapas:

- a) Preparo do pré-inóculo inicial a partir da adição de colônias isoladas de *Xanthomonas arboricola* e/ou *Xanthomonas campestris* pv *pruni*: crescidas em meio sólido ou liofilizadas, em meio específico para crescimento celular,
25 constituído de 13 a 55g.L⁻¹ de sacarose ou glicose, 1,0 a 37g.L⁻¹ de peptona, 10 a 20g.L⁻¹ de Agar, 0,03 a 0,90g.L⁻¹ de K₂HPO₄ e 0,001 a 2,5g.L⁻¹ de MgSO₄ e/ou vitaminas do complexo B, incubadas por 24 ou 48h a uma temperatura de 20 a 35°C e pH 4,6 a 7,7.
- b) Transferência do pré-inóculo inicial para um meio líquido constituído de 13
30 a 55g.L⁻¹ de sacarose ou glicose, 1,0 a 37g.L⁻¹ de peptona, 0,03 a 0,90g.L⁻¹ de K₂HPO₄ e 0,001 a 2,5g.L⁻¹ de MgSO₄ e/ou vitaminas do complexo B, incubadas

por 24 ou 48h a uma temperatura de 20 a 35°C e pH 4,6 a 7,9, com agitação de 100 a 250 rpm; este inóculo, agora denominado pré-inóculo final, pode ser liofilizado para uso posterior ou ser transferido diretamente ao fermentador.

5 c) Transferência asséptica do pré-inóculo final diretamente para um fermentador estéril com agitação e aeração, contendo meio líquido constituído de 13 a 55g.L⁻¹ de sacarose ou glicose, 1,0 a 37g.L⁻¹ de peptona, 0,03 a 0,90g.L⁻¹ de K₂HPO₄ e 0,001 a 2,5g.L⁻¹ de MgSO₄ e/ou vitaminas do complexo B e incubação por 24 ou 48h a uma temperatura de 20 a 35°C e pH 4,6 a 7,9. O pré-inóculo inicial, quando liofilizado, deve ser reativado por ressuspensão e nova incubação nas
10 condições prévias, antes de ser transferido ao fermentador, enquanto que o pré-inóculo recém preparado é transferido diretamente para um fermentador; ao final desta etapa este preparado passa a ser denominado de inóculo.

d) Transferência do inóculo para outro fermentador estéril, contendo o meio líquido para produção do biopolímero por fermentação submersa ou adição deste
15 meio estéril no fermentador contendo o inóculo, nas seguintes condições de processo: agitação e aeração por injeção de oxigênio de 100 a 600 rpm e 0,5 a 4 vvm, respectivamente, temperatura entre 22 e 35°C, pH entre 5,0 e 7,5 durante cerca de 48 a 72h; e meio composto por água de maceração ou cozimento de arroz com casca ou água resultante do processo de parboilização de arroz, além
20 de celulose, farelo de arroz e/ou de trigo e/ou macronutrientes nitrogênio, fósforo e potássio de 0,1 a 4,2g.L⁻¹, e os micronutrientes magnésio e ferro de 0,01 a 1,7 g.L⁻¹ e de vitaminas do complexo B, vitamina E e/ou nicotinamida, sacarose até 25% e 50 a 200 ppm de silicone e/ou óleo de arroz. Após o término da fermentação, a inativação das células do caldo fermentado é feita no próprio fermentador, por
25 esterilização térmica ou inativação química com uso de compostos clorados.

e) Diluição do caldo fermentado: quando este apresentar viscosidade acima de 250 mPa.s em 10 s⁻¹, dilui-se o mesmo com água ou uma mistura de água e solventes orgânicos polares, principalmente álcool de dois a três carbonos, como o etílico e isopropílico, até atingir uma viscosidade igual ou abaixo de 250 mPa.s
30 em 10 s⁻¹; após, procede-se à centrifugação contínua de 10.000 a 15.000g para

retirada das células, quando esta é requerida. No caso de diluição com solução água/álcool, a concentração máxima deve ser 40% de álcool.

- f) Insolubilização do biopolímero: é conduzida após a centrifugação, quando a remoção das células é exigida. Alternativamente, quando a remoção das células não é obrigatória, a insolubilização do polímero pode ser feita após a inativação celular. A insolubilização é feita através da adição do solvente ao caldo centrifugado, adicionado ou não de sais mono e/ou divalentes, entre os selecionados NaCl, KCl e CaCO_3 , utilizados nas concentrações de 0,1% a 3%. A precipitação do polímero ocorre quando a concentração do solvente atinge entre 50% a 80%.
- g) Separação do biopolímero: por drenagem em esteira que conduzirá o polímero a secadores de superfície ou de superfície raspada; posteriormente, é triturado em moinho de bolas ou tipo universal. A secagem também pode ser feita em secador de superfície raspada.
- h) Opcionalmente, quando a utilização do biopolímero não exige ausência de células ou outros componentes residuais do meio de fermentação, como açúcar, pode-se optar pelo processo de secagem direta do caldo fermentado por *spray dryer* ou em secador de superfície, e posteriormente trituração na granulometria desejada, em moinho de bolas ou tipo universal.
- i) Como o consumo de álcool é elevado, a recuperação deste deve ser feita por destilação, para reutilização na insolubilização dos biopolímeros.
- j) As características dos biopolímeros obtidos quando se utiliza a associação de cepas da bactéria *Xanthomonas arboricola* ou *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* e o processo ora descrito são: a - composição, hetero-exopolissacarídeo formado predominantemente pelos monossacarídeos glicose, manose, ácido glicurônico, pirúvico e acético e, diferencialmente da *Xanthomonas campestris* pv *campestris* e *manihoti*, pela presença de ramnose. b - elevado peso molecular, entre $4 \cdot 10^6$ a $12 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. c- apresentação, a mais apropriada ao uso é em pó, adicionado ou não de sais, o qual é facilmente solubilizado em água fria ou quente ou em soluções fracamente iônicas. O biopolímero pode ser apresentado também na forma de soluções aquosas concentradas (de 2 a 6% de

biopolímero) prontas para serem adicionadas aos produtos nos quais serão utilizados. d – cor, quando na forma de pó, ou mesmo em soluções concentradas, a cor varia do cinza claro ao amarelo claro, raramente pode chegar a castanho escuro, dependendo das condições de processo. Quando o biopolímero é purificado obtém-se pó branco ou amarelo muito claro que produz soluções transparentes mesmo nas concentrações de 3% a 6%.

k) Foi provada ser vantajosa a utilização da bactéria *Xanthomonas arboricola* e ou *Xanthomonas campestris* pv *pruni*, e do meio aqui mencionado, o que é evidenciado pela qualidade dos biopolímeros produzidos, que apresentam elevada viscosidade das soluções aquosas ao serem utilizados ao natural ou isoladamente. Alguns destes polímeros produzidos em determinadas condições apresentam a característica incomum de aumentar a viscosidade com o aumento de temperatura. Também são capazes de formarem géis verdadeiros quando utilizados isoladamente. Além destas, ainda apresentam um melhor desempenho em relação à adição de sais, sendo capazes de aumentar drasticamente a viscosidade com adição de sais, mesmo os monovalentes, podendo até duplicar a viscosidade. Em solução aquosa a 1% de biopolímero, a viscosidade destes polímeros varia de 1000 a 5000 mPa.s em $10s^{-1}$ a 25°C. E as soluções aquosas a 3% de biopolímero variam de 4000 a 28000 mPa.s em $10s^{-1}$ a 25 °C. Também o comportamento reológico destas soluções é fundamental para determinar o seu uso. A alta pseudoplasticidade, apresentada nas figuras 01 e 02, é um parâmetro exigido para aplicação deste biopolímero em exploração de petróleo, para aplicação em alimentos que passem por bombeamento durante o processamento, bem como para outras que dependam desta característica. Além da viscosidade, a estabilidade destas soluções a diferentes pH e temperatura confirma a qualidade do biopolímero. Este biopolímero é estável na faixa de pH de 3,0 a 12 e em temperaturas de 0 a 100 °C. A rápida solubilização em água fria e/ou quente ou ainda, em soluções salinas ou pouco ácidas, e a sua compatibilidade com sais também é fundamental para o seu uso em alimentos ou outros usos que dependam desta característica.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de produção de biopolímero tipo xantana, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) preparo do pré-inóculo inicial a partir da adição de colônias isoladas de *Xanthomonas arboricola* e/ou *Xanthomonas campestris* pv *pruni*, crescidas em meio sólido ou liofilizadas, em meio específico para crescimento celular, constituído de 13 a 55g.L⁻¹ sacarose ou glicose, 1,0 a 37g.L⁻¹ de peptona, 10 a 20 g.L⁻¹ de Agar, 0,03 a 0,90 de K₂HPO₄ e 0,001 a 2,5 de MgSO₄ e/ou vitaminas do complexo B, incubadas por 24 ou 48h a uma temperatura de 20 a 35°C e pH 4,6 a 7,7;

b) Transferência do pré-inóculo inicial de a) para um meio líquido constituído de 13 a 55 g.L⁻¹ sacarose ou glicose, 1,0 a 37g.L⁻¹ de peptona, 0,03 a 0,90 de K₂HPO₄ e 0,001 a 2,5 g.L⁻¹ de MgSO₄ e/ou vitaminas do complexo B, incubadas por 24 ou 48h a uma temperatura de 20 a 35°C e pH 4,6 a 7,9, com agitação de 100 a 250 rpm; este inóculo, agora denominado pré-inóculo final;

c) Transferência asséptica do pré-inóculo final de b) diretamente para um fermentador estéril, com agitação e aeração, contendo meio líquido constituído de 13 a 55 g.L⁻¹ sacarose ou glicose, 1,0 a 37g.L⁻¹ de peptona, 0,03 a 0,90 de K₂HPO₄ e 0,001 a 2,5 g.L⁻¹ de MgSO₄ e/ou vitaminas do complexo B e incubação por 24 ou 48h a uma temperatura de 20 a 35°C e pH 4,6 a 7,9 sendo que ao final desta etapa este preparado passa a ser denominado de inóculo;

d) Transferência do inóculo de c) para um outro fermentador estéril, contendo o meio líquido para produção do biopolímero por fermentação submersa, com agitação e aeração, nas seguintes condições: temperatura entre 22 e 35°C, injeção de oxigênio de 0,5 a 4 vvm, pH entre 5,0 e 7,5 durante cerca de 48 a 72h, sendo o meio composto por: sacarose até 25%, água de maceração ou cozimento de arroz com casca ou água resultante do processo de parboilização de arroz, além de celulose, farelo de arroz e/ou de trigo e/ou macronutrientes nitrogênio,

fósforo e potássio de 0,1 a 4,2g.L⁻¹, e os micronutrientes magnésio e ferro de 0,01 a 1,7 g.L⁻¹ e de vitaminas do complexo B, vitamina E e/ou nicotinamida, 50 a 200 ppm de silicone e/ou óleo de arroz;

e) Diluição do caldo fermentado: para viscosidade acima 250 mPa em 10 s⁻¹, com água ou uma mistura de água e solventes orgânicos polares, dentre os selecionados álcool etílico e isopropílico, até atingir uma viscosidade igual ou abaixo de 250 mPas em 10 s⁻¹; e concentração final máxima de solvente orgânico de 40%;

f) Centrifugação contínua entre 10.000 e 15.000g para retirada das células;

g) Insolubilização do biopolímero através da adição do solvente ao caldo centrifugado, com adição ou não de sais mono e/ou divalentes, selecionados dentre NaCl, CaCO₃ utilizados nas concentrações de 1 a 3%;

h) Separação do biopolímero por drenagem em esteira para condução do polímero a secadores de superfície ou de superfície raspada e posterior trituração em moinho; e

i) Recuperação do solvente utilizado por destilação, para reutilização na solubilização dos biopolímeros.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por alternativamente o caldo fermentado proveniente da etapa de fermentação ser conduzido diretamente a secadores de superfície raspada e em seguida triturado em moinho.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por alternativamente na etapa de solubilização os solventes serem adicionados ao caldo fermentado contendo as células bacterianas.

4. Uso das bactérias *Xanthomonas arboricola* ou *Xanthomonas campestris* pv pruni, caracterizado por ser na etapa d) do processo para produção de biopolímeros de acordo com a reivindicação 1.

5. Uso do biopolímero produzido por um processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser em fluidos de exploração e recuperação de petróleo.
6. Uso do biopolímero produzido por um processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser em alimentos.
7. Uso do biopolímero produzido por um processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser em fármacos.
8. Uso do biopolímero produzido por um processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser em cosméticos.

01/06

Fig 01

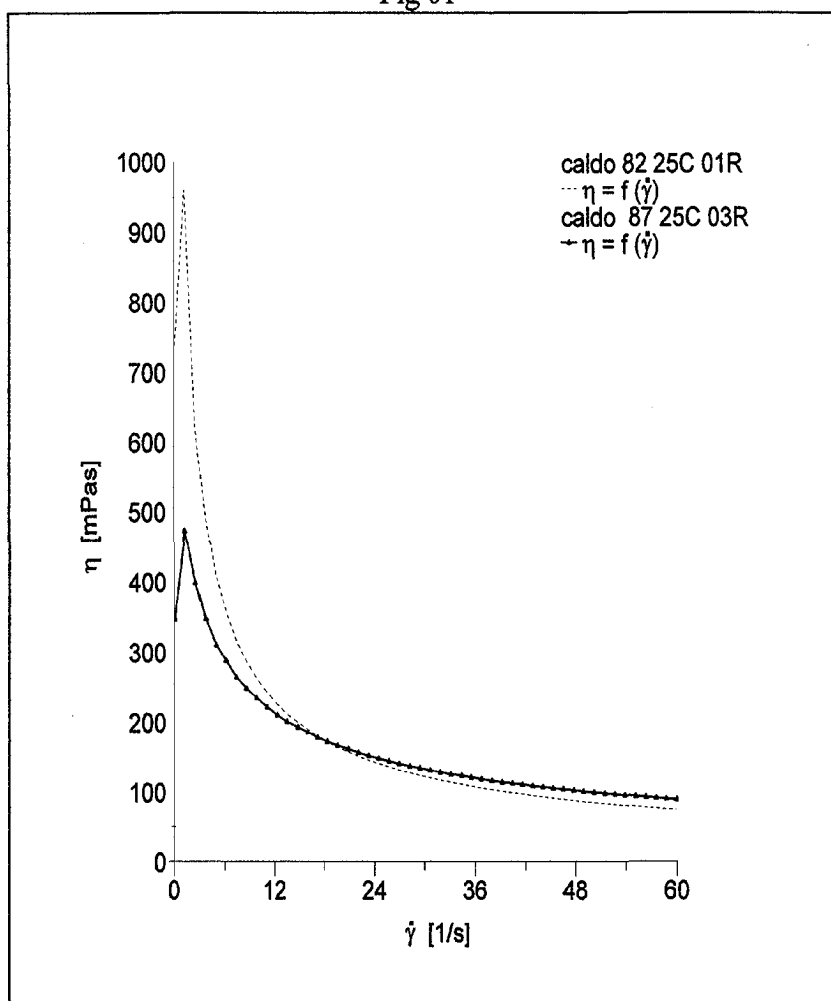


Fig 02

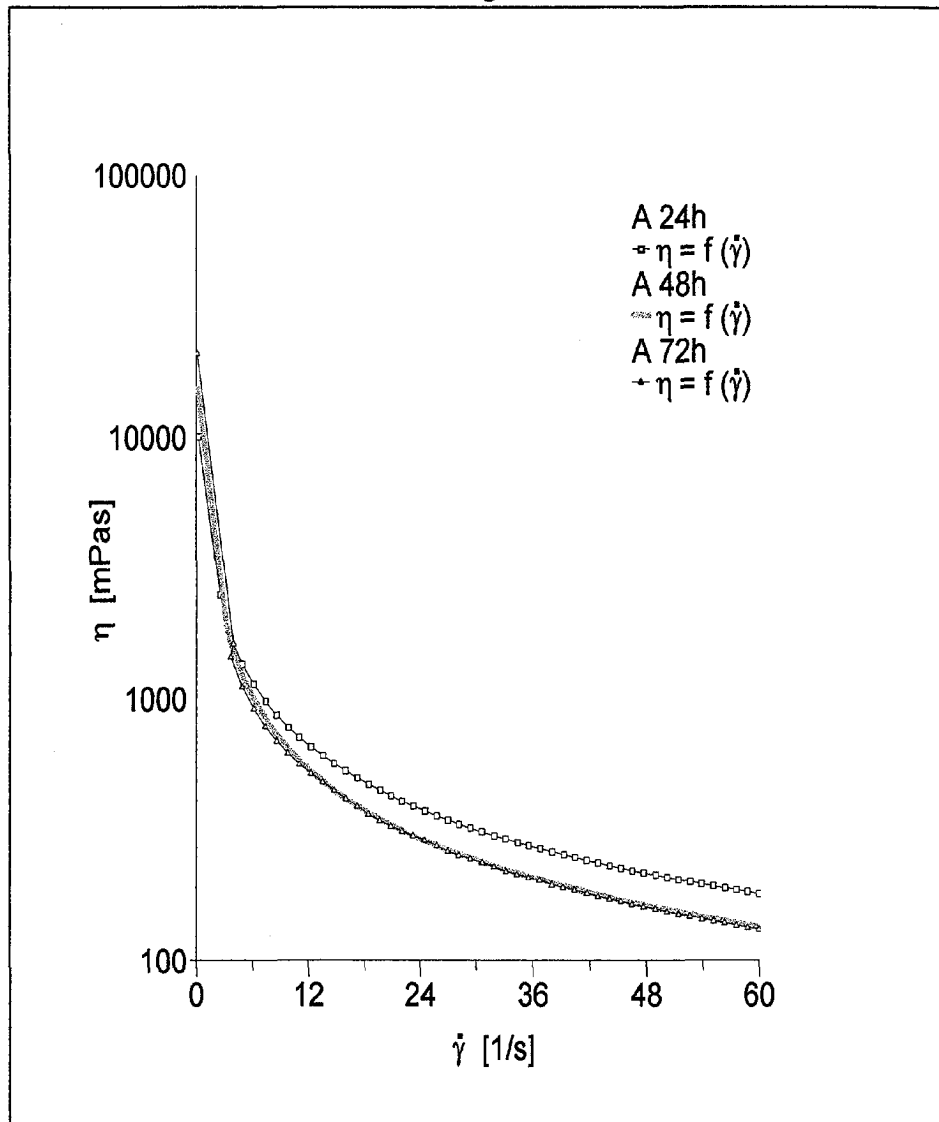
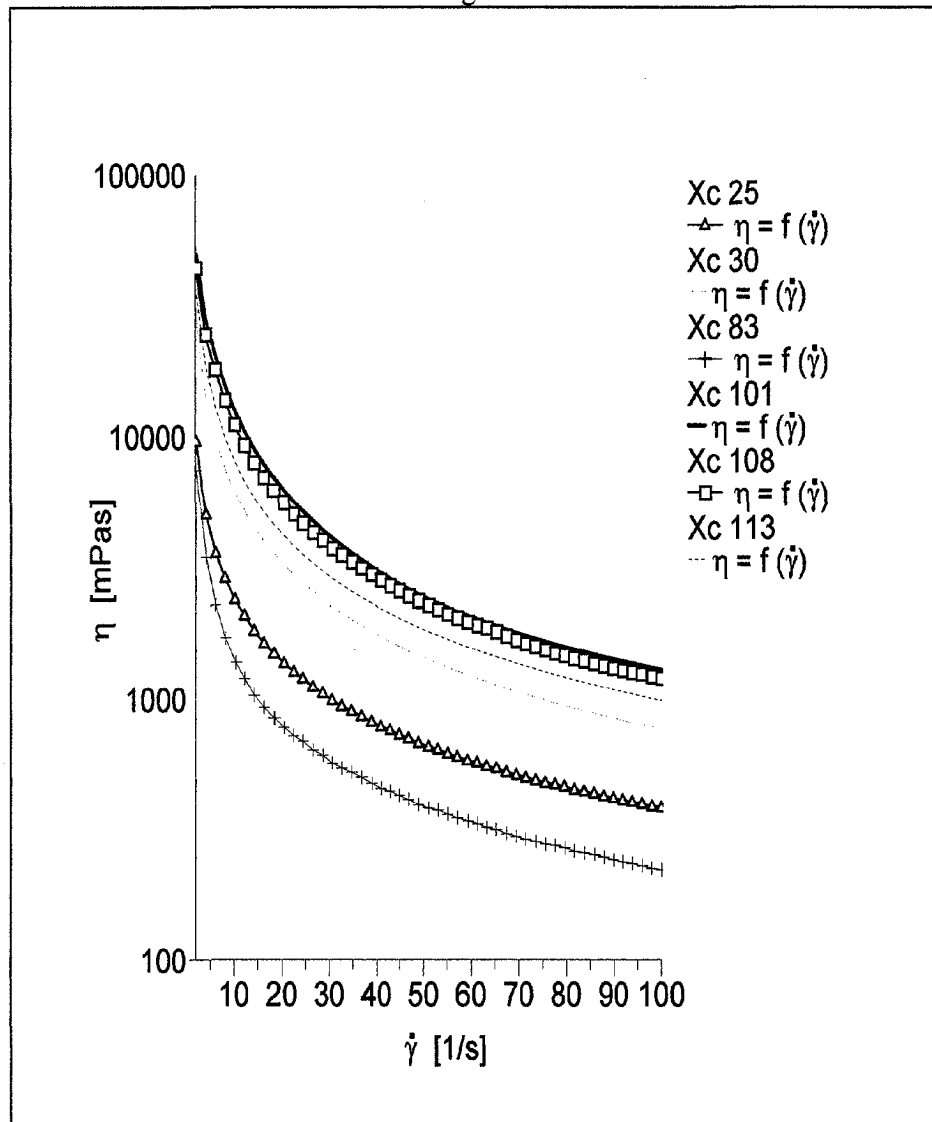
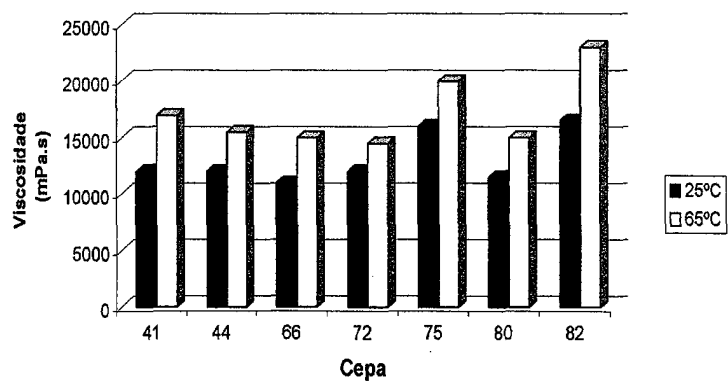
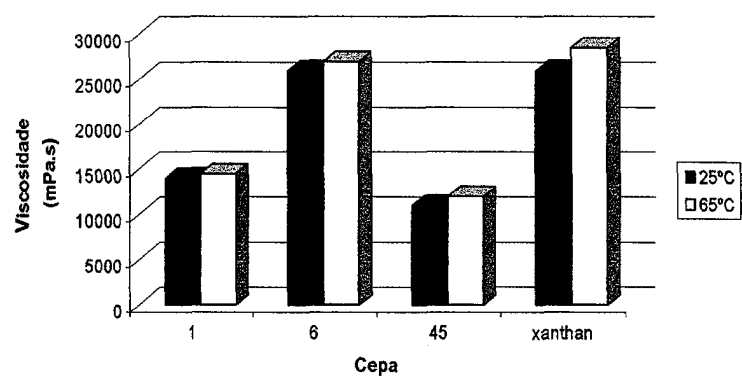
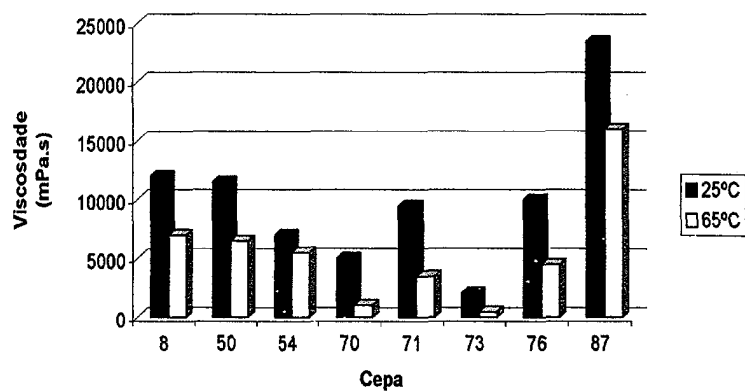


Fig 03



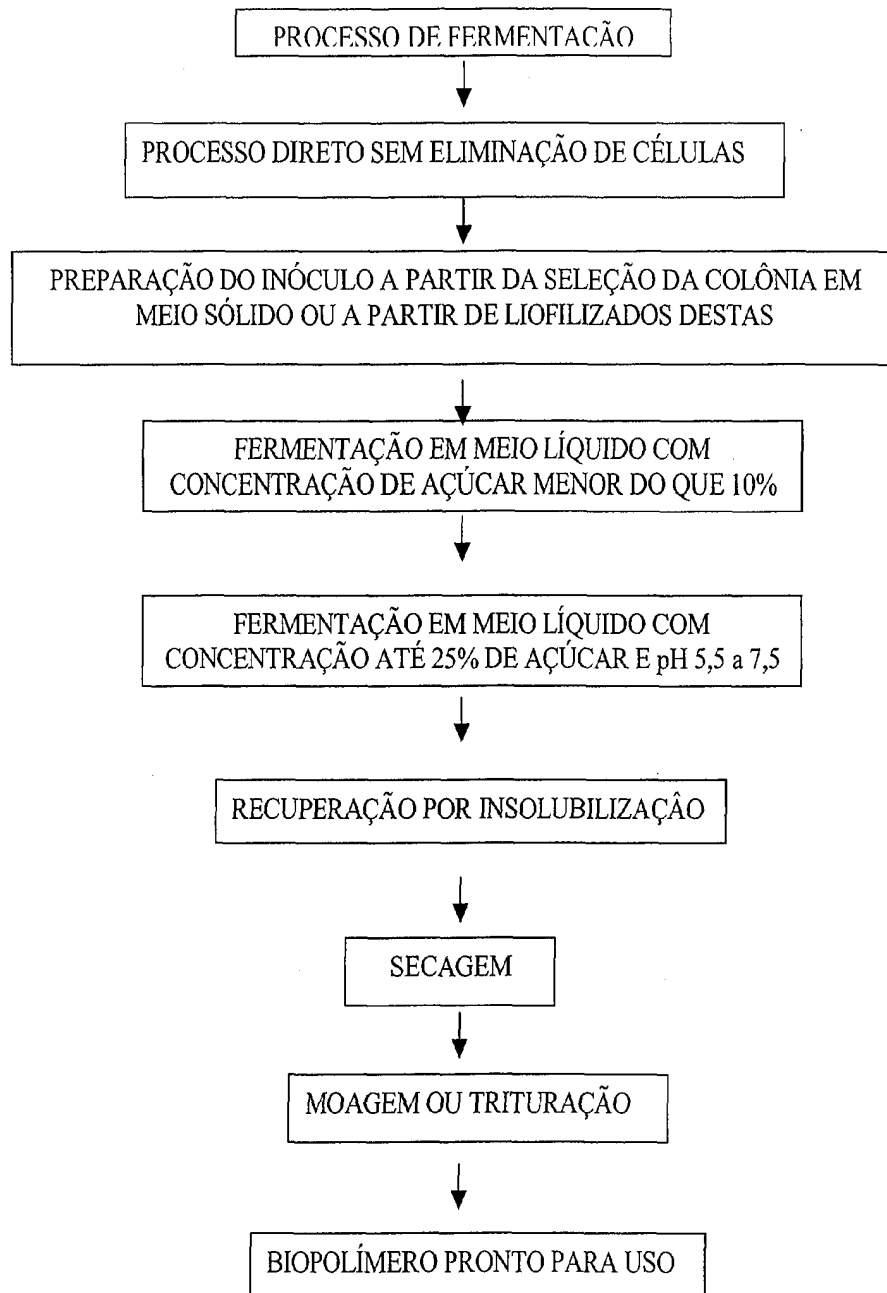
04/06

Fig 04



05/06

ANEXO 01



06/06

ANEXO 02

