



ESTUDO DOS EFEITOS DOS COMPONENTES DO MEIO DE CULTURA PARA CRESCIMENTO CELULAR DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* NYDA B-10.

M. S. SILVEIRA¹, G.A. S. PINTO² e S. RODRIGUES³

¹Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química
e-mail: mariufc@yahoo.com.br

²EMBRAPA Agroindústria Tropical, Laboratório de Bioprocessos.

³Universidade Federal do Ceará, Departamento de Tecnologia de Alimentos
e-mail: sueli@ufc.br

RESUMO – Muitos estudos nutricionais têm sido realizados a fim de obter qualidade e rendimento cada vez melhores da goma. Entretanto, tais estudos têm focalizado, basicamente, a fase de produção da xantana. Para obtenção de uma goma de qualidade, é necessário também focar a influência dos fatores nutricionais do meio de cultivo na fase de crescimento da *Xanthomonas campestris* para produção do inóculo da fase de produção da goma. O meio tradicional para o crescimento de *Xanthomonas campestris* é conhecido como meio YM. Neste trabalho foi realizado um planejamento experimental que avaliou diversos componentes, tais como extrato de levedura, peptona, extrato de malte e sulfato de amônio para avaliar a influencia destes no crescimento da *Xanthomonas campestris*. Os nutrientes que apresentaram efeito significativo para o aumento da concentração de biomassa foram peptona e o extrato de malte.

PALAVRAS-CHAVE: crescimento celular, processos fermentativos, fontes de nitrogênio.

1. INTRODUÇÃO

A goma xantana é um heteropolissacarídeo, cuja a unidade básica repetidora é um pentassacarídeo, constituído por duas unidades de glicose, duas de manose, uma de ácido glucurônico, na proporção molar de 2,8:2,0:2,0 e grupos piruvato e acetil (Garcia-Ochoa, 2000; Maugeri, 2001).

A principal característica da xantana é sua capacidade de modificar a reologia ou o comportamento de fluxo das soluções (Margaritis e Pace, 1985). Suas propriedades

são determinadas por sua composição química, arranjos e ligações moleculares (Pace, 1980). O meio de cultivo e as condições operacionais influenciam no rendimento e estrutura da goma xantana produzida (Garcia-Ochoa, 2000).

A goma xantana é um polissacarídeo natural e um importante biopolímero industrial. É totalmente atóxica, tendo sido aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA desde 1969, como aditivos em alimentos. No Brasil o uso de goma xantana como aditivos em alimentos é permitido desde 1965 pelo Decreto-Lei nº



55.871 da Legislação Brasileira de Alimentos (Lima *et al.*, 2001).

A goma xantana deve provavelmente continuar sendo o polímero mais utilizado nos próximos anos, devido as suas características reológicas singulares. A vantagem da goma xantana sobre as outras existentes no mercado é a sua estabilidade em relação ao pH e temperatura (Maugeri, 2001).

O Brasil segue a tendência mundial de incremento no consumo de xantana, mesmo sendo esta totalmente importada, demonstrando a relevância de se investir em uma produção nacional competitiva, já que o Brasil mostra-se com um grande potencial para a fabricação deste polímero em escala industrial, pois dispõe de matéria-prima (Padilha, 2003)

Estudos nutricionais têm sido realizados a fim de obter qualidade e rendimento cada vez melhores da goma. Entretanto, tais estudos têm focalizado, basicamente, a fase de produção da xantana. Para obtenção de uma goma de qualidade, é necessário também focar a influência dos fatores nutricionais do meio de cultivo na fase de crescimento da *Xanthomonas campestris* para produção do inóculo da fase de produção da goma (Cadmus *et al.*, 1978; Galindo, 1993; Garcia-Ochoa *et al.*, 2000).

A relação carbono:nitrogênio no meio de cultura influencia grandemente tanto a produção de goma como o crescimento do microrganismo. Uma elevada concentração de nitrogênio é necessária para um rápido crescimento celular (Nitschke *et al.*, 2001)

Na condução de uma fermentação, o preparo do inóculo e a fermentação propriamente dita são as principais fases do processo. Na primeira, multiplica-se o microrganismo em quantidade suficiente e

em condições adequadas para assegurar o seu desenvolvimento na etapa seguinte (Cadmus *et al.*, 1978; García-Ochoa *et al.*, 2000).

Durante o desenvolvimento do inóculo o objetivo é aumentar a concentração celular minimizando a produção de goma xantana, pois a goma ao redor das células impede o transporte de nutrientes e estende a fase lag de crescimento (García-Ochoa *et al.*, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo estudar novas formulações de um meio alternativo ao YM contendo 10 g/L de glicose e avaliar o efeito da concentração de peptona, malte, extrato de levedura e sulfato de amônio, visando a produção de um inóculo que propicie uma melhor produção da goma.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do microrganismo

O microrganismo foi obtido junto a EMBRAPA Agroindústria Tropical.

2.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado a partir de um tubo de cultura estoque em glicerol de *Xanthomonas campestris* B-10 transferida para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio YM esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Após esse procedimento o Erlenmeyer contendo o meio YM adicionado da cultura estoque, foi incubado numa estufa bacteriológica à 28°C durante 24 horas. Logo após as 24 horas foi feita a leitura em espectrofotômetro a 560 nm.

2.3 Planejamento experimental para avaliar componentes do meio de cultura para produção de biomassa.



Planejamento experimental com 27 pontos foi realizado para analisar o crescimento da *Xanthomonas campestris* B-10 durante 72 horas utilizando meios de cultura contendo 10 g/L de glicose como fonte de carbono e concentrações variadas de peptona, extrato de malte, extrato de levedura e sulfato de amônio (Tabela 1). O ensaio foi conduzido em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura. A temperatura e a velocidade de agitação foram de 28°C e 120 rpm respectivamente.

Tabela 1. Planejamento experimental variando concentrações de fontes de nitrogênio para produção de biomassa de *Xanthomonas campestris* B-10.

Ensaio	Peptona(g/L)	Malte(g/L)	Lev(g/L)	S.A(g/L)
1	1	1	1	1
2	1	1	1	3
3	1	1	3	1
4	1	1	3	3
5	1	3	1	1
6	1	3	1	3
7	1	3	3	1
8	1	3	3	3
9	5	1	1	1
10	5	1	1	3
11	5	1	3	1
12	5	1	3	3
13	5	3	1	1
14	5	3	1	3
15	5	3	3	1
16	5	3	3	3
17	1	2	2	2
18	5	2	2	2
19	3	1	2	2
20	3	3	2	2
21	3	2	1	2
22	3	2	3	1
23	3	2	2	1
24	3	2	2	3
25	3	2	2	2
26	3	2	2	2
27	3	2	2	2

2.4 Determinação do crescimento celular

O crescimento microbiano foi determinado por densidade ótica no comprimento de onda de 560 nm (Mesomo, 2007) em espectrofotômetro Spectrum®, modelo SP200UV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Planejamento experimental para avaliar componentes do meio de cultura para produção de biomassa.

Na Tabela 2 observam-se os resultados de produção de biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10 nos meios variando concentrações de peptona, extrato de malte, extrato de levedura e sulfato de amônio durante 72 horas de fermentação. Através desse planejamento experimental foi possível avaliar quais desses componentes apresentaram efeitos significativos para produção de biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10. Lo, yang e Min (1997) estudaram o efeito da glicose e extrato de levedura no crescimento e produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* e concluíram que elevadas concentrações de nitrogênio são necessárias para um rápido crescimento e elevação da biomassa do microrganismo e elevadas concentrações de carbono são necessárias para produção de goma xantana.



Tabela 2. Resultados da produção de biomassa pela *Xanthomonas campestris* B-10 em 24, 48 e 72 horas de fermentação segundo o planejamento experimental realizado para avaliar componentes do meio de cultura de acordo com a Tabela 1.

meios	Abs 24 h	Abs 48 h	Abs 72 h
1	0,15 ± 0,01	0,15±0,00	0,13±0,01
2	0,2±0,03	0,23±0,00	0,17±0,00
3	0,19±0,02	0,2±0,01	0,2±0,00
4	0,2±0,02	0,21±0,00	0,18±0,01
5	0,36±0,00	0,45±0,03	0,38±0,01
6	0,4±0,00	0,45±0,02	0,41±0,00
7	0,38±0,00	0,44±0,02	0,38±0,01
8	0,39±0,01	0,42±0,01	0,37±0,01
9	0,25±0,02	0,24±0,00	0,26±0,02
10	0,28±0,00	0,33±0,01	0,34±0,00
11	0,3±0,01	0,38±0,03	0,3±0,00
12	0,32±0,04	0,36±0,00	0,34±0,04
13	0,49±0,00	0,47±0,01	0,43±0,00
14	0,51±0,02	0,53±0,01	0,49±0,00
15	0,5±0,00	0,52±0,04	0,46±0,00
16	0,55±0,01	0,59±0,02	0,5±0,01
17	0,25±0,00	0,23±0,00	0,22±0,00
18	0,46±0,02	0,51±0,00	0,5±0,01
19	0,24±0,01	0,26±0,00	0,27±0,03
20	0,45±0,01	0,46±0,00	0,44±0,01
21	0,39±0,00	0,39±0,00	0,37±0,01
22	0,45±0,03	0,4±0,01	0,37±0,01
23	0,38±0,03	0,38±0,00	0,34±0,00
24	0,36±0,01	0,4±0,01	0,38±0,00
25	0,42±0,08	0,38±0,01	0,37±0,01
26	0,36±0,02	0,37±0,01	0,38±0,02
27	0,39±0,00	0,4±0,01	0,38±0,02

Observa-se na Tabela 2 que o ponto 16 do planejamento experimental (5 g/L peptona e 3 g/L de extrato de malte) apresentou o melhor resultado para produção de biomassa em 24 e 48 horas com valores de 0,55±0,01 e 0,59±0,02 respectivamente.

Quando valores inferiores a 5 g/L de peptona e 3 g/L de extrato de malte são utilizados nota-se uma diminuição na

produção de biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10.

Casas e colaboradores (2000) observaram o contrario. Quando concentrações máximas de 1,144 g/L de NH_4NO_3 foram utilizadas observou-se aumento do crescimento celular e a partir disso ocorreu uma diminuição da biomassa com o aumento da concentração de nitrogênio.

A Tabela 3 apresenta os efeitos estimados para produção de biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10 em 24 horas de fermentação. Observa-se que os componentes que tiveram efeitos significativos foram a peptona e o extrato de malte. O extrato de levedura também apresentou efeito significativo (0,03) em 24 horas de fermentação, mas o seu efeito foi bem menor que o extrato de malte (0,21) e a peptona (0,13).

Tabela 3. Efeitos estimados para produção de biomassa em 24 horas da *Xanthomonas campestris* B-10 segundo o planejamento experimental executado.

Fator	Biomassa 24 horas	
	Efeito	S.E
Média	0,39*	0,01*
peptona (L)	0,13*	0,01*
peptona (Q)	-0,06	0,03
malte (L)	0,21*	0,01*
malte (Q)	-0,09*	0,03*
levedura (L)	0,03*	0,01*
levedura (Q)	0,07	0,04
sulfato (L)	0,02	0,01
sulfato (Q)	-0,01	0,04

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

O modelo de regressão obtido para a produção de biomassa pela *Xanthomonas campestris* B-10 em 24 horas está expresso na Equação 1. A análise de variância



(ANOVA) para o modelo de regressão está apresentada na Tabela 4.

$$\begin{aligned} \text{Biomassa (24 h)} = & -0,09 + 0,06 P \text{ (L)} \\ & - 7,60 \times 10^{-3} P^2 + 0,28 M \text{ (L)} - 4,5 \times 10^{-2} M^2 \\ & + 3,19 \times 10^{-3} P \times M \end{aligned} \quad (1)$$

A Tabela 4 apresenta a análise de variância para produção de biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10 em 24 horas de fermentação.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	0,29	14	0,02	29,12
Residual	0,01	12	0,00	
Total	0,30	26		
Coefficiente de correlação	0,97			
$F_{14,12}$ tabelado (95%)				2,63

Através da análise estatística foi possível observar que a equação 1 para o modelo de biomassa produzida foi estatisticamente significativa ao nível de 95% de confiança, pois o valor de F calculado (29,12) foi superior ao de F tabelado (2,63). Os resultados de biomassa no tempo de 24 horas apresentados na Tabela 2 foram analisados através de gráficos de superfície de resposta com o auxílio do *software Statistica 7.0* (Statsoft). A Figura 1 apresenta a superfície de resposta obtida para a modelagem da biomassa produzida em 24 horas (Eq. 1).

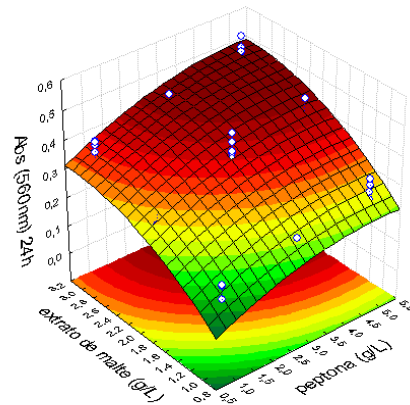


Figura 1. Superfície de resposta obtida para produção de biomassa em 24 horas (peptona e malte).

Conforme mostra a Figura 1 observa-se que o aumento da concentração de peptona combinado com quantidades altas de extrato de malte (3 g/L) atuando como fonte de nitrogênio influenciou positivamente o aumento da biomassa, porém, quando pequenas quantidades de peptona e extrato de malte são usadas há um decréscimo no crescimento da *Xanthomonas campestris* B-10.

A Tabela 5 que apresenta os efeitos estimados para produção de biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10 em 48 horas. O extrato de levedura e sulfato não apresentaram efeitos significativos em um intervalo de 95% de confiança. Os outros componentes do meio (peptona e malte) apresentaram efeitos significativos em um intervalo de 95% de confiança.

O modelo de regressão obtido para a produção de biomassa pela *Xanthomonas campestris* B-10 em 48 horas está expresso na Equação 2. A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão está apresentada na Tabela 6.



Tabela 5. Efeitos estimados para produção de biomassa em 48 horas da *Xanthomonas campestris* B-10 segundo o planejamento experimental realizado (Tabelas 1 e 4).

	Biomassa 48 horas	
Fator	Efeito	S.E
Média	0,38*	0,01*
peptona (L)	0,13*	0,02*
peptona (Q)	-0,02	0,05
malte (L)	0,22*	0,02*
malte (Q)	-0,03	0,05
levedura (L)	0,03	0,02
levedura (Q)	0,03	0,05
sulfato (L)	0,03	0,02
sulfato (Q)	0,00	0,05

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

$$\begin{aligned}
 \text{Biomassa (48 h)} &= -0,05 + 0,033 \\
 P(L) - 2,49 \times 10^{-3} P^2 &+ 0,21 M(L) - 1,70 \\
 \times 10^{-2} M^2 - 5,33 \times 10^{-3} &P \times M
 \end{aligned}
 \quad (2)$$

A Tabela 6 apresenta resultados para análise de variância (ANOVA) para produção de biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10 em 48 horas.

Tabela 6. Análise de variância para produção de biomassa em 48 horas segundo o planejamento experimental realizado (Tabelas 1 e 2).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	0,31	14	0,02	15,33
Residual	0,02	12	0,00	
Total	0,32	26		
Coefficiente de correlação	0,94			
$F_{14,12}$ tabelado (95%)				2,63

Através da análise de variância para biomassa foi possível observar que o modelo

para a produção de biomassa em 48 horas foi estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança, visto que, o F calculado (15,33) foi superior ao F tabelado (2,63).

Os resultados de produção de biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10 em 48 horas apresentados na Tabela 2 foram analisados através de gráficos de superfície de resposta com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft).

A Figura 2 apresenta a superfície de resposta obtida para produção de biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10 em 48 horas de fermentação variando concentrações de peptona e malte.

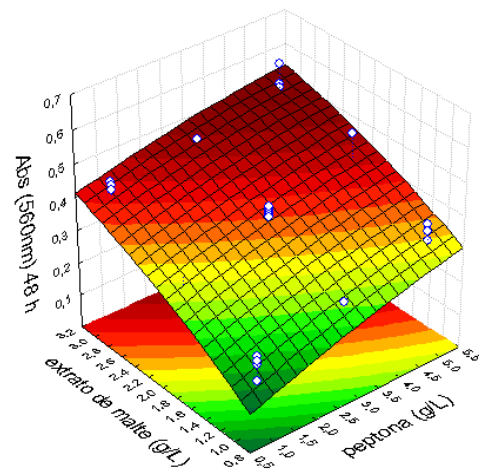


Figura 2. Superfície de resposta obtida para produção de biomassa em 48 horas – peptona e extrato de malte.

Conforme mostra a Figura 2 observa-se que elevadas concentrações de peptona combinada com altas concentrações de extrato de malte determinaram um aumento na produção de biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10. Quando concentrações máximas de peptona (5 g/L) e extrato de malte (3 g/L) foram empregadas resultaram em altas produções de biomassa.



A Tabela 7 que apresenta os efeitos estimados para produção de biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10 em 72 horas. O extrato de levedura e sulfato não apresentaram efeitos significativos em um intervalo de 95% de confiança. Os outros componentes do meio (peptona e malte) apresentaram efeitos significativos em um intervalo de 95% de confiança.

O modelo de regressão obtido para a produção de biomassa pela *Xanthomonas campestris* B-10 em 72 horas está expresso na equação 3. A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão está apresentada na Tabela 8.

Tabela 7. Efeitos estimados para produção de biomassa em 72 horas da *Xanthomonas campestris* B-10 segundo o planejamento experimental realizado (Tabelas 1 e 2).

	Biomassa 72 horas	
Fator	Efeito	S.E
Média	0,37*	0,01*
peptona (L)	0,13*	0,02*
peptona (Q)	-0,03	0,04
malte (L)	0,19*	0,02*
malte (Q)	-0,04	0,04
levedura (L)	0,02	0,02
levedura (Q)	0,01	0,05
sulfato (L)	0,03	0,02
sulfato (Q)	-0,02	0,05

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

O modelo de regressão obtido para a produção de biomassa pela *Xanthomonas campestris* B-10 em 72 horas está expresso na Equação 3. A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão está apresentada na Tabela 8.

$$\text{Biomassa (72 h)} = -0,17 + 0,05 P(L) - 3,46 \times 10^{-3} P^2 + 0,21 M(L) - 2,06 \times 10^{-2} M^2 - 6,58 \times 10^{-3} P \times M$$

(3)

Tabela 8. Análise de variância para produção de biomassa em 72 horas segundo o planejamento experimental realizado.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	0,25	14	0,02	14,54
Residual	0,01	12	0,00	
Total	0,27	26		
Coefficiente de correlação	0,94			
$F_{14,12}$ tabelado (95%)				2,63

Através da análise de variância para biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10 foi possível observar que o modelo para a produção de biomassa em 72 horas foi estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança, visto que, o F calculado (14,54) foi superior ao F tabelado (2,63).

Os resultados de produção de biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10 em período de 72 horas apresentados na Tabela 4 foram analisados através de gráficos de superfície de resposta com o auxílio do software *Statistica 7.0* (Statsoft).

A Figura 3 mostra a superfície de resposta para produção de biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10 em 72 horas e diversas concentrações de peptona e malte.

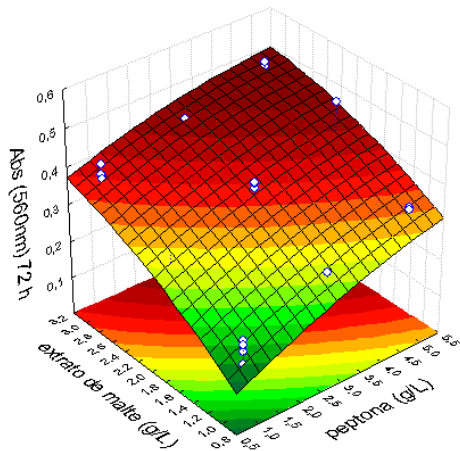


Figura 3. Superfície de resposta obtida para produção de biomassa em 72 horas (peptona e malte).

Conforme mostra a Figura 3 observa-se que elevadas concentrações de peptona combinada com altas concentrações de extrato de malte determinam um aumento na produção de biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10. Nota-se também que no tempo de 72 horas os valores de absorvância apresentaram decréscimos comparando com os experimentos realizados com 24 e 48 horas de fermentação.

Poucos estudos foram encontrados relacionados ao crescimento e as influências de suplementos nutricionais do meio de cultura para o aumento da biomassa de *Xanthomonas campestris*.

Muitos estudos nutricionais têm sido realizados a fim de alcançar qualidade e rentabilidade cada vez melhores da goma. Porém, tais estudos têm enfatizado e enfatizado, essencialmente, a fase de produção da goma xantana. Para obtenção de uma goma de qualidade, é imprescindível também focar a influência dos fatores nutricionais do meio de cultivo na fase de crescimento da *Xanthomonas campestris*, para produção do inóculo da fase de

produção da goma (Carignatto, Mustafé e Oliva-Neto, 2009).

4. CONCLUSÃO

Dentre as diversas fontes de nitrogênio analisadas a peptona e o extrato de malte apresentaram efeitos significativos para produção de biomassa obtendo-se os melhores resultados quando comparados a outras fontes estudadas (extrato de levedura e sulfato de amônio).

A melhor concentração utilizada no meio de cultura para produção de biomassa da *Xanthomonas campestris* B-10 foi de 5 g/L de peptona e 3 g/L de extrato de malte.

O melhor tempo de fermentação foi de 48 horas, após esse período as concentrações de biomassa já começaram a decrescer.

5. NOMENCLATURA

Onde:

M: Extrato de Malte (g/L)

P: Peptona (g/L)

6. REFERÊNCIAS

Cadmus, M. C.; Knutson, C. A.; Lagoda, A. A.; Pittsley, J. E.; Burton, K. A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 20, p. 1003-1014, 1978.

Carignatto, C. R.; Mustafé, K.; Neto, P. O. Influência da concentração da sacarose no crescimento da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e na qualidade da goma xantana. **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 2009.



Casas, J. A.; Santos, V. E.; García-Ochoa, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 282-291, 2000.

Galindo, E. Improved shake-flask test for the screening of xanthan producing microorganisms. **World Journal. Microbiology and Biotechnology** v.9, p.122– 4, 1993.

Garcia- Uchoa, F.; Santos, V. E., Casas, J.A.; Gómez, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**, v.8, p. 549-579, 2000.

Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Scmidell, W. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blucher., v.3, p. 125-154, 2001.

Lo, Y.; Yang, S.; Min, D. B. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 689-694, 1997.

Margaritis, A.; Pace, G. W. Microbial polysaccharides. In: Moo-Young, M. **Comprehensive Biotechnology**. Oxford: Pergamon Press, v.3, p. 1005-1041, 1985.

Maugeri, F. Produção de polissacarídeos. In: Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Scmidell, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo. Editora: Edgard Blücher Ltda., v.3, 2001.

Mesomo, M. C. **Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio a base de soro de queijo**. Dissertação de

Mestrado. Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. URI. 81 p, 2007.

Nitschke, M.; Rodrigues, V.; Schinatto, L. F. Formulação de meios de cultivo a base de soro de leite para produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* C7L. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v.21, p. 82-85, 2001.

Pace, G. W.; Righelato, R. C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**. V.15, p. 41-70, 1980.

Padilha, F. F. **Produção de biopolímeros sintetizados por microrganismos**. Tese de Doutorado – Departamento de Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2003.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e bolsa concedida.