



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL**

**DESACETILAÇÃO DE XANTANA: INFLUÊNCIA NO COMPORTAMENTO
REOLÓGICO**

ELLEN PORTO PINTO

Pelotas, 2005.

ELLEN PORTO PINTO

**DESACETILAÇÃO DE XANTANA: INFLUÊNCIA NO COMPORTAMENTO
REOLÓGICO**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Claire Tondo Vendruscolo

Co-Orientadora: Dr.^a Lígia Furlan

Pelotas, 2005.

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

P659d Pinto, Ellen Porto

Desacetilação de xantana: influência no comportamento reológico / Ellen Porto Pinto ; orientador Claire Tondo Vendruscolo ; co-orientador Lígia Furlan. – Pelotas, 2005. – 95f. ; il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Área de concentração: Microbiologia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2005.

1.Xantana. 2.*Xanthomonas campestris*. 3.Desacetilação.
4.Comportamento reológico. I.Vendruscolo, Claire Tondo.
II.Furlan, Lígia. III.Título.

CDD: 576.162

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Claire Tondo Vendruscolo

Dr.^a Lígia Furlan

Dr.^a Angelita da Silveira Moreira

Prof.^a Dr.^a Francine Ferreira Padilha

Dedico...

*Aos meus queridos pais, Egon e
Lourdes, pois sem eles nada seria
possível.*

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu força para superar as dificuldades e que mesmo nos momentos mais difíceis fez com que eu nunca desistisse.

Aos meus pais por todo amor, apoio e dedicação.

Aos meus familiares e amigos pelo carinho, amizade e incentivo.

Ao Thiago pelo amor e compreensão.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Dr.^a Claire Tondo Vendruscolo pelos ensinamentos e oportunidade concedidos para a realização do trabalho e ao longo do curso.

À Professora Dr.^a Lígia Furlan pela valiosa orientação, disponibilidade, atenção e apoio concedidos durante a execução e desenvolvimento do trabalho.

À Dr.^a Angelita da Silveira Moreira pelos conhecimentos transmitidos desde o início das minhas atividades no Laboratório de Biopolímeros.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Professor Dr. César Rombaldi pela disponibilização do espectrofotômetro e aos colegas do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos pelo auxílio na utilização do equipamento.

À Técnica de Laboratório Geneci pela colaboração prestada durante a realização do trabalho.

À Déia pelo carinho, amizade, atenção e auxílio; pois mesmo antes do nosso nascimento já compartilhávamos vários momentos e até hoje continuamos trilhando os mesmos caminhos.

Aos colegas do Centro de Biotecnologia, em especial aos amigos do Laboratório de Biopolímeros: Carol I, Bilica, Ruti, Sabrina, Timm, Clarice, Lu, Carol II e Rudah pela amizade, incentivo diário e cooperação.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Só acreditando chegamos lá”.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	11
Lista de Tabelas	13
Resumo	15
Introdução Geral.....	17
Hipótese	18
Objetivo Geral	18
Objetivos Específicos	18
Revisão de Literatura	19
1. Xantana.....	19
2. Produção de Xantana	20
3. Estrutura.....	21
4. Influência das Condições de Fermentação	23
5. Modificações da Xantana	25
6. Propriedades Reológicas da Xantana.....	28
7. Técnicas de Caracterização da Xantana.....	31
1º Artigo.....	36
Resumo	36
Abstract	37
1 Introdução	41
2 Material e Métodos.....	42
2.1 Biopolímero	42
2.2 Purificação do Biopolímero.....	42
2.3 Modificação Química.....	43
2.4 Determinação de Sódio e Potássio	43
2.5 Avaliação da Viscosidade	44
2.6 Determinação do Grau de Acetilação.....	44
2.7 Determinação do Grau de Piruvatação	45
2.8 Análise Espectroscópica no Infravermelho	46
2.9 Análise Estatística	46

3	Resultados e Discussão.....	47
3.1	Teores de Sódio e Potássio	47
3.2	Viscosidade	48
3.3	Grau de Acetilação.....	53
3.4	Grau de Acetilação vs Viscosidade	55
3.5	Grau de Piruvatação	57
3.6	Espectroscopia no Infravermelho	59
4	Conclusões	60
5	Referências	61
	2º Artigo.....	66
	Resumo.....	66
	Abstract	68
1	Introdução	67
2	Material e Métodos.....	68
2.1	Microrganismo.....	68
2.2	Produção do Biopolímero	68
2.3	Purificação do Biopolímero.....	69
2.4	Modificação Química.....	69
2.5	Determinação de Sódio e Potássio	70
2.6	Avaliação da Viscosidade	70
2.7	Determinação do Grau de Acetilação.....	71
2.8	Determinação do Grau de Piruvatação	72
2.9	Análise Espectroscópica no Infravermelho	72
2.10	Análise Estatística	73
3	Resultados e Discussão.....	73
3.1	Teores de Sódio e Potássio	73
3.2	Grau de Acetilação.....	74
3.3	Viscosidade	75
3.4	Grau de Acetilação vs Viscosidade	78
3.5	Grau de Piruvatação	80
3.6	Espectroscopia no Infravermelho	81
4	Conclusões	82
5	Referências	83
	Conclusões Gerais	89

Abstract	90
Referências	89

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura primária da xantana.....	24
FIGURA 2	Reação esquemática de desacetilação da xantana.....	28
FIGURA 3	Viscosidade (mPa.s) vs taxa de deformação (s^{-1}) das soluções aquosas a 1% (m/v) de xantana natural (dialisada e não dialisada) e submetida a diferentes condições de desacetilação.....	46
FIGURA 4	Viscosidade (mPa.s) vs taxa de deformação (s^{-1}) das soluções aquosas a 1% (m/v) de xantana desacetilada com concentração de solvente de $0,01\text{mol L}^{-1}$ (concentração de biopolímero de 0,5%) em diferentes tempos e temperaturas.....	51
FIGURA 5	Grau de acetilação (%) vs viscosidade (Pa.s) da xantana comercial, xantana comercial dialisada, xantana comercial dialisada desacetilada com concentração de $0,01\text{mol L}^{-1}$ dos diferentes álcalis e concentração de biopolímero 0,5 e 1%, a 25°C	54
FIGURA 6	Grau de acetilação (%) vs viscosidade (Pa.s) da xantana comercial dialisada desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio (concentração de biopolímero 0,5%) em 45 e 65°C por 3, 6, 9 e 12 horas.....	55
FIGURA 7	Espectros na região do infravermelho, em pastilha de KBr: xantana comercial dialisada, xantana desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio e xantana desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ hidróxido de sódio (concentração de biopolímero de 0,5%).....	58
FIGURA 8	Viscosidade (mPa.s) vs taxa de deformação (s^{-1}) dos biopolímeros desacetilados sintetizados pela <i>Xanthomonas campestris</i> pv pruni cepa 101.....	76
FIGURA 9	Viscosidade (mPa.s) vs taxa de deformação (s^{-1}) dos biopolímeros sintetizados pela <i>Xanthomonas campestris</i> pv pruni cepa 101	77

desacetilados com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio, a 25 e 45°C

- FIGURA 10 Grau de acetilação vs viscosidade da xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101, dialisada, desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de potássio, hidróxido de sódio e hidróxido de amônio..... 78
- FIGURA 11 Espectros na região do infravermelho, em pastilha de KBr: xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101 dialisada, desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio e desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ hidróxido de sódio..... 81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Teores de sódio e potássio (%) da xantana comercial, xantana comercial dialisada e xantana comercial dialisada desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio e concentração de biopolímero de 0,5%.....	45
TABELA 2	Viscosidade (mPa.s) a 25°C das soluções aquosas a 1% (m/v), das xantanas recuperadas das soluções de 0,5% e 1% após diferentes condições de desacetilação.....	47
TABELA 3	Viscosidade (mPa.s) a 25°C das soluções aquosas a 1% (m/v) da xantana desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ do álcali e concentração de biopolímero de 0,5%.....	49
TABELA 4	Viscosidade (mPa.s) a 25°C das soluções aquosas a 1% (m/v) da xantana desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio e concentração de biopolímero de 0,5% em diferentes tempos e temperaturas de reação.....	50
TABELA 5	Teores de grupos acetil (%) da xantana comercial, xantana comercial dialisada e xantana comercial dialisada desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio e concentração de biopolímero de 0,5 e 1%.....	52
TABELA 6	Teores de grupos acetil (%) da xantana comercial dialisada desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio e concentração de biopolímero de 0,5% em diferentes tempos e temperaturas de reação.....	53
TABELA 7	Teores de grupos piruvato (%) da xantana comercial, xantana comercial dialisada e xantana comercial dialisada desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio e concentração de biopolímero de 0,5 e 1%, a 25°C	56
TABELA 8	Teores de grupos piruvato (%) da xantana comercial dialisada	

	desacetilada com 0,01mol L ⁻¹ hidróxido de amônio e concentração de biopolímero de 0,5% em diferentes tempos e temperaturas de reação.....	56
TABELA 9	Teores de sódio e potássio (%) da xantana sintetizada pela <i>Xanthomonas campestris</i> pv pruni cepa 101, dialisada e desacetilada com 0,01mol L ⁻¹ de hidróxido de amônio e concentração de biopolímero de 0,5%.....	73
TABELA 10	Teor de grupos acetil (%) da xantana sintetizada pela <i>Xanthomonas campestris</i> cepa 101, dialisada e desacetilada com 0,01mol L ⁻¹ de álcalis e concentração de biopolímero de 0,5%.....	77
TABELA 11	Viscosidade (mPa.s) a 25°C da solução aquosa a 1% (m/v) da xantana sintetizada pela <i>Xanthomonas campestris</i> pv pruni cepa 101, dialisada e desacetilada com 0,01mol L ⁻¹ de álcalis e concentração de biopolímero de 0,5%, a 25 e 45°C.....	74
TABELA 12	Teor de grupos piruvato (%) da xantana sintetizada pela <i>Xanthomonas campestris</i> cepa 101, dialisada e desacetilada com 0,01mol L ⁻¹ de álcalis e concentração de biopolímero de 0,5%.....	79

RESUMO

PINTO, Ellen P. **Desacetilação de xantana: influência no comportamento reológico**. 2005. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Reações químicas podem ser efetuadas para remoção dos grupos acetil da cadeia lateral da molécula da xantana. Esta mudança estrutural do biopolímero pode ser conseguida através da reação de desacetilação, tornando-se uma opção para potencializar seu comportamento reológico. Primeiramente, a fim de adequar um método para remoção dos grupos acetil, utilizou-se uma xantana comercial; estudou-se a influência dos parâmetros de reação sobre o teor de acetilação e qualidade do biopolímero resultante. As reações de desacetilação foram conduzidas com variação dos parâmetros: concentrações do biopolímero e álcalis, tempo e temperatura. Foram efetuadas análises dos teores de sódio e potássio, do grau de acetilação e piruvatação, da viscosidade e espectroscopia no infravermelho das amostras. Observou-se que a purificação do biopolímero pela técnica de diálise propiciou uma remoção parcial dos íons sódio e potássio e que estes íons influenciam na viscosidade da xantana. A propriedade de pseudoplasticidade foi mantida após a modificação química do biopolímero. A viscosidade da xantana aumentou com o incremento da concentração de álcali empregada na reação de desacetilação, exceto quando foi empregado hidróxido de potássio. A concentração do biopolímero utilizada para efetuar a reação de desacetilação praticamente não influenciou na viscosidade das soluções. As maiores viscosidades (680 e 910 mPa.s a 10s^{-1}) foram observadas utilizando a base fraca hidróxido de amônio nas concentrações de 0,005 e 0,01 mol L⁻¹, respectivamente; sendo superior a xantana comercial adicionada de sais (430 mPa.s a 10s^{-1}). O grau de acetilação e a viscosidade da xantana diminuíram na medida em que se utilizou uma base mais forte (0,01 mol L⁻¹) e maior tempo (12 horas) e temperatura (65°C) na reação de desacetilação. O grau de piruvatação da xantana modificada quimicamente não variou, conseqüentemente, não está relacionado à viscosidade nas condições testadas. A xantana comercial desacetilada apresentou viscosidade 53% superior a xantana adicionada de sais com a utilização dos seguintes parâmetros de reação: 0,5 e 1% de biopolímero, 0,01 mol L⁻¹ de hidróxido de amônio, 25°C por 3 horas. No entanto, a remoção de grupos acetil maior que 10% proporciona um decréscimo de 55% da viscosidade. Os melhores parâmetros selecionados na primeira etapa foram utilizados para estudar a influência da desacetilação nas propriedades da xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 101, efetuando as mesmas análises. A purificação do biopolímero propiciou uma remoção parcial dos íons sódio e potássio. A maior viscosidade (1170 mPa.s a 10s^{-1}) foi observada com a utilização de hidróxido de amônio decrescendo à medida que foi empregado hidróxido de potássio

(591mPa.s a 10s^{-1}) e sódio (490mPa.s a 10s^{-1}). Verificou-se que a viscosidade praticamente manteve-se constante quando a temperatura de reação aumentou de 25°C para 45°C, contudo, o teor de grupos acetil decresceu. O emprego de hidróxido de amônio na reação de desacetilação proporciona uma melhoria de 24% na viscosidade da xantana, no entanto, a remoção de grupos acetil é mais eficiente com a utilização de hidróxido de sódio obtendo-se uma redução de 81% destes grupos. O grau de piruvatação da xantana não variou e, conseqüentemente, não influenciou na viscosidade das xantanas desacetiladas. Os parâmetros de reação ideais para a xantana comercial também foram adequados para a xantana produzida pelo patovar pruni cepa 101, proporcionando a obtenção de um biopolímero desacetilado com qualidade reológica.

Palavras-chave: Xantana. Desacetilação. Comportamento Reológico.

INTRODUÇÃO GERAL

Biopolímeros microbianos são uma fonte potencial de polissacarídeos com notáveis e diferenciadas propriedades. A xantana é um heteropolissacarídeo biossintetizado por bactérias do gênero *Xanthomonas* durante processo fermentativo. A maioria de suas aplicações é originária dos benefícios funcionais que proporciona, e esta funcionalidade é consequência direta de sua singular estrutura molecular.

Sua utilização industrial está baseada nas suas características físicas, ou seja, na sua habilidade de alterar as propriedades básicas da água e na sua capacidade de espessamento, estabilização, emulsificação, suspensão e gelificação quando associada com outros polissacarídeos (MANRESA et al., 1987). Soluções de xantana possuem alta viscosidade em baixas concentrações, boa estabilidade em uma ampla faixa de temperatura, pH e concentração de sais (ROCKS, 1971; COTTRELL; KANG, 1978). Por estas razões a xantana tem sido bastante empregada na indústria alimentícia, petrolífera, farmacêutica, cosmética, têxtil, de papéis e tintas (SUTHERLAND, 1993).

A produção de novos polissacarídeos através de processos biotecnológicos envolve altos custos com programas de triagem de cepas e com a adequação do sistema de produção. Portanto, a busca por novos compostos pode ser dificultada pelo tempo necessário e infinidade de testes que devem ser aplicados, já que a qualidade depende da genética e das condições operacionais utilizadas. Assim, uma alternativa viável seria a modificação pela ação química da estrutura molecular dos compostos existentes, a fim de obter-se materiais com novas propriedades e usos diferenciados.

Reações químicas podem ser efetuadas para remoção dos grupos acetil e piruvato da cadeia lateral da molécula da xantana. Segundo alguns autores, a proporção destes substituintes influencia nas propriedades reológicas do biopolímero (SLONEKER; JEANES, 1962; SANDFORD et al., 1977; SMITH; PACE, 1981; CHEETHAM; NORMA, 1989; TAKO; NAKAMURA, 1984).

A desacetilação é uma reação de hidrólise alcalina que remove os grupos acetil presentes na cadeia lateral da xantana. Esta mudança estrutural é realizada no biopolímero após sua obtenção, ou seja, no produto final. Esta modificação pode ser uma opção para potencializar suas características reológicas, ou ainda ser utilizada em estudos de sinergismo e “crosslinking” com outros polissacarídeos, estabelecendo novas aplicações para este biopolímero.

HIPÓTESE

Mudança química por desacetilação da xantana potencializa suas propriedades reológicas.

OBJETIVO GERAL

Avaliar os parâmetros de reação para a desacetilação de uma xantana comercial, proveniente do patovar campestris, e a sintetizada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da temperatura, tempo de reação, concentrações dos biopolímeros e álcalis na reação de desacetilação;
- Estudar a influência na viscosidade dos íons sódio e potássio presentes na xantana comercial, xantana sintetizada pela cepa 101 e desacetiladas;
- Avaliar a viscosidade dos biopolímeros;
- Determinar os teores de acetil e piruvato dos biopolímeros;
- Analisar pela técnica de espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho os biopolímeros desacetilados.

REVISÃO DE LITERATURA

1. XANTANA

Polissacarídeos são macromoléculas naturais formadas pela polimerização de monossacarídeos ou seus derivados, unidos por ligações glicosídicas. São substâncias de alto peso molecular, que durante a biossíntese, apresentam maior facilidade de combinações possíveis. Isto permite a formação de ramificações com diversos tipos de monossacarídeos com diferentes configurações (BOBBIO, F.; BOBBIO, P., 1992).

Estes compostos podem ser provenientes de plantas aquáticas (ágar, alginato e carragena); de plantas terrestres, oriundos da própria estrutura (celulose, pectina e amido), das sementes (goma guar e locusta), de exudatos (goma arábica, karaya e tragacante); e de microrganismos (xantana, dextrana e gelana) os quais são conhecidos como biopolímeros (BOBBIO, P.; BOBBIO, F., 1992).

Polissacarídeos microbianos podem ser homopolissacarídeos, compostos por um único monossacarídeo, ou heteropolissacarídeos, quando sua estrutura contiver diferentes monossacarídeos. Além dos carboidratos, muitos polissacarídeos deste tipo ainda podem conter substituintes orgânicos e inorgânicos como componentes de sua estrutura (SUTHERLAND, 1994).

A produção de biopolímeros para o uso comercial por fermentação, comparada com a extração de gomas de plantas superiores e algas, bem como os polímeros sintéticos, oferece vantagens que incluem: a ampla diversidade de biopolímeros produzidos por microrganismos; a produção, em quantidade e com alta qualidade, independente das condições climáticas, conduzidas por fermentações bem controladas e utilizando matéria-prima de qualidade constante; manipulação da composição do produto e suas propriedades através de alterações nas condições de fermentação (PACE; RIGHELATO, 1981).

A habilidade de sintetizar polissacarídeos é amplamente encontrada entre espécies microbianas. Microrganismos como bactérias e fungos são capazes de produzir três tipos de carboidratos poliméricos quanto à localização morfológica: polissacarídeos extracelulares, que podem ser encontrados como uma cápsula que envolve a célula microbiana (capsulares) ou como uma massa amorfa secretada para o meio externo (livres); polissacarídeos estruturais, que fazem parte da parede celular; ou polissacarídeos intracelulares (SUTHERLAND, 1982).

Bactérias do gênero *Xanthomonas* pertencem à família *Pseudomonaceae*, apresentam-se como bastonetes retos e isolados, móveis por flagelo único polar, gram negativas e estritamente aeróbias. Os microrganismos deste gênero são fitopatogênicos, com exceção da *Xanthomonas maltophilia*.

Este gênero de bactérias é capaz de produzir polissacarídeos, embora algumas espécies o façam mais eficientemente como a *X. fragariae*, *X. oryzae* e *X. campestris*. Entre esta última espécie citada destacam-se os patovares pruni, phaseoli, malvacearum, carotae, citrumelo e juglandis (HAYWARD, 1993).

Xantana foi à denominação dada ao heteropolissacarídeo extracelular livre, produzido durante o processo de fermentação aeróbia de bactérias do gênero *Xanthomonas* (LILLY, 1958).

2. PRODUÇÃO DE XANTANA

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 seu desenvolvimento na etapa seguinte (CADMUS et al., 1978; GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

O processo de fermentação pode ser realizado utilizando substratos sólidos ou em meio líquido. A fermentação líquida em cultivo submerso é a mais comumente utilizada por ser de fácil controle, possibilidade de variação do meio de cultivo, fácil esterilização do meio, aeração estéril menos dispendiosa e a superfície bacteriana fica inteiramente exposta ao meio facilitando as trocas metabólicas (REGULY, 2000).

Este tipo de processo pode ser efetuado de maneira descontínua ou contínua. No procedimento descontínuo ou em batelada o cultivo de bactérias é

adicionado a um meio contendo os substratos necessários ao desenvolvimento do microrganismo e são fornecidas as condições ideais para que as reações aconteçam. No momento em que a concentração do produto atinge o valor máximo o processo é terminado. Em escala laboratorial este método pode ser realizado em agitadores orbitais ou em bioreatores. Nos agitadores orbitais apenas pode-se controlar a temperatura, o tempo e a agitação do processo fermentativo, enquanto que em bioreatores o controle é mais rigoroso sendo possível monitorar outros parâmetros como pH e a concentração de oxigênio dissolvido. Ao passo que no sistema contínuo, a operação é realizada adicionando-se continuamente o meio esterilizado que contém o substrato, enquanto os produtos de reação são removidos sem a interrupção do processo.

A fermentação contínua fornece vantagens, em relação à técnica em batelada, pois proporciona alta produtividade, o biopolímero formado pode ser obtido sob condições fisiológicas altamente padronizadas e conseqüentemente pode apresentar características físicas e químicas mais uniformes. Problemas com a agitação, que muitas vezes, durante o processo pode ser insuficiente e com a manutenção da esterilidade do sistema, podem ser citados como desvantagem (SUTHERLAND, 1990).

O caldo resultante da fermentação contém o biopolímero, células, residual de nutrientes e outros metabólitos (GARCÍA-OCHOA; CASAS; MOHEDANO, 1993). O método específico de purificação a ser utilizado é determinado pelo uso final do polissacarídeo. As principais etapas do processo de recuperação são a remoção das células microbianas, precipitação do biopolímero, secagem e moagem (GALINDO, 1994). Nas formulações comerciais de xantana muitas vezes são adicionados sais, predominantemente sais de potássio, mas também podem ser utilizados sais de cálcio e sódio na forma de cloretos, para facilitar a solubilização, aumentar a viscosidade e manter a estabilidade (JEANES; PITTSLEY; SENTI, 1961; MORRIS, 1996).

3. ESTRUTURA

A xantana produzida pela *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, patovar utilizado industrialmente, apresenta uma estrutura primária composta de repetidas

unidades pentassacarídicas, formada por unidades de glicose, manose e ácido glicurônico, na proporção 2,8:3,0:2,0, além dos grupos acetil e piruvato (SLONECKER; JEANES, 1962).

A cadeia principal da xantana consiste de unidades de β -D-glicose ligadas na posição 1 e 4, que conferem rigidez à molécula. A estrutura química da cadeia principal é idêntica à da celulose. A cadeia lateral é composta de β -D-manose-(1 \rightarrow 4)- β -D-ácido glicurônico-(1 \rightarrow 2)- α -D-manose, ligados ao carbono 3 dos resíduos de glicose da cadeia principal. A unidade terminal de β -D-manose pode apresentar resíduos de ácido pirúvico ligados nas posições 4 e 6. O grupo acetil pode estar ligado na posição 6 da unidade de α -D-manose (JANSSON; KEENE; LINDBERG, 1975; MELTON et al., 1976). Algumas manoses externas podem conter ainda um segundo grupo acetil, como está ilustrado na Figura 1 (STANKOWSKI; MUELLER; ZELLER, 1993). Estes substituintes podem estar ligados em variáveis proporções à cadeia lateral, dependendo da cepa, das condições de crescimento bacteriano e dos parâmetros que são empregados no processo de produção deste biopolímero (CADMUS et al., 1976). Esta variação do grau de substituição tem sido explicada pela baixa estabilidade química relativa de ambos os substituintes (DENTINI; CRESCENZI; BLASI, 1984). As cadeias laterais conferem solubilidade em meio aquoso (SUTHERLAND, 1994, 2001) e juntamente com os ácidos pirúvico e acético concedem ionicidade a xantana, que além de aumentar a solubilidade também estão relacionadas à conformação molecular (SHATWELL et al., 1990; SHATWELL e SUTHERLAND, 1991).

A estrutura secundária da xantana tem sido investigada e dois modelos, hélice simples e hélice dupla, são atribuídos para sua conformação em solução. Morris (1977) propôs que a xantana em solução existia como uma estrutura ordenada de hélice simples e que a cadeia lateral permanecia dobrada ao longo da cadeia principal, tornado-se uma molécula linear rígida. No entanto, Stokke, Elgsaeter e Smidsrod (1986), em seus estudos, sugeriram que a estrutura da xantana apresentava-se como uma hélice dupla.

A molécula de xantana pode exibir uma conformação ordenada ou desordenada em solução. Estudos têm demonstrado a existência de uma transição da estrutura ordenada para desordenada, e isto ocorre por mudanças no pH, força iônica e temperatura (MORRIS, 1995). Os grupos acetil e piruvato da molécula do

operacionais podem ocasionar variações na estrutura molecular do biopolímero sintetizado.

As espécies e patovares da bactéria utilizados no processo de fermentação influenciam na composição do biopolímero formado. Slonecker e Jeanes (1962) reportaram que a xantana comercial sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv *campestris* é composta de glicose, manose, ácido glicurônico, grupos acetil e piruvato. Lawson e Symes (1977) relataram a presença de ramnose e xilose nos polissacarídeos produzidos pelo patovar *juglandis* e *phaseoli*, respectivamente. A xantana sintetizada pelo patovar *pruni* apresenta o monossacarídeo ramnose em sua composição (SOUZA; VENDRUSCOLO, 1999).

Uma ampla variação no grau de piruvatação e acetilação de amostras de xantana tem sido observada, quando numerosas cepas de *Xanthomonas* são utilizadas para a produção do biopolímero (SUTHERLAND, 1981). Variações na composição da xantana ocorrem em produtos provenientes de certas cepas mutantes em que as cadeias laterais foram eliminadas (TAIT; SUTHERLAND, 1989).

A manutenção da cultura é importante para a estabilidade do processo de produção de xantana. Entretanto, quando variações no tamanho das colônias da bactéria ocorrem, são notadas mudanças no nível de substituição do grupo piruvato na molécula do biopolímero (CADMUS et al., 1978).

O meio padrão para a produção de xantana contém fontes de carbono, nitrogênio, íons fosfato, magnésio e elementos traços. Variações na composição deste meio influenciam na estrutura do biopolímero produzido. Davidson (1978) relatou maior substituição de grupos piruvato e menor conteúdo de acetil quando a fonte de nitrogênio foi um nutriente limitante, porém Kennedy et al. (1982) descreveram um aumento no grau de piruvatação quando a concentração de nitrogênio foi aumentada. No entanto, nenhuma relação foi encontrada entre o grau de piruvatação e a composição do meio por Trilsbach e seus colaboradores (1984).

A temperatura na qual a xantana é produzida tem significativo impacto na sua estrutura. Cadmus et al. (1978) e Shu e Yang (1990) concordaram que um máximo de conteúdo de piruvato é obtido cultivando a bactéria a 27°C. No entanto, o conteúdo de acetil e piruvato diminuiu levemente quando ocorreu um aumento na temperatura de cultivo (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; CASAS; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000).

Diferentes autores têm estudado o efeito do tempo de fermentação na estrutura molecular da xantana. Tait, Sutherland e Clarke-Sturman (1986), Casas, Santos e García-Ochoa (2000) e García-Ochoa et al. (2000) descreveram que a concentração de acetil aumenta com o tempo de fermentação. Entretanto, o efeito sobre o grau de piruvatação não está esclarecido o suficiente. Holzwarth (1979), Flores, Torres e Galindo (1994), Casas, Santos e García-Ochoa (2000) e García-Ochoa et al. (2000) apontaram um aumento da concentração de piruvato com o tempo, embora outros autores não tenham observado nenhuma mudança (TRILSBACH et al., 1984; TAIT; SUTHERLAND; CLARKE-STURMAN, 1986).

O peso molecular do biopolímero também é afetado por mudanças nas condições operacionais. Este aumenta na ausência de limitação de oxigênio (PETERS et al., 1993; FLORES; TORRES; GALINDO, 1994) e com o tempo na fermentação descontínua (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; CASAS; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000).

5. MODIFICAÇÕES DA XANTANA

Além das mudanças que podem ocorrer com a estrutura do polissacarídeo durante seu processo de obtenção, modificações genéticas e químicas podem ser efetuadas para o melhoramento das propriedades da xantana.

Métodos genéticos comuns podem ser utilizados na bactéria *Xanthomonas* para modificação de sua rota biossintética, ou ainda, os substituintes da cadeia lateral podem ser geneticamente controlados para a produção de polissacarídeos com propriedades diferenciadas (BETLACH et al., 1987). Cepas mutantes produtoras de xantana sem ácido glicurônico e grupos piruvato podem ser construídas, bem como, com alto conteúdo de piruvato. A xantana em que o grupo piruvato foi aumentado possui uma alta viscosidade em baixas concentrações (SANDFORD et al. 1977), além de sua maior tolerância a elevados níveis de sais (PHILLIPS et al., 1985).

Hassler e Doherty (1990), relataram que dois genes são responsáveis pela acetilação dos resíduos de manose interna, e que tanto a manose interna como a externa pode ser acetilada. Na xantana comercial, os resíduos de manose externa que não são piruvatados podem ser acetilados (STANKOWSKI; MUELLER;

ZELLER, 1993). A acetilação diminui a viscosidade da xantana (HASSLER; DOHERTY, 1990), e o máximo de viscosidade pode ser conseguido pelo bloqueio da acetilação e aumento da piruvatação (HARDING; CLEARY; IELPI, 1994).

Técnicas de engenharia genética estão sendo empregadas para desenvolver polissacarídeos baseados na xantana. Polissacarídeos com unidades trissacarídicas que não possuem o ácido glicurônico em sua estrutura, exibem propriedades únicas como alta viscosidade em relação a xantana sem modificação. Polissacarídeos com unidades tetrassacarídicas isentos dos resíduos de manose terminais, apresentam baixa viscosidade quando comparados com a xantana produzida por cepas não modificadas, e similar viscosidade a xantana não piruvatada (VANDERSLICE et al., 1989).

Outra alternativa para o melhoramento das propriedades da xantana é modificar a sua estrutura quimicamente. Potenciais modificações incluem oxidação e redução, mudando seus substituintes, alterando a cadeia lateral do polissacarídeo, ou transferindo outras moléculas para a estrutura do biopolímero (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002).

Os grupos acetil e piruvato podem ser eliminados da cadeia lateral da xantana através de reações químicas. O grupo piruvato pode ser facilmente removido submetendo o biopolímero a um meio ácido; normalmente utiliza-se ácido oxálico (HOLZWARTH; OGLETREE, 1979) ou ácido trifluoroacético (BRADSHAW et al., 1983) em temperatura elevada. No entanto, o grupo acetil é retirado da molécula da xantana em meio básico (JEANES, 1974), onde é comum utilizar hidróxido de sódio (DENTINI; CRESCENZI; BLASI, 1984), hidróxido de amônio (SHATWELL et al., 1990) ou hidróxido de potássio (SLONECKER; JEANES, 1962) através de métodos bastante variados.

A reação de desacetilação consiste em uma hidrólise alcalina, onde o grupo éster que está ligado à α -D-manose da cadeia lateral da xantana é deslocado pelo álcali havendo formação de sal e álcool (MORRISON, 1996), como está ilustrado na Figura 2.

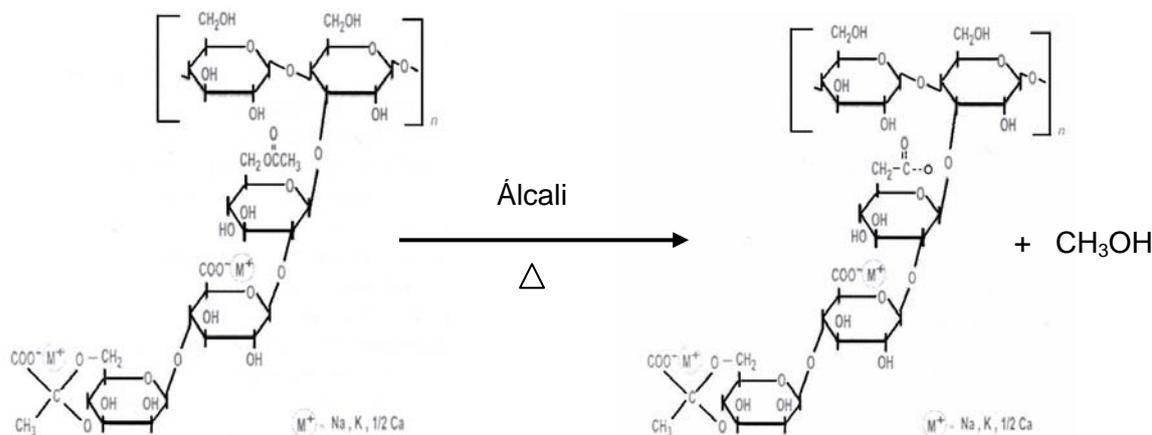


FIGURA 2 - Reação esquemática de desacetilação da xantana.

Fonte: AUTOR.

Muitos estudos estão sendo feitos com xantana modificada quimicamente por desacetilação, com relação à influência nas suas propriedades e seu sinergismo com outros polímeros. A xantana interage com galactomananas, como goma locusta e guar, para formar soluções com viscosidade expressivamente maior do que a esperada para os polímeros individualmente (ROCKS, 1971). A remoção química do grupo acetil da molécula da xantana aumenta o sinergismo com estes polímeros, pois o grupo acetil contribui para associação intramolecular e a cadeia lateral torna-se mais flexível depois da desacetilação favorecendo a interação entre gomas (TAKO; NAKAMURA, 1984, 1985).

No entanto, a influência dos grupos acetil na viscosidade da xantana ainda não está bem esclarecida. Relatos da literatura demonstram que a viscosidade da xantana pode ser melhorada através da remoção destes grupos (SLONECKER; JEANES, 1962; TAKO; NAKAMURA, 1984), no entanto, outros não verificam nenhum efeito nas propriedades reológicas do biopolímero (BRADSHAW et al., 1983; CALLET; MILAS, RINAUDO, 1987; SHATWELL et al., 1990; SUTHERLAND; TAIT, 1992).

6. PROPRIEDADES REOLÓGICAS DA XANTANA

Reologia é a ciência que estuda o fluxo e a deformação da matéria; para este estudo são aplicadas tensões ou deformações no material e são analisadas as suas respostas. A deformação é a medida da mudança de forma de um corpo (BRETAS; SCURACCHIO, 2003). A propriedade reológica de interesse nos sólidos é a sua elasticidade, e no caso dos líquidos é a sua viscosidade. Contudo, existem materiais que não podem ser diferenciados facilmente em sólidos ou líquidos, e nestes casos sua propriedade é a viscoelasticidade (SHAW, 1975).

Viscosidade é a capacidade do fluido de resistir ao escoamento, tal resistência é causada pelo atrito interno das partículas (NAVARRO, 1997). A viscosidade de uma solução polimérica é uma função do tamanho, forma e conformação que adotam suas moléculas no solvente. Assim sendo, soluções de biopolímeros são dispersões ou agregados de moléculas hidratadas, e seu comportamento reológico é determinado pelo tamanho, forma, facilidade de deformação ou flexibilidade, e presença e magnitude das cargas elétricas nessas moléculas hidratadas ou agregados (BEMILLER; WHISTLER, 1996).

6.1 Influência da Taxa de Cisalhamento, Temperatura, Pressão e Tempo

A viscosidade dos biopolímeros pode ser significativamente afetada por variáveis como a taxa de cisalhamento, temperatura, pressão e tempo de aplicação do cisalhamento. Os fluidos podem ser newtonianos, ou seja, dependentes da temperatura e pressão; ou não-newtonianos, os quais são dependentes do cisalhamento aplicado e do tempo de sua aplicação (RAO, 1977). As soluções de xantana são não-newtonianas e pseudoplásticas (ROCKS, 1971), fenômeno que é caracterizado pela diminuição da viscosidade à medida que aumenta a taxa de deformação aplicada ao sistema.

Esta característica da xantana facilita, por exemplo, operações de bombeamento durante a produção de um alimento e faz com que produtos como coberturas para salada fluam com facilidade das embalagens. A pseudoplasticidade aumenta as qualidades sensoriais realçando o sabor e a sensação bucal percebida durante a ingestão de um alimento (KATZBAUER, 1998). A xantana exhibe

viscosidade baixa em taxas de cisalhamento entre 50 e 200s⁻¹, valores equivalentes à mastigação, fazendo com que o produto alimentício pareça menos viscoso ao paladar e o sabor seja mais bem percebido (CHALLEN, 1994).

6.2 Influência dos Grupos Acetil e Piruvato

Como o conteúdo de acetil e piruvato presente na cadeia lateral da xantana é variável conforme os parâmetros utilizados durante seu processo de produção, inúmeras pesquisas têm sido realizadas com relação à influência destes grupos na viscosidade da xantana.

Alguns estudos são compatíveis com a hipótese de que os grupos acetil e piruvato melhoram a viscosidade da xantana. Segundo Slonecker e Jeanes (1962) a remoção dos grupos acetil da xantana sintetizado pela *Xanthomonas campestris* pv *campestris* cepa NRRL B-1459 promove um melhoramento das suas propriedades físicas; por exemplo, o incremento de sua viscosidade na presença de sais. Sandford et al. (1977) analisaram amostras de xantana procedentes de diferentes cepas de *Xanthomonas campestris* com diversos graus de piruvatação, onde concluíram que as xantanas com alto conteúdo de piruvato (4,0-4,8%) são mais viscosas do que as com baixo conteúdo (2,5-3,0%), especialmente na presença de sais. Smith e Pace (1981) examinaram xantana comercial com variados teores de piruvato, provenientes de diferentes empresas, e verificaram que um alto teor de piruvato proporcionou um aumento na viscosidade quando cloreto de potássio foi adicionado nas soluções isentas de sais. Cheetham e Norma (1989) modificaram quimicamente uma amostra de xantana comercial através da remoção dos grupos piruvato e confirmaram as observações feitas por Smith e seus colaboradores. Tako e Nakamura (1984) removeram os grupos acetil de uma amostra de xantana comercial comparando o biopolímero natural e o desacetilado, onde observaram que o material desacetilado apresentou uma alta viscoelasticidade em altas concentrações. No entanto, a viscoelasticidade da xantana desacetilada decresceu com o aumento da temperatura.

Em contraste com estes relatos, Bradshaw et al. (1983) prepararam xantana com vários conteúdos de acetil e piruvato oriundos de uma única xantana comercial, e demonstraram que não houve mudança de viscosidade entre as diferentes

amostras analisadas. Callet, Milas e Rinaudo (1987) avaliaram soluções de xantana modificada quimicamente através da remoção parcial dos grupos piruvato e acetil, onde verificaram que estes substituintes não afetaram a viscosidade das soluções. Igualmente, amostras de xantana provenientes de diferentes cepas de *Xanthomonas campestris* com vários graus de acetilação mostraram viscosidades similares (SHATWELL et al., 1990; SUTHERLAND; TAIT, 1992).

6.3 Influência da Adição de Sais e Mudanças de pH

Os sais influenciam na viscosidade das soluções aquosas de xantana. Segundo Jeanes, Pittsley e Senti (1961), a adição de 0,1% de cloreto de sódio ou cloreto de potássio aumenta a viscosidade das soluções aquosas de xantana em concentrações de biopolímero entre 0,2% e 0,5%. Isto é resultado da estabilização da estrutura ordenada da xantana pelo aumento da associação intermolecular. No entanto, concentrações de biopolímero abaixo de 0,2%, a adição de sais causa leve diminuição na viscosidade. Rocks (1971) relatou que soluções contendo 0,5% de xantana têm a viscosidade aumentada com a adição de traços de sais. Este comportamento também foi verificado por Smith e Pace (1982), que atribuíram este efeito à redução das dimensões moleculares resultando na diminuição das forças eletrostáticas.

Muitos biopolímeros apresentam mudanças na viscosidade da solução quando o pH é alterado. Entretanto, a viscosidade das soluções de xantana não é influenciada por mudanças de pH entre 1 e 11, na presença de 0,1% de cloreto de sódio (MORRIS, 1984).

6.3 Influência da Temperatura e Concentração do Biopolímero

Soluções de polissacarídeos exibem uma acentuada diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura, no entanto, a xantana adicionada de sais pode manter sua estrutura ordenada e sua viscosidade até cerca de 100°C. Além disso, soluções de xantana que não contém sais mostram um aumento anômalo da viscosidade durante o aquecimento, antes do esperado decréscimo

(JEANES; PITTSLEY; SENTI, 1961). García-Ochoa et al. (2000) constataram que a viscosidade das soluções de xantana depende da temperatura na qual a viscosidade foi mensurada, onde ocorre uma diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura; e da temperatura de dissolução da amostra, que apresenta um comportamento diferenciado. A viscosidade diminui com o aumento de temperatura até 40°C, entre 40 e 60°C um aumento é observado, e acima de 60°C ocorre novamente um declínio da viscosidade. Isto pode ser explicado pelas mudanças conformacionais na molécula da xantana, que muda de uma forma ordenada (em baixa temperatura de dissolução) para um estado desordenado (em alta temperatura de dissolução) (MORRIS, 1977; MILAS; RINAUDO; TINLAND, 1979; GARCÍA-OCHOA; CASAS, 1994).

As soluções de xantana são altamente viscosas mesmo em baixas concentrações (ROCKS, 1971). Segundo García-Ochoa et al. (2000), a viscosidade das soluções de xantana aumenta com a concentração do biopolímero. Atribui-se este comportamento a interação molecular, aumentando a dimensão efetiva da macromolécula e o peso molecular.

7. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DA XANTANA

Para caracterizar o biopolímero xantana diferentes parâmetros devem ser levados em consideração, como a estrutura química, conteúdo de acetil e piruvato, peso molecular, estrutura secundária e comportamento reológico (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002).

O grupo acetil é um componente estrutural do polissacarídeo sintetizado por bactérias do gênero *Xanthomonas* e sua proporção na cadeia polimérica influencia nas propriedades do biopolímero. Diferentes técnicas podem ser utilizadas para mensurar acetil em xantana, como titulação, método do ácido hidroxâmico e espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho. No método de titulação a xantana deve ser previamente hidrolisada sobre condições alcalinas. O conteúdo de acetil é determinado pela titulação do produto hidrolisado com o ácido resultando em ácido acético. O conteúdo de acetil é igual à proporção entre a quantidade de álcali utilizado para neutralizar o ácido acético formado e o número de unidades monoméricas pentassacarídicas (SLONEKER; JEANES, 1962; RINAUDO et al.,

1983). Qualquer material ácido presente que possa reagir com o álcali pode interferir no método. O grupo piruvato pode se decompor sobre condições ácidas produzindo ácido acético, resultando em uma interferência positiva (TAYLOR; NASR-EL-DIN, 1993).

A reação entre ésteres e hidroxilamina produzindo ácido hidroxâmico tem sido aplicada com sucesso para análise de muitos tipos de ésteres. A reação entre o grupo éster da xantana com hidroxilamina à temperatura ambiente produz ácido hidroxâmico. O ácido hidroxâmico forma com o íon férrico um complexo insolúvel vermelho, entretanto, o ácido acetohidroxâmico proveniente dos grupos acetil secundários forma um complexo solúvel vermelho que absorve luz em 520nm (HESTRIN, 1949; MCCOMB; MCCREADY, 1957). Este método possui precisão de $\pm 2\%$ e não requer uma prévia hidrólise dos grupos acetil da xantana para sua determinação (TAYLOR; NASR-EL-DIN, 1993).

A espectroscopia no infravermelho tem sido aplicada para determinação de acetil em xantana em diversos estudos realizados por muitos autores (RINAUDO et al., 1983; TAKO; NAKAMURA, 1988, 1989; TAKO, 1991, 1992; PAKDEE, 1995). Esta técnica pode ser utilizada para identificação de compostos, na determinação de grupos funcionais e nos estudos da estrutura molecular. A espectroscopia no infravermelho estuda a transição das vibrações moleculares (KAWANO, 2003), e modificações nestas vibrações resultam na absorção de luz na região do infravermelho (MORRISON, 1996). A frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos. As posições das bandas são expressas atualmente em número de onda, cuja unidade é o centímetro inverso. No entanto, a intensidade das bandas pode ser expressa em porcentagem de transmitância ou absorbância. A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e microondas. A parte mais estudada é a região de absorção no infravermelho médio que corresponde a faixa de 400 a 4000cm^{-1} .

As vibrações moleculares podem ser classificadas como deformações axiais ou angulares. Uma vibração de deformação axial é um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação que faz com que a distância interatômica aumente e diminua alternadamente. As vibrações de deformação angular correspondem a variações ritmadas de ligações que têm um átomo em comum ou o movimento de um grupo de

átomos em relação ao resto da molécula. Estas vibrações podem ser simétricas ou assimétricas. O modo simétrico corresponde a um movimento de contração e alongamento em fase, que não produz mudança no momento de dipolo da molécula e é inativo no infravermelho. No modo assimétrico o movimento de estiramento ocorre fora de fase, ou seja, uma das ligações se estende e a outra se contrai, alterando o momento de dipolo, sendo ativo no infravermelho.

É possível obter espectros de gases, líquidos e sólidos no infravermelho. Os sólidos são examinados geralmente na forma de pó em suspensão ou de disco prensado. As suspensões são preparadas pela moagem completa do sólido seguida da adição de óleo de moagem e o pulverizado é examinado como um filme fino entre placas planas de sal. Na técnica do disco prensado, a amostra é misturada por moagem com brometo de potássio seco e pulverizado, sendo prensada em moldes especiais sob pressão até formar um disco. Pode-se utilizar também disco prensado de KBr, onde a amostra e o composto são moídos separadamente para evitar possíveis interações químicas, e após são homogeneizados. A mistura de KBr com a amostra é colocada em uma miniprensa, onde aplica-se pressão para formar um disco fino e transparente.

A reação de desacetilação provoca modificações em certos grupos funcionais presentes na estrutura molecular da xantana. Estas mudanças podem ser detectadas através da espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho, pois cada grupo funcional apresenta vibrações em determinado comprimento de onda, originando bandas de absorções características. Os espectros do biopolímero xantana apresentam bandas entre 3400 e 3200cm^{-1} , referentes ao grupo hidroxila em ligação com o hidrogênio; em 2926cm^{-1} , relativa à deformação axial assimétrica do grupo metileno; próxima a 1375cm^{-1} , correspondente à deformação angular simétrica das ligações de C–H do grupo metila; entre 1650 e 1550cm^{-1} , equivalente à deformação axial assimétrica do ânion carboxilato; entre 1750 e 1715cm^{-1} , referente às vibrações de deformação axial da ligação C=O de ésteres e entre 1300 e 1000cm^{-1} , à deformação axial da ligação C–O dos ésteres (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

O ácido pirúvico é um composto amplamente distribuído na natureza como um intermediário metabólico, fazendo parte da constituição de muitos compostos de origem biológica. Este componente foi encontrado no polissacarídeo sintetizado pela *Xanthomonas campestris* pv *campestris* cepa NRRL B-1459 por Slonecker e Orentas

(1961). Sua determinação em xantana pode ser realizada pelo método enzimático que utiliza a lactato desidrogenase ou pelo colorimétrico onde é usado o composto 2,4-dinitrofenilhidrazina. A técnica enzimática foi discutida detalhadamente por Duckworth e Yaphe (1970), baseado no trabalho de Hadjivassiliou e Reider (1968). O grupo piruvato da xantana deve ser primeiramente hidrolisado utilizando ácido oxálico ou ácido clorídrico diluído. O método é específico, requer de 3 a 5mg do biopolímero e é facilmente executado (TAYLOR; NASR-EL-DIN, 1993).

O método da 2,4-dinitrofenilhidrazina tem sido usado amplamente na determinação de piruvato em xantana (KOEPSELL; SHARPE, 1952; SLONECKER; JEANES, 1962; SLONEKER; ORENTAS, 1962; CHEETHAM; PUNRUCKVONG, 1985; SHATWELL et al., 1990). O ácido pirúvico presente na xantana reage com 2,4-dinitrofenilhidrazina produzindo derivados 2,4-dinitrofenilhidrazona os quais são mensurados colorimetricamente. Este método requer 2mL de amostra contendo aproximadamente 2g/L de xantana hidrolisada e reprodutibilidade de 2%. A maior desvantagem da técnica é o grande número de etapas envolvidas (TAYLOR; NASR-EL-DIN, 1993).

Os grupos acetil e piruvato podem ainda ser mensurados simultaneamente através de cromatografia líquida de alta eficiência (CHEETHAM; PUNRUCKVONG, 1985) ou por ressonância magnética nuclear (RINAUDO et al., 1983).

Os sais podem ser adicionados na xantana produzida industrialmente para aumentar sua viscosidade ou sua capacidade de solubilização, entre os quais os sais de sódio e potássio são os mais freqüentemente utilizados (KANG; PETTIT, 1993; MORRIS, 1996). Como exercem influência nas propriedades do biopolímero, torna-se necessário determinar sua concentração nas amostras que servirão de base para estudos laboratoriais. O potássio pode ser medido através de análise titrimétrica, que se baseia na determinação do volume de uma solução de concentração conhecida que reage quantitativamente com um volume conhecido da solução que contém a substância a ser determinada. O potássio pode ser mensurado por titulação de precipitação, que está fundamentada na combinação de íons para formar um precipitado simples. O potássio pode ser precipitado por um excesso de solução de tetrafenilborato de sódio na forma de tetrafenilborato de potássio. O excesso de reagente é determinado pela titulação com solução de nitrato de mercúrio. Entretanto, os íons potássio e sódio são comumente determinados pela técnica de espectroscopia de emissão de chama. Quando uma

solução com um composto metálico, for aspirada por uma chama, forma-se um vapor que contém átomos do metal. Alguns destes átomos do metal, no estado gasoso, podem ser promovidos a um nível de energia suficientemente elevado para que ocorra a emissão da radiação característica do metal como, por exemplo, a radiação amarela característica que colore as chamas dos compostos de sódio. Nesta técnica utiliza-se fotômetro de chama, onde a intensidade da radiação filtrada de uma chama é medida com um detector fotoelétrico. O filtro, interposto entre a chama e o detector (célula fotoelétrica), transmite apenas um raio intenso do elemento. Em um equipamento simples o ar, a uma certa pressão, entra no atomizador, e a sucção assim provocada arrasta a solução da amostra para o atomizador, onde há a mistura com a corrente de ar, na forma de uma névoa fina, que entra no combustor. No combustor há uma pequena câmara onde o ar encontra o gás combustível injetado no combustor, sob pressão, e ocorre a queima. A radiação da chama passa através de uma lente e de um filtro ótico que só dá passagem à radiação característica do elemento investigado; esta radiação atinge a fotocélula e a resposta é medida num sistema apropriado com um painel digital (VOGEL, 1992).

Além das análises químicas da xantana, características físicas como suas propriedades reológicas são importantes determinantes do comportamento molecular e de sua aplicação final. A viscosidade é uma medida direta da qualidade do fluido e fornece importantes informações sobre mudanças fundamentais de sua estrutura durante um determinado processo (SHAW, 1975). A determinação experimental do comportamento reológico pode ser realizada utilizando equipamentos como viscosímetros e reômetros. Os reômetros são instrumentos mais sofisticados onde podem ser mensuradas várias propriedades reológicas, um maior número de parâmetros podem ser controlados e permitem a automatização das sucessivas medidas e avaliação dos dados.

Apesar das excelentes propriedades da xantana, é preciso buscar alternativas para potencializar sua qualidade reológica estabelecendo novas utilizações para este biopolímero. Portanto, pesquisas são necessárias para aperfeiçoar a produção de derivados de xantana através da adequação de uma metodologia adequada para modificação deste polissacarídeo, para predizer e caracterizar suas propriedades e identificar novas aplicações.

1º ARTIGO

DESACETILAÇÃO QUÍMICA DE XANTANA: PARÂMETROS DE REAÇÃO

E. P. Pinto¹; L. Furlan²; C. T. Vendruscolo³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - UFPel

²UFPel/Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado - EMBRAPA

³Laboratório de Biopolímeros - Centro de Biotecnologia - UFPel

Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

RESUMO

Apesar da complexidade da molécula da xantana é possível modificar sua estrutura e conseqüentemente suas propriedades. Este biopolímero apresenta diferentes grupos funcionais os quais são passíveis de modificação química. Com o objetivo de adequar um método para remoção dos grupos acetil da xantana, a fim de verificar a influência dos parâmetros de reação sobre o teor de acetilação e qualidade do biopolímero resultante, reações de desacetilação química foram conduzidas com variação dos seguintes parâmetros: concentrações do biopolímero e álcalis, tempo e temperatura. As reações de desacetilação consistiram na hidrólise do biopolímero em condições alcalinas. As reações foram realizadas com duas concentrações de xantana (0,5 e 1%) e três concentrações de álcali (0,0025; 0,005 e 0,01 mol L⁻¹), sendo utilizados hidróxido de amônio, hidróxido de sódio e hidróxido de potássio. Depois de estabelecidas estas condições, foram estudados os parâmetros temperatura e tempo de reação. Os experimentos foram executados em duas temperaturas (45 e 65°C), com tempos de reação de 3, 6, 9 e 12 horas. Foram efetuadas análises dos teores de sódio e potássio, do grau de acetilação e piruvatação, da viscosidade e espectroscópica vibracional de absorção no infravermelho das amostras. Observou-se que a purificação do biopolímero pela técnica de diálise propiciou uma remoção parcial dos íons sódio e potássio e que estes íons influenciam na viscosidade da xantana. A propriedade de pseudoplasticidade foi mantida após a modificação química do biopolímero. A viscosidade da xantana aumentou com o incremento da concentração de álcali empregada na reação de desacetilação, exceto quando foi empregado hidróxido de potássio. A concentração do biopolímero utilizada para efetuar a reação de desacetilação praticamente não influenciou na viscosidade das soluções e no grau de acetilação. As maiores viscosidades (680 e 910 mPa.s a 10s⁻¹) foram observadas

utilizando a base fraca hidróxido de amônio nas concentrações de 0,005 e 0,01mol L⁻¹, respectivamente; sendo superior a xantana comercial adicionada de sais (430mPa.s a 10s⁻¹). O grau de acetilação e a viscosidade da xantana diminuíram na medida em que se utilizou uma base mais forte (0,01mol L⁻¹) e maior tempo (12 horas) e temperatura (65°C) na reação de desacetilação. O grau de piruvatação da xantana modificada quimicamente não variou, conseqüentemente, não está relacionado à viscosidade nas condições testadas. A xantana comercial desacetilada apresentou viscosidade 53% superior a xantana adicionada de sais com a utilização dos seguintes parâmetros de reação: 0,5 e 1% de biopolímero, 0,01mol L⁻¹ de hidróxido de amônio, 25°C por 3 horas. No entanto, a remoção de grupos acetil maior que 10% proporciona um decréscimo de 55% da viscosidade.

Palavras-chave: Xantana comercial. Desacetilação. Parâmetros de reação.

CHEMISTRY DEACETYLATION OF XANTHAN: REACTION PARAMETERS

E. P. Pinto¹; L. Furlan²; C. T. Vendruscolo³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - UFPel

²UFPel/Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado - EMBRAPA

³Laboratório de Biopolímeros - Centro de Biotecnologia - UFPel

Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

ABSTRACT

Despite complexity of the xanthan molecule it is possible to modify its structure consequently and its properties. This biopolymer presents different functional groups that are possible of chemical modification. With the objective to adjust a method for removal of the acetyl groups of the xanthan, in order to verify the influence of the parameters reaction about degree of acetylation and quality of the resultant biopolymer, reactions of chemical deacetylation had carried out with variation of the following parameters: biopolymer and alkalis concentrations, time and temperature. The deacetylation reactions consisted in hydrolysis of the biopolymer in alkaline conditions. The reactions were realized with two concentrations of xanthan (0.5 and 1%) and three alkali concentrations (0.0025; 0.005 and 0.01 mol L⁻¹), using sodium hydroxide, ammonium hydroxide and potassium hydroxide. After established these conditions, the parameters temperature and time of reaction had studied. The experiments had executed in two temperatures (45 and 65°C), with times of reaction of 3, 6, 9 and 12 hours. Analyses of the content of sodium and potassium, of the degree of acetylation and pyruvatisation, of the viscosity and infrared spectroscopic were realized in the samples. It was observed that the purification of the biopolymer by dialysis technique propitiated a partial removal of the irons sodium and potassium and that these irons influence in the viscosity of the xanthan. The pseudoplasticity property was kept after of the chemical modification of biopolymer. The viscosity of the xanthan increased with the increment of the alkali concentration used in the deacetylation reaction, except when was used potassium hydroxide. The concentration of the biopolymer used in the deacetylation reaction practically did not influence in the viscosity of the solutions and acetylation degree. Biggest viscosities (680 e 910 mPa.s in 10 s⁻¹) were observed using the ammonium hydroxide 0,005 and 0,01 mol L⁻¹, respectively; superior the xanthan added of salts (430 mPa.s in 10 s⁻¹). The degree of acetylation and the viscosity of the xanthan decreased when used a stronger alkali (0,01 mol L⁻¹) and bigger time (12 hours) and temperature (65°C) in the deacetylation reaction. The degree of pyruvatisation of the modified xanthan did not

vary, consequently not related to viscosity in the conditions tested. Deacetylated commercial xanthan showed 53% superior viscosity a xanthan added of salts with the use of the following reaction parameters: 0.5 and 1% of the biopolymer, 0.01mol L^{-1} ammonium hydroxide, 25°C for 3 hours. However, a bigger removal of acetyl groups that 10% provide a 55% decrease of viscosity.

Keywords: Commercial xanthan. Deacetylation. Reaction parameters.

1 INTRODUÇÃO

Biopolímeros são produtos microbianos, biodegradáveis, que podem ser manufaturados comercialmente através de tecnologias modernas e fornecem alternativas para outras gomas tradicionais (SUTHERLAND e TAIT, 1992; SUTHERLAND, 2001).

Bactérias do gênero *Xanthomonas* são responsáveis pela biossíntese do polissacarídeo extracelular denominado xantana. A utilização industrial deste polissacarídeo deriva de suas propriedades físico-químicas (SUTHERLAND, 1994).

A cadeia principal da xantana consiste de unidades de β -D-glicose ligadas na posição 1 e 4, que conferem rigidez à molécula. A estrutura química da cadeia principal é idêntica à da celulose. A cadeia lateral é composta de β -D-manose-(1 \rightarrow 4)- β -D-ácido glicurônico-(1 \rightarrow 2)- α -D-manose, ligados ao carbono 3 dos resíduos de glicose da cadeia principal. A unidade terminal de β -D-manose pode apresentar resíduos de ácido pirúvico ligados nas posições 4 e 6. O grupo acetil pode estar ligado na posição 6 da unidade de α -D-manose (JANSSON; KEENE; LINDBERG, 1975; MELTON et al., 1976). Algumas manoses externas podem conter ainda um segundo grupo acetil (STANKOWSKI; MUELLER; ZELLER, 1993). Estes substituintes podem estar ligados em variáveis proporções à cadeia lateral, dependendo da cepa, das condições de crescimento bacteriano e dos parâmetros que são empregados no processo de produção deste biopolímero (CADMUS et al., 1976). As cadeias laterais conferem solubilidade em meio aquoso (SUTHERLAND, 1994, 2001) e juntamente com os ácidos pirúvico e acético concedem ionicidade a xantana, que além de aumentar a solubilidade também estão relacionadas à conformação molecular (SHATWELL et al., 1990; SHATWELL e SUTHERLAND, 1991).

Apesar da complexidade da molécula da xantana é possível modificar sua estrutura e conseqüentemente suas propriedades. Este biopolímero apresenta diferentes grupos funcionais os quais são passíveis de modificação química. Alterações nos níveis dos substituintes acetil e piruvato podem afetar significativamente as características reológicas da xantana (HARDING; CLEARY; IELPI, 1994), embora existam divergências em relação à influência destes componentes na viscosidade do biopolímero. Alguns autores consideram que estes

grupos aumentam a viscosidade da solução (SLONEKER; JEANES, 1962; SANDFORD et al., 1977; SMITH; PACE, 1981; CHEETHAM; NORMA, 1989; TAKO; NAKAMURA, 1984), já outros reportam que o acetil e piruvato não alteram a viscosidade (BRADSHAW et al., 1983; CALLET; MILAS; RINAUDO, 1987; SHATWELL et al., 1990; SUTHERLAND; TAIT, 1992). Portanto pesquisas são necessárias para elucidar o verdadeiro papel destes radicais nas propriedades reológicas da xantana, a fim de identificar novas aplicações para este biopolímero.

Vários autores (HOLZWARTH; OGLETREE, 1979; BRADSHAW et al., 1983; DENTINI; CRESCENZI; BLASI, 1984; TAKO; NAKAMURA, 1984; COVIELLO et al., 1986; CALLET; MILAS; RINAUDO, 1987; SHATWELL; SUTHERLAND, 1991; LOPES et al.; 1992) têm descrito distintas metodologias para a reação de desacetilação química da xantana. No entanto, nenhum estudo detalhado, até o presente momento, foi realizado para demonstrar, efetivamente, a influência dos parâmetros de reação sobre o teor de desacetilação e a qualidade reológica do biopolímero resultante, de modo a estabelecer uma metodologia para esta reação. Sendo assim, objetivando adequar um método para remoção dos grupos acetil da xantana, reações de desacetilação química foram conduzidas com variação dos seguintes parâmetros: concentrações do biopolímero e álcalis, tempo e temperatura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Biopolímero

Xantana comercial (Jungbunzlauer) finamente particulada (200mesh) foi utilizada para o desenvolvimento deste experimento.

2.2 Purificação do Biopolímero

Soluções de xantana a 2% (m/v) foram dialisadas, sob agitação, em água deionizada durante 48 horas a 4°C, em membranas semipermeáveis de celulose regenerada, com “cut-off” de peso molecular de 12.000-16.000D e porosidade de

24A°; a troca da água foi realizada três vezes ao dia. Após, as soluções de biopolímeros foram secas em estufa a 56°C e o material resultante triturado em moinho de disco. As xantanas purificadas foram consideradas como padrão para realização do experimento.

2.3 Modificação Química

As reações de desacetilação consistiram na hidrólise do biopolímero em condições alcalinas. As reações foram realizadas com duas concentrações de xantana (0,5 e 1%) e três concentrações de álcali (0,0025; 0,005 e 0,01 mol L⁻¹), sendo utilizados hidróxido de amônio, hidróxido de sódio e hidróxido de potássio.

Frascos Erlenmeyers (250mL) contendo 125mL de cada solução, respectivamente, foram incubados em agitador orbital (New Brunswick Scientific, model Innova 4230), a 300rpm, a 25°C por 3 horas.

Depois de otimizados os primeiros parâmetros de reação: concentrações do biopolímero e álcalis empregados, foram estudados os parâmetros de temperatura e tempo de reação. Para tal finalidade, os experimentos foram realizados em duas temperaturas (45 e 65°C), com tempos de reação de 3, 6, 9 e 12 horas.

Para todos os tratamentos, as soluções foram neutralizadas com 2mol L⁻¹ de ácido clorídrico. Os biopolímeros foram recuperados por precipitação com etanol 96°GL na proporção de 1:4 (v/v). Estes foram secos em estufa a 56°C até atingir peso constante e triturados em moinho de disco (Fritsch, Pulverisette).

Complementarmente foram conduzidos ensaios em que as amostras foram dialisadas após a desacetilação química como descrito anteriormente.

Todas as reações experimentais foram realizadas em triplicata.

2.4 Determinação de Sódio e Potássio

As amostras para análise dos íons sódio e potássio da xantana comercial, xantana comercial dialisada e xantana comercial desacetilada com 0,01mol L⁻¹ de hidróxido de amônio (0,5% de biopolímero) foram preparadas segundo a AOAC (1987). Os íons foram mensurados segundo ASTM (1981), através da técnica de

espectroscopia de emissão de chama em Fotômetro de Chama Cole Parmer Model 2655-00.

2.5 Avaliação da Viscosidade

A determinação da viscosidade das soluções aquosas de xantana desacetilada nas diferentes condições de reação foi comparada com a viscosidade de amostras de xantana comercial dialisada e não dialisada. Esta análise foi utilizada como uma pré-seleção para a determinação da melhor condição de desacetilação.

As soluções de xantana a 1% (m/v), em água deionizada, foram agitadas por 2 horas, aquecidas a 60°C por 20 minutos e deixadas em repouso à temperatura ambiente por 24 horas (XUEWU et al., 1996).

A determinação da viscosidade das soluções aquosas foi mensurada em reômetro HAAKE RS150, no modo rotativo, a 25°C. Foi utilizado sistema de cilindros coaxiais, sensor DG41, taxa de deformação 0,01-100s⁻¹, tempo de cada ensaio de 300 segundos, totalizando 50 pontos de aquisição.

2.6 Determinação do Grau de Acetilação

A determinação quantitativa de grupos acetil da xantana comercial dialisada, não dialisada e modificada quimicamente foi realizada através de análise colorimétrica.

Para a elaboração da curva padrão foi utilizado 0,1089g de β-D-glicose pentacetato, a qual foi dissolvida através de aquecimento em 5mL de álcool etílico e o volume foi completado para 100mL com água destilada. Foram transferidos 1, 2, 4, 5 e 7mL desta solução para balões volumétricos de 50mL e o volume foi completado com água destilada. Alíquotas de 5mL destas soluções padrões representam 60, 120, 240, 300 e 420μg de acetil. Em um balão volumétrico de 25mL foram adicionados 1mL da solução de cloridrato de hidroxilamina 37,5% (m/v), 1mL da solução de hidróxido de sódio 94% (m/v), 5mL da solução padrão contida em cada balão volumétrico de 50mL, preparado anteriormente, 5mL de solução metanólica

ácida 70,4% (m/v) e o volume final foi completado com solução de perclorato férrico. A solução estoque de perclorato férrico foi preparada com 1,93g de cloreto férrico, 5mL de ácido clorídrico concentrado e 5mL de ácido perclórico 70%, os quais foram evaporados em banho-maria quase até a secagem. Após evaporação, os 6mL restantes foram transferidos para um balão volumétrico de 100mL e o volume foi completado com água destilada. Transferiu-se 60mL da solução estoque para um balão volumétrico de 500mL e o volume foi completado com metanol absoluto resfriado. A prova em branco foi preparada com 5mL de água destilada. Após 5 minutos, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000) no comprimento de onda máximo de 520nm.

Para o preparo das amostras foi utilizado 0,1g de xantana a qual foi dissolvida sobre vigorosa agitação em 25mL de solução de cloridrato de hidroxilamina 37,5% (m/v) e 25mL de hidróxido de sódio 94% (m/v). Foram transferidos 2mL desta solução para balão volumétrico de 25mL onde foram adicionados 5mL de água destilada e 5mL de solução metanólica ácida 70,4% (m/v), sendo o volume final completado com solução de perclorato férrico. Após 5 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 520nm. Todas as reações experimentais foram realizadas em triplicata (MCCOMB; MCCREADY, 1957).

2.7 Determinação do Grau de Piruvatação

A determinação quantitativa de grupos piruvato da xantana comercial dialisada, não dialisada e modificada quimicamente foi realizada através de análise colorimétrica.

Para a elaboração da curva padrão foi utilizada uma solução estoque 0,1mol L⁻¹ de piruvato de sódio. Por diluição, prepararam-se soluções nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5mmol L⁻¹. A partir dessas, transferiu-se 1mL para tubos de ensaio. A prova em branco foi preparada com 1mL de água destilada. Em cada tubo foram adicionados 1mL da solução 2,4-dinitrofenilhidrazina, 1mL de água destilada, os quais foram agitados e acondicionados em banho-maria a 37°C por 10 minutos e após foram resfriados imediatamente. Em seguida, foram adicionados 5mL de hidróxido de amônio 0,6mol L⁻¹ em cada tubo. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420nm.

A hidrólise das amostras foi realizada utilizando solução de xantana a 1% em ácido clorídrico 2mol L^{-1} , em banho-maria a 80°C por 16 horas. Foram transferidos 2mL do material hidrolisado para um tubo de ensaio e adicionados 18mL de água destilada. A prova em branco foi preparada com 2mL de ácido clorídrico 2mol L^{-1} e 18mL de água destilada. Foram transferidas alíquotas de 1mL da solução anterior para tubo de ensaio realizando três repetições. A cada tubo foram adicionados 1mL da solução 2,4-dinitrofenilhidrazina, 1mL de água destilada, os quais foram agitados e posteriormente acondicionados em banho-maria a 37°C por 10 minutos e então resfriados imediatamente. Em seguida, foi adicionado 5mL de hidróxido de amônio $0,6\text{mol L}^{-1}$ em cada tubo. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420nm. A metodologia empregada foi baseada no trabalho SLONECKER e ORENTAS (1962), com modificações. Todas as reações experimentais foram realizadas em triplicata.

2.8 Análise Espectroscópica no Infravermelho

Os espectros de infravermelho da xantana comercial dialisada, desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio (0,5% de biopolímero) e desacetilada $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio (0,5% de biopolímero), foram obtidos dos compostos pastilhados em brometo de potássio - grau espectroscópico, na faixa de $4000 - 400\text{cm}^{-1}$ em um espectrofotômetro FTLA 2000 BOOMEN, para observação dos grupos funcionais.

2.9 Análise Estatística

A análise estatística dos dados dos teores de grupos acetil e piruvato foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis, admitindo nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teores de Sódio e Potássio

A xantana utilizada comercialmente é adicionada de sais, tendo como finalidade facilitar a sua solubilização e aumentar sua viscosidade (JEANES; PITTSLEY; SENTI, 1961; MORRIS, 1996). Portanto, a xantana comercial empregada nos ensaios laboratoriais foi submetida a um processo de purificação. A técnica de diálise foi utilizada para remoção de sais do biopolímero.

Os teores de sódio e potássio da xantana comercial, dialisada e desacetilada, estão ilustrados na Tabela 1. A xantana analisada apresentou maior teor de sódio (2,82%) do que de potássio (1,98%). A técnica de diálise empregada para purificação das amostras do polissacarídeo propiciou uma remoção parcial destes íons. Em relação a xantana comercial não purificada, o teor de sódio foi reduzido 9,2% e 61,7% na xantana dialisada e desacetilada com hidróxido de amônio, respectivamente. No entanto, houve uma maior redução no teor de potássio que foi de 16,7% na xantana dialisada e 65,7% no biopolímero desacetilado com hidróxido de amônio.

TABELA 1 - Teores de sódio e potássio (%) da xantana comercial, xantana comercial dialisada e xantana comercial dialisada desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio e concentração de biopolímero de 0,5%

Biopolímeros	Sódio (%)	Potássio (%)
XC	2,82	1,98
XCd	2,56	1,65
XCD NH ₄ OH	1,08	0,68

XC: xantana comercial

XCd : xantana comercial dialisada

XCD: xantana comercial dialisada desacetilada

3.2 Viscosidade

Todas as soluções aquosas de xantana analisadas apresentaram comportamento pseudoplástico, como mostra a Figura 3. Em concordância com estes resultados, Bradshaw et al. (1983) demonstraram que a pseudoplasticidade da xantana comercial (Keltrol), amostra utilizada em seu estudo, permaneceu inalterada após a modificação química.

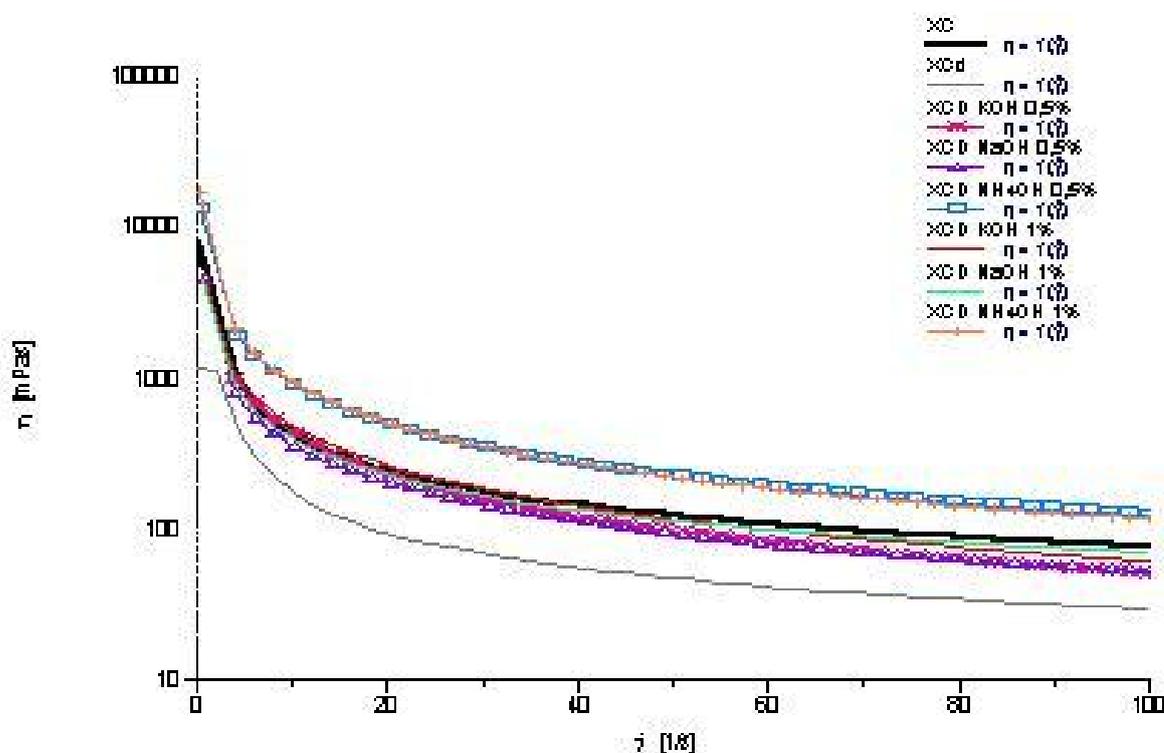


FIGURA 3 - Viscosidade (mPa.s) vs taxa de deformação (s^{-1}) das soluções aquosas a 1% (m/v) de xantana natural (dialisada e não dialisada) e submetida a diferentes condições de desacetilação.

Pela análise reológica observou-se que a viscosidade da xantana comercial dialisada diminuiu (170mPa.s a 10s^{-1}) em relação à amostra não purificada (430mPa.s a 10s^{-1}), provavelmente devido à eliminação dos sais de sódio e potássio que são incorporados nas preparações comerciais. Segundo Whitcomb (1978), a

viscosidade do polissacarídeo purificado é inferior a xantana comercial sem purificação. Borges (2004), observou comportamento similar avaliando amostras de xantana comercial da mesma procedência que a utilizada neste experimento.

A viscosidade das soluções aquosas de xantana modificada quimicamente aumentou com o incremento da concentração do álcali empregado, exceto no biopolímero desacetilado com hidróxido de potássio $0,0025\text{mol L}^{-1}$ e $0,005\text{mol L}^{-1}$, onde a viscosidade praticamente manteve-se. Portanto, definiu-se que a melhor concentração da base para a reação de desacetilação foi de $0,01\text{mol L}^{-1}$, conforme ilustra a Tabela 2. Resultados similares foram encontrados por Bradshaw e colaboradores (1983), que utilizaram $0,015\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de potássio para remoção dos grupos acetil da xantana comercial (Keltrol).

TABELA 2 - Viscosidade (mPa.s) a 25°C das soluções aquosas a 1% (m/v), das xantanas recuperadas das soluções de 0,5% e 1% após diferentes condições de desacetilação

Biopolímeros	Taxa de Deformação (s^{-1})							
	10		30		60		100	
	0,5%	1%	0,5%	1%	0,5%	1%	0,5%	1%
XC	430,0	430,0	180,0	180,0	110,0	110,0	76,9	76,9
XCd	170,0	170,0	67,5	67,5	41,0	41,0	29,8	29,8
XCD H_2O	170,0	170,0	63,6	63,6	37,7	37,7	26,5	26,5
XCD KOH a	290,0	300,0	115,0	110,0	64,8	57,0	44,6	36,7
XCD KOH b	280,0	250,0	97,1	93,9	50,7	49,4	32,4	33,0
XCD KOH c	420,0	480,0	160,0	180,0	82,0	97,4	51,1	61,3
XCD NaOH a	200,0	170,0	72,8	67,4	40,6	41,1	27,6	29,4
XCD NaOH b	250,0	230,0	92,5	78,8	47,7	42,5	31,2	28,5
XCD NaOH c	410,0	390,0	170,0	160,0	100,0	98,5	70,6	70,3
XCD NH_4OH a	370,0	360,0	140,0	130,0	74,9	71,7	50,0	48,2
XCD NH_4OH b	680,0	540,0	230,0	200,0	120,0	120,0	82,4	79,3
XCD NH_4OH c	910,0	920,0	350,0	350,0	190,0	180,0	130,0	120,0

a: $0,0025\text{mol L}^{-1}$, b: $0,005\text{mol L}^{-1}$, c: $0,01\text{mol L}^{-1}$

XC: xantana comercial

XCd : xantana comercial dialisada

XCD: xantana comercial dialisada submetida a 300rpm durante 3h, em solução aquosa (branco da acetilação)

De acordo com a Tabela 2, pode-se verificar que a concentração do biopolímero utilizada praticamente não influenciou na viscosidade das soluções aquosas de xantana.

As viscosidades das soluções aquosas foram influenciadas pelo álcali utilizado nas reações de desacetilação. Viscosidades mais elevadas foram obtidas com a utilização da base fraca (hidróxido de amônio) e os menores valores foram observados com o emprego de base forte (hidróxido de sódio).

Na maioria das condições testadas as xantanas desacetiladas apresentaram viscosidade superior a xantana dialisada, demonstrando que a desacetilação sob agitação a temperatura ambiente em determinadas condições, pode incrementar a viscosidade da xantana.

Pela análise dos resultados observou-se que as melhores viscosidades foram obtidas utilizando hidróxido de amônio 0,005 e 0,01 mol L⁻¹ (concentração de xantana 0,5 e 1%), sendo superiores a xantana comercial adicionada de sais, demonstrando a excelente qualidade do biopolímero desacetilado. O biopolímero desacetilado com 0,01 mol L⁻¹ de hidróxido de amônio apresentou viscosidade 53% superior a xantana comercial sem purificação.

Com base nos resultados da triagem dos parâmetros de reação, selecionou-se a concentração do biopolímero (0,5%) e concentração do álcali (0,01 mol L⁻¹), para verificação da influência da reação de desacetilação na viscosidade da xantana. Também foi realizada a purificação, via procedimento de diálise, dos biopolímeros obtidos após a modificação química, com a finalidade de remover os sais que ainda pudessem estar presentes. Comparando-se as amostras submetidas ao processo de diálise inicial e final com as amostras que apenas foram purificadas inicialmente, foi constatado que a viscosidade das soluções aquosas de xantana foi mantida, comprovando que os dados obtidos neste estudo são apenas devido à reação de modificação química a que o biopolímero foi submetido. No entanto, as amostras desacetiladas que não foram purificadas apresentaram viscosidade superior as demais, comprovando a influência dos sais presentes na xantana comercial (Tab.3).

TABELA 3 - Viscosidade (mPa.s) a 25°C das soluções aquosas a 1% (m/v) da xantana desacetilada com 0,01mol L⁻¹ do álcali e concentração de biopolímero de 0,5%

Biopolímeros	Taxa de deformação (s ⁻¹)			
	10	30	60	100
XC	430,0	180,0	110,0	76,9
XCd	170,0	67,5	41,0	29,8
XCDs KOH	860,0	340,0	180,0	120,0
XCDi KOH	420,0	160,0	82,0	51,1
XCDf KOH	420,0	170,0	97,2	68,5
XCDs NaOH	710,0	270,0	140,0	89,1
XCDi NaOH	410,0	170,0	100,0	70,6
XCDf NaOH	410,0	160,0	96,8	67,8
XCDs NH ₄ OH	1040,0	370,0	200,0	130,0
XCDi NH ₄ OH	910,0	350,0	190,0	130,0
XCDf NH ₄ OH	890,0	300,0	180,0	130,0

XCd: xantana comercial dialisada

XCDs: xantana comercial desacetilada

XCDi: xantana comercial dialisada desacetilada

XCDf: xantana comercial dialisada antes e após desacetilação

A Tabela 4 ilustra a influência do tempo e temperatura utilizados na reação de desacetilação química da xantana. Comparando as temperaturas de 25 e 45°C, verificou-se que praticamente não houve uma grande mudança na viscosidade das soluções aquosas de xantana desacetilada; com a temperatura de 65°C obteve-se biopolímeros desacetilados de viscosidade inferior aos demais tratamentos. Com base nestes resultados, foi estabelecida a temperatura de 25°C como ideal para a desacetilação química.

TABELA 4 - Viscosidade (mPa.s) a 25°C das soluções aquosas a 1% (m/v) da xantana desacetilada com 0,01mol L⁻¹ de hidróxido de amônio e concentração de biopolímero de 0,5% em diferentes tempos e temperaturas de reação

Biopolímeros			Taxa de deformação (s ⁻¹)			
			10	30	60	100
XCD	25°C	3h	910,0	350,0	190,0	130,0
XCD	45°C	3h	951,0	358,0	195,0	129,0
XCD	45°C	6h	889,0	323,0	174,0	115,0
XCD	45°C	9h	756,0	284,0	155,0	104,0
XCD	45°C	12h	703,0	265,0	146,0	97,4
XCD	65°C	3h	713,0	269,0	151,0	104,0
XCD	65°C	6h	707,0	274,0	151,0	101,0
XCD	65°C	9h	673,0	275,0	154,0	103,0
XCD	65°C	12h	644,0	268,0	153,0	104,0

XCD: xantana comercial dialisada desacetilada

A Figura 4 mostra os dados de viscosidade da xantana desacetilada em diferentes tempos e temperaturas de reação. O tempo de reação também exerceu efeito sobre a viscosidade do biopolímero. Houve um decréscimo da viscosidade à medida que se aumentou o tempo de reação de 3 para 12 horas. Portanto, constatou-se que três horas para reação de desacetilação foi suficiente para obter um biopolímero com qualidade reológica. Entretanto, alguns autores (TAKO; NAKAMURA, 1986; CHOWDHURY; LINDBERG; LINDQUIST, 1987; CALLET; MILAS; RINAUDO, 1987; LOPES et al., 1992; PAKDEE et al., 1995; GOYCOOLEA; MILAS; RINAUDO, 2001) preconizam tempos maiores para reação de desacetilação, como 16, 18 e 24 horas.

Em se tratando da análise econômica de um processo de modificação química, tenta-se otimizar as condições de reação de tal forma que contribuam para as características que são almejadas para um material com menor custo. Logo, a determinação dos parâmetros tempo e temperatura são fundamentais para qualquer processo dessa natureza.

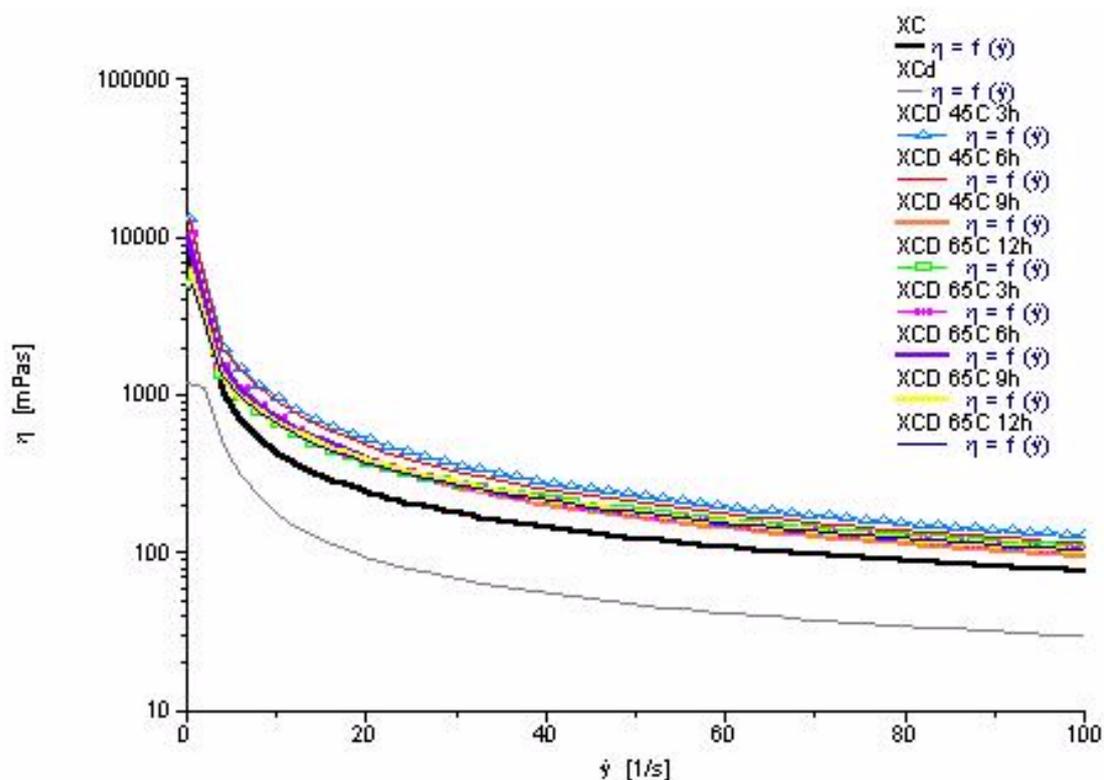


FIGURA 4 - Viscosidade (mPa.s) vs taxa de deformação (s^{-1}) das soluções aquosas a 1% (m/v) de xantana desacetilada com concentração de solvente de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (concentração de biopolímero de 0,5%) em diferentes tempos e temperaturas.

3.3 Grau de Acetilação

A Tabela 5 apresenta a variação do grau de acetilação entre as amostras de xantana comercial, xantana comercial dialisada e xantana comercial dialisada desacetilada com $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de potássio, hidróxido de sódio e hidróxido de amônio com concentração de biopolímero de 0,5 e 1%.

TABELA 5 - Teores de grupos acetil (%) da xantana comercial, xantana comercial dialisada e xantana comercial dialisada desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio e concentração de biopolímero de 0,5 e 1%

Biopolímeros			Acetil (%)	Desvio Padrão
XC			4,1 A	0,0635
XCd			4,0 AB	0,0808
XCD	KOH	0,5%	1,4 AB	0,0755
XCD	NaOH	0,5%	1,3 B	0,0693
XCD	NH ₄ OH	0,5%	3,6 AB	0,0000
XCD	KOH	1%	1,4 AB	0,0693
XCD	NaOH	1%	1,3 AB	0,0635
XCD	NH ₄ OH	1%	4,0 AB	0,0862

XC: xantana comercial

XCd : xantana comercial dialisada

XCD: xantana comercial dialisada desacetilada

* Valores seguidos de letras iguais não diferiram pelo teste de Kruskal-Wallis em nível de significância 5%

Pela análise do teor de acetil das amostras verificou-se que estes variaram de 4,1 a 1,3%. Slonecker e Jeanes (1962) encontraram o conteúdo de grupos acetil de 4,6% para o biopolímero sintetizado pela *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, cepa utilizada na produção industrial de xantana. O mesmo grau de acetilação foi encontrado para uma amostra de xantana comercial (Taiyo Kagaku Co. Ltd) por Tako e Nakamura (1984). Bradshaw et al. (1983) avaliando xantana comercial Keltrol proveniente da Kelco encontraram 4,1% de acetil.

O grau de acetilação diminuiu a medida em que foi utilizada uma base mais forte na reação de desacetilação. Ao utilizar hidróxido de sódio houve uma redução de 67,5% do conteúdo de acetil em relação a xantana comercial dialisada. No entanto, quando foi empregado hidróxido de amônio apenas 10% dos grupos foram removidos (Tab.5), verificando-se então que a melhor condição de modificação química seria com a utilização de $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio, onde obteve-se o maior grau de desacetilação.

A Tabela 6 apresenta os teores de acetil da xantana submetida a desacetilação com a variação do tempo e temperatura de reação.

TABELA 6 - Teores de grupos acetil (%) da xantana comercial dialisada desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio e concentração de biopolímero de 0,5% em diferentes tempos e temperaturas de reação

Biopolímeros			Acetil (%)	Desvio Padrão
XCD	45°C	3h	3,4 A	0,0866
XCD	45°C	6h	3,1 AB	0,0693
XCD	45°C	9h	2,9 AB	0,1674
XCD	45°C	12h	2,2 AB	0,0000
XCD	65°C	3h	3,3 AB	0,0173
XCD	65°C	6h	2,9 AB	0,1767
XCD	65°C	9h	2,5 AB	0,0173
XCD	65°C	12h	2,0 B	0,0586

XCD: xantana comercial dialisada desacetilada

* Valores seguidos de letras iguais não diferiram pelo teste de Kruskal-Wallis em nível de significância 5%

Conforme os dados apresentados verificou-se que à medida que o tempo de reação aumentou de 3 para 12 horas houve uma diminuição no teor de acetil das amostras, não sendo considerado significativo ao nível de 5%. Os biopolímeros desacetilados a 65°C apresentaram um menor grau de acetilação do que os desacetilados a 45°C. Isto pode ser explicado pelo fato que o aumento do tempo e temperatura favorecem a reação de hidrólise do biopolímero aumentando, portanto, o grau de desacetilação.

3.4 Grau de Acetilação vs Viscosidade

A xantana desacetilada com hidróxido de sódio apresentou os menores valores de viscosidade (410mPa.s a 10s^{-1}) e grau de acetilação (1,3%), ou seja, maior teor de desacetilação, quando comparada com o biopolímero submetido à reação de hidrólise com hidróxido de amônio, onde os valores encontrados para viscosidade e grau de acetilação foram de 910mPa.s a 10s^{-1} e 3,6%, respectivamente (Fig.5). Embora as reações com bases mais fortes como hidróxido de sódio e hidróxido de potássio propiciem uma reação mais efetiva em termos de desacetilação, resultando em uma diminuição do grau de acetilação, este decréscimo não contribui para um incremento da viscosidade.

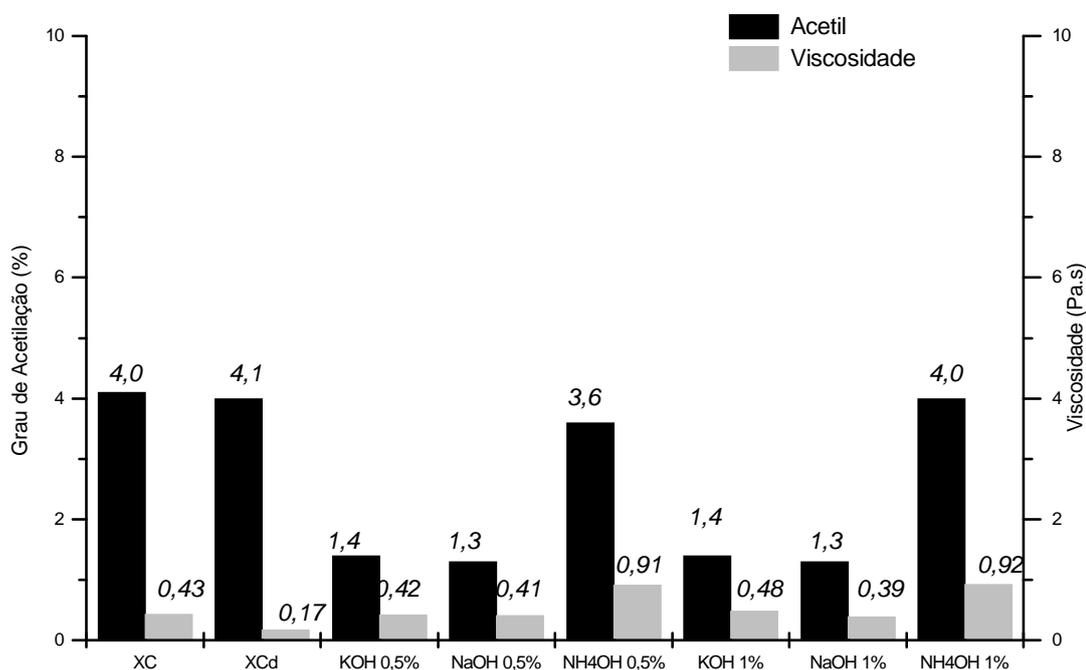


FIGURA 5 - Grau de acetilação (%) vs viscosidade (Pa.s) da xantana comercial, xantana comercial dialisada, xantana comercial dialisada desacetilada com concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ dos diferentes álcalis e concentração de biopolímero 0,5 e 1%, a 25°C .

Analisando as amostras desacetiladas em diferentes tempos e temperatura de reação observou-se que à medida que a viscosidade diminuiu, com o passar do tempo de reação, houve um decréscimo no conteúdo de acetil. Este comportamento foi verificado tanto na temperatura de 45°C como em 65°C . Tempos maiores de reação favorecem a hidrólise do polissacarídeo, porém com detrimento da qualidade reológica da xantana, fator que deve ser considerado no processo de desacetilação (Fig.6).

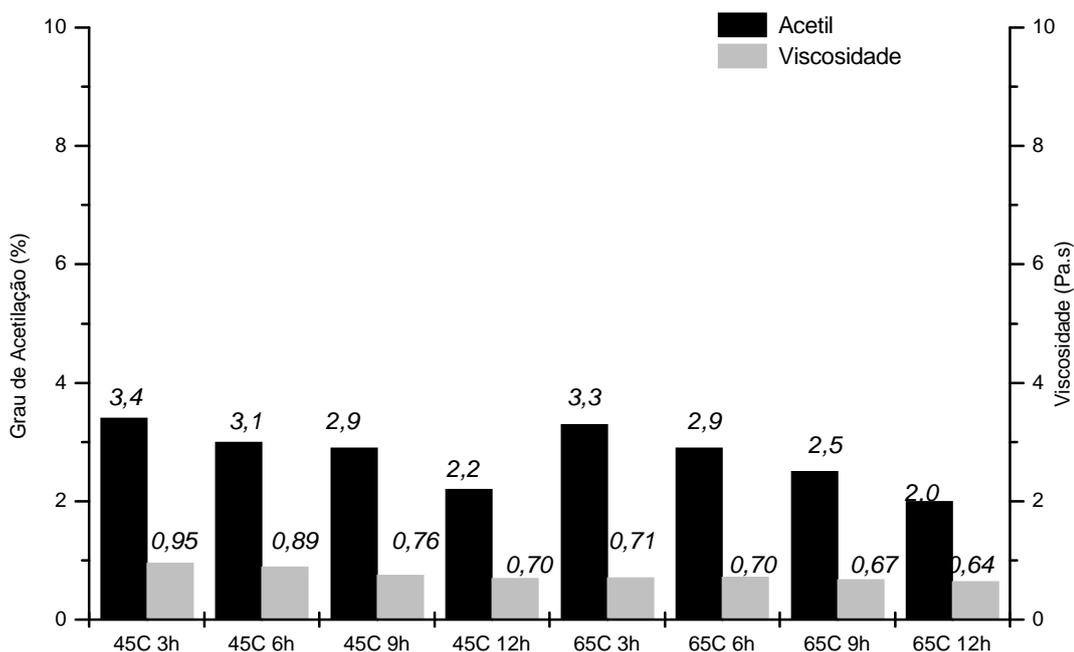


FIGURA 6 - Grau de acetilação (%) vs viscosidade (Pa.s) da xantana comercial dialisada desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio (concentração de biopolímero 0,5%) em 45 e 65°C por 3, 6, 9 e 12 horas.

3.5 Grau de Piruvatação

A xantana comercial utilizada neste experimento apresentou 3,6% de grupos piruvato (Tab.7). Holzwarth e Ogletree (1979) encontraram conteúdo de piruvato de 3,1% na xantana Keltrol, entretanto para este mesmo biopolímero Bradshaw et al. encontraram 4,3%. Shatwell e Sutherland (1991) verificaram 4,4% de piruvato na xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv *campestris* cepa 646.

TABELA 7 - Teores de grupos piruvato (%) da xantana comercial, xantana comercial dialisada e xantana comercial dialisada desacetilada com $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio e concentração de biopolímero de 0,5 e 1%, a 25°C .

Biopolímeros			Piruvato (%)	Desvio Padrão
XC			3,6 A	0,0404
XCd			3,7 A	0,1217
XCD	KOH	0,5%	3,5 A	0,1457
XCD	NaOH	0,5%	3,8 A	0,0551
XCD	NH ₄ OH	0,5%	3,5 A	0,0493
XCD	KOH	1%	3,7 A	0,0924
XCD	NaOH	1%	3,5 A	0,0551
XCD	NH ₄ OH	1%	3,7 A	0,0802

XC: xantana comercial

XCd : xantana comercial dialisada

XCD: xantana comercial dialisada desacetilada

* Valores seguidos de letras iguais não diferiram pelo teste de Kruskal-Wallis em nível de significância 5%

A avaliação da piruvatação da xantana desacetilada mostrou que o teor de grupos piruvato não foi afetado significativamente pelas reações de desacetilação, conforme está ilustrado nas Tabelas 7 e 8. Conseqüentemente, não está relacionado à viscosidade (Tab.2). Comprovando que a reação de desacetilação empregada nos biopolímeros não causou mudanças nos grupos piruvato.

TABELA 8 - Teores de grupos piruvato (%) da xantana comercial dialisada desacetilada com $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ hidróxido de amônio e concentração de biopolímero de 0,5% em diferentes tempos e temperaturas de reação

Biopolímeros			Piruvato (%)	Desvio Padrão
XCD	25°C	3h	3,5 A	0,0493
XCD	45°C	3h	3,7 A	0,0608
XCD	45°C	6h	3,7 A	0,0814
XCD	45°C	9h	3,4 A	0,1345
XCD	45°C	12h	3,5 A	0,1300
XCD	65°C	3h	3,5 A	0,2787
XCD	65°C	6h	3,6 A	0,1002
XCD	65°C	9h	3,5 A	0,1179
XCD	65°C	12h	3,8 A	0,3443

XCD: xantana comercial dialisada desacetilada

* Valores seguidos de letras iguais não diferiram pelo teste de Kruskal-Wallis em nível de significância 5%

3.6 Espectroscopia no Infravermelho

A técnica de espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho foi realizada com o objetivo de comprovar a eficiência da reação de desacetilação através do desaparecimento da banda de absorção característica de certos grupos funcionais. A figura abaixo apresenta os espectros de absorção da xantana comercial dialisada, xantana desacetilada com hidróxido de amônio e xantana desacetilada com hidróxido de sódio.

De maneira geral, os espectros das amostras de xantana apresentaram uma banda forte e larga em 3416cm^{-1} , referente ao grupo hidroxila (OH) em ligação de hidrogênio e em 2922cm^{-1} , relativa à deformação axial assimétrica do grupo metileno (CH_2). A deformação angular simétrica das ligações de C–H do grupo metila (CH_3) apresentou uma banda em 1373cm^{-1} . Entretanto, em 1253cm^{-1} , verificou-se uma banda de deformação axial da ligação C–O dos ésteres e em 1618cm^{-1} , pela deformação axial assimétrica do ânion carboxilato.

A deformação axial da ligação C=O de ésteres é caracterizada por uma banda em 1730cm^{-1} . Pela análise dos espectros, verificou-se que a xantana dialisada e a desacetilada com hidróxido de amônio possuem esta banda. No entanto, no espectro da xantana desacetilada com hidróxido de sódio esta banda não aparece, comprovando que ocorreu uma maior desacetilação deste biopolímero. Os ésteres de metila apresentam uma banda em 1250cm^{-1} . Esta banda foi visualizada na xantana dialisada e desacetilada com hidróxido de amônio, contudo sua intensidade decresceu na amostra desacetilada com hidróxido de sódio. A espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho propiciou a confirmação da remoção dos grupos acetil da xantana que também foi detectada através da análise química.

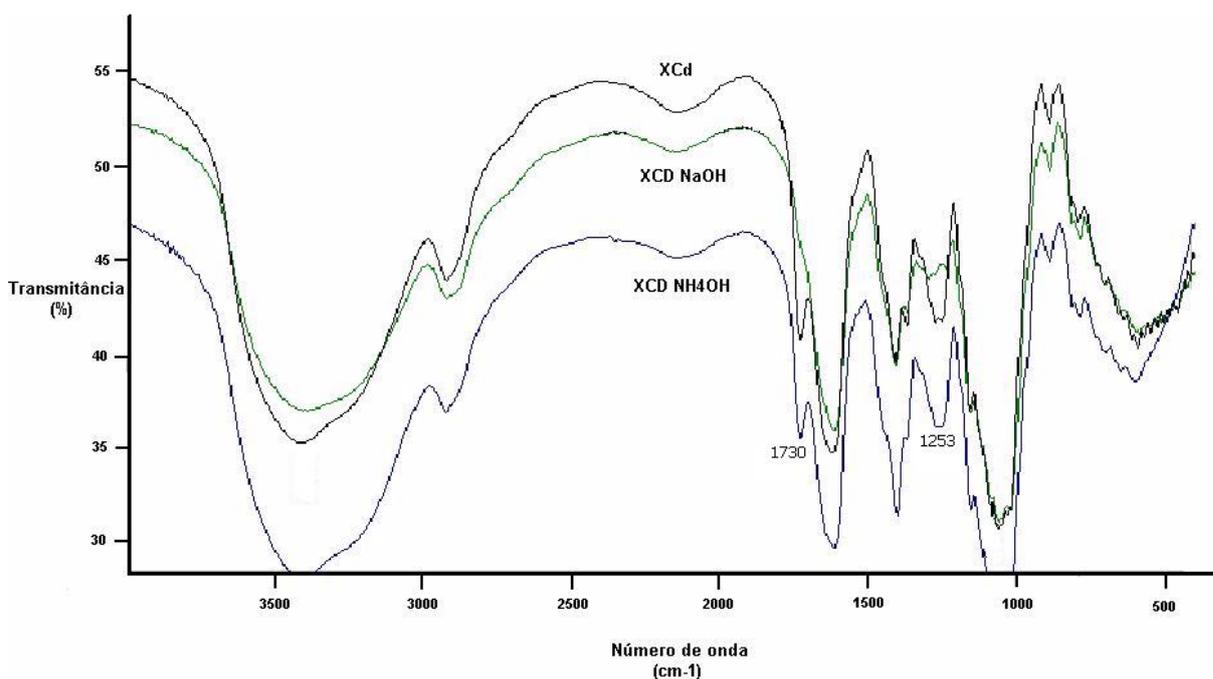


FIGURA 7 - Espectros na região de infravermelho, em pastilha de KBr: xantana comercial dialisada, xantana desacetilada com $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio e xantana desacetilada com $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ hidróxido de sódio (concentração de biopolímero de 0,5%).

4 CONCLUSÕES

O processo de desacetilação altera as propriedades da xantana comercial. A viscosidade e o grau de acetilação do biopolímero foram influenciados pelo álcali e sua concentração, tempo e temperatura empregados durante a reação. Os sais que podem estar contidos nas preparações comerciais afetaram a viscosidade do biopolímero desacetilado. O grau de piruvatação da xantana modificada quimicamente não variou, conseqüentemente, não mostrou relação com a viscosidade.

O biopolímero desacetilado apresentou viscosidade 53% superior a xantana adicionada de sais com a utilização dos seguintes parâmetros de reação: 0,5 e 1% de biopolímero, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio, 25°C por 3 horas. No entanto, a remoção de grupos acetil maior que 10% proporcionou um decréscimo de 55% da viscosidade.

5 REFERÊNCIAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC international**. 14th ed. Washington, 1987.

ASTM D1428-64. Annual Book of ASTM Standards, **American Society for Testing and Materials**, v.10, Philadelphia, 1981.

BORGES, C. D. **Caracterização da goma xantana em função da cepa de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* e das condições operacionais**. 2004. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BRADSHAW, I. J.; NISBET, B. A.; KERR, M. H.; SUTHERLAND, I. W. Modified xanthan – its preparation and viscosity. **Carbohydrate Polymers**, v.3, p.23-38, 1983.

CADMUS, M. C.; ROGOVIN, S. P.; BURTON, K. A.; PITTSLEY, J. E.; KNUTSON, C. A.; JEANES, A. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from variant strain. **Canadian Journal Microbiology**, v.22, p.942-948, 1976.

CALLET, F.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Influence of acetyl and pyruvate contents on rheological properties of xanthan in dilute solution. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 9, p.291-293, 1987.

CHEETHAM, N. W. H.; NORMA, N. M. N. The effect of pyruvate on viscosity properties of xanthan. **Carbohydrate Polymers**, v.10, p.55-60, 1989.

CHOWDRURY, T. A.; LINDBERG, B.; LINDQUIST, U. Structural studies of an extracellular polysaccharide, S-657, elaborated by *Xanthomonas* ATCC 53159. **Carbohydrate research**, n.164, p.117-122, 1987.

COVIELLO, T.; KAJIWARA, K.; BURCHARD, W.; DENTINI, M.; CRESCENZI, V. Solution properties of xanthan. 1. Dynamic and static light scattering from native and modified xanthans in dilute solutions. **Macromolecules**, v.19, p.2826-2831, 1986.

DENTINI, M.; CRESCENZI, V.; BLASI, D. Conformational properties of xanthan derivatives in dilute aqueous solution. **International Journal Biological Macromolecules**, v.6, p.93-98, 1984.

GOYCOOLEA, F. M.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Associative phenomena in galactomannan-deacetylated xanthan systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.29, p.181-192, 2001.

HARDING, N. E.; CLEARY, J. M.; IELPI, L. Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. In: HUI, Y. H.; KHACHATOURIANS, G. G. **Food Biotechnology Microorganisms**. VCH, 1994. p.495-514.

HOLZWARTH, G.; OGLETREE, J. Pyruvate-free xanthan. **Carbohydrate Research**, v.76, p.277-280, 1979.

JANSSON, P. E.; KEENE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v.45, p.275-282, 1975.

JEANES, A.; PITTSLEY, J. E.; SENTI, F. R. Polysaccharide B-1459: a new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. **Journal Applied Polymer**, v.5, p.519-526, 1961.

LOPES, L.; ANDRADE, C. T.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Role of conformation and acetylation of xanthan on xanthan-guar interaction. **Carbohydrate Polymers**, v.17, p.121-126, 1992.

McCOMB, E. A.; McCREADY, R. M. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. **Analytical Chemistry**, v.29, n.5, p.819-821, 1957.

MELTON, L. D.; MINDT, L.; REES, D. A.; SANDERSON, G. R. Covalent structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v.46, p.245-257, 1976.

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

NAVARRO, R. F. **Fundamentos de reologia de polímeros**. Caxias do Sul: EDUCS, 1997. 256p.

PAKDEE, P.; TAKO, M.; YOKOHARI, T.; KINJYO, K.; HONGO, H.; YAGA, S. Synergistic interaction between xanthan and galactomannan isolated from *Leucaena leucephala* de wit. **Oyo Toshitsu Kagaku**, n.2, v.42, p.105-113, 1995.

SANDFORD, P. A.; PITTSLEY, J. E.; KNUTSON, C. A.; WATSON, P. R.; CADMUS, M. C.; JEANE, A. Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: characterization of xanthan products of differing strains. In: SANDFORD, P. A.; LASKINS, A. **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington, D. C.: American Chemical Society, 1977. p.192-210.

SHATWELL, K. P.; SUTHERLAND, I. W.; DEA, I. C. M.; ROSS-MURPHY, S. B.; The influence of acetyl and pyruvate substituents on the helix-coil transition behavior of xanthan. **Carbohydrate Research**, v.206, p. 87-103. 1990.

SHATWELL, K. P.; SUTHERLAND, I. W.; Influence of the acetyl substituent on the interaction of xanthan with plant polysaccharides – I. Xanthan – Locust bean gum systems. **Carbohydrate Polymers**, v.14, p. 29-51. 1991.

SLONEKER, J. H.; JEANES, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. **Canadian Journal of Chemistry**, v.40, p.2066-2071, 1962.

SLONEKER, J. H.; ORENTAS, D. G. Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide. **Nature**, v.194, n.4827, p.478-479, 1962.

SMITH, I. H.; SYMES, K. C.; LAWSON, C. J. Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. **International Journal Biological Macromolecules**, v.3, p.129-134, 1981.

STANKOWSKI, J. D.; MUELLER, B. E.; ZELLER, S. G. Location of second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. **Carbohydrate Research**, v.241, p.321-326, 1993.

SUTHERLAND, I. W.; TAIT, M. I. Biopolymers. **Encyclopedia of Microbiology**, v.1, p.339-349, 1992.

SUTHERLAND, I. W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v.12, p.393-448, 1994.

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

TAKO, M.; NAKAMURA, S. Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous media. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.48, n.12, p. 2887-2993, 1984.

TAKO, M.; NAKAMURA, S. D-mannose-specific interaction between xanthan and D-galacto-D-mannan. **FEBS Letters**, n.1, v.204, p. 33-36. 1986.

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

2º ARTIGO

INFLUÊNCIA DA DESACETILAÇÃO NAS PROPRIEDADES DO BIOPOLÍMERO SINTETIZADO PELA *Xanthomonas campestris* pv pruni CEPA 101

E. P. Pinto¹; L. Furlan²; C. T. Vendruscolo³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - UFPel

²UFPel/Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado - EMBRAPA

³Laboratório de Biopolímeros - Centro de Biotecnologia - UFPel

Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

RESUMO

Diversas espécies e patovares da bactéria *Xanthomonas* são capazes de produzir, em abundância, o polissacarídeo de alto peso molecular denominado xantana. Além das diferenças que podem ocorrer com a estrutura química deste biopolímero através da utilização de variadas condições de produção, modificações químicas podem ser realizadas para alteração de sua estrutura molecular e conseqüentemente de suas propriedades. O presente trabalho tem como finalidade estudar a influência da desacetilação nas propriedades da xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101. O biopolímero foi produzido através de fermentação aeróbia em incubador agitador, após foi purificado através da técnica de diálise, sendo utilizado como padrão para as posteriores reações químicas. Para as reações de desacetilação foram utilizadas soluções de xantana 0,5% (m/v) em 0,01 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e hidróxido de amônio e submetidas a 300rpm, 25°C, por 3 horas. A solução de xantana 0,5% (m/v) em 0,01 mol L⁻¹ de hidróxido de amônio foi testada na temperatura de 45°C por 3 horas. Foram efetuadas análises dos teores de sódio e potássio, do grau de acetilação e piruvatação, da viscosidade e espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho das amostras. Observou-se que a purificação do biopolímero pela técnica de diálise propiciou uma remoção parcial dos íons sódio e potássio. A escolha do álcali empregado na reação de desacetilação influenciou na viscosidade das soluções de xantana. A utilização de bases mais fortes torna mais efetiva a desacetilação. Entretanto, as maiores viscosidades foram obtidas com a utilização de bases mais fracas. Verificou-se que a viscosidade e o grau de acetilação praticamente manteve-se constante quando a temperatura de reação aumentou de 25°C para 45°C. O teor de acetilação diminuiu a medida em que se empregou base mais forte. A modificação química não proporcionou mudanças no teor de

piruvatação, portanto a mudança de viscosidade foi devida a desacetilação. O emprego de hidróxido de amônio na reação de desacetilação proporciona uma melhoria de 24% na viscosidade da xantana, no entanto, a remoção de grupos acetil é mais eficiente com a utilização de hidróxido de sódio obtendo-se uma redução de 81% destes grupos.

Palavras-chave: *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 101. Desacetilação. Propriedades reológicas.

**INFLUENCE OF DEACETYLATION IN PROPERTIES OF THE BIOPOLYMER
SINTETIZED BY *Xanthomonas campestris* pv pruni STRAIN 101**

E. P. Pinto¹; L. Furlan²; C. T. Vendruscolo³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - UFPel

²UFPel/Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado - EMBRAPA

³Laboratório de Biopolímeros - Centro de Biotecnologia - UFPel

Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

ABSTRACT

Various species and pathovars of the *Xanthomonas* bacterium are capable to produce, in abundance, the polysaccharide of high molecular weight denominate xanthan. Besides differences that to happen with the chemical structure this biopolymer by utilization of conditions production diverse, chemical modified are realize to alteration of molecular structure and consequently their properties. This work has finality to study the influence of deacetylation in the properties of the xanthan synthesized by *Xanthomonas campestris* pv pruni strain 101. The biopolymer was produced through dialysis technique, which was utilized how standard to posterior chemical reaction. For deacetylation reaction was used 0,5% (w/v) xanthan solution in 0,01mol L⁻¹ sodium hydroxide, potassium hydroxide and ammonium hydroxide and submitted 300rpm, 25°C, for 3 hours. The 0,5% (w/v) xanthan solution in 0,01 mol L⁻¹ ammonium hydroxide was tested in 45°C for 3 hours. Analyses of the content of sodium and potassium, of the degree of acetylation and pyruvatisation, of the viscosity and infrared spectroscopic were realized in the samples. It was observed that the purification of the biopolymer by dialysis technique propitiated a partial removal of the sodium and potassium ions. The choice of alkali employed in deacetylation reaction influenced in viscosity of the xanthan solutions. The high viscosity (1170mPa.s in 10s⁻¹) was observed with the use of ammonium hydroxide decreased with the used of potassium (591mPa.s in 10s⁻¹) and sodium hydroxide (490mPa.s in 10s⁻¹). Verified that the viscosity and the degree of acetyl groups was maintained constant when the temperature of reaction increased of 25°C to 45°C. The utilization of ammonium hydroxide in the deacetylation reaction provide 24% increase in the xanthan viscosity, nevertheless, the removal of acetyl groups is more efficient with the utilization of sodium hydroxide obtained 81% reduction of

these groups. The chemical modified not provided alteration in pyruvate degree, thus the pyruvate groups not influenced in viscosity of deacetylated xanthan.

Keywords: *Xanthomonas campestris* pv *pruni* strain 101. Deacetylation. Rheological Properties.

1 INTRODUÇÃO

A xantana é um importante biopolímero produzido por bactérias gram-negativas do gênero *Xanthomonas*, quando submetidas a condições adequadas de meio, aeração, pH e temperatura. Diferentes espécies deste gênero, tais como, *X. oryzae*, *X. maltophilia*, *X. fragariae* e *X. campestris*; entre outros patovares desta última espécie citada como o *campestris*, *pruni*, *juglandis* e *phaseoli*, produzem eficientemente este polissacarídeo extracelular de alto peso molecular (HAYWARD, 1993). *Xanthomonas campestris* pv *pruni*, bactéria fitopatogênica, é agente causador da mancha bacteriana em espécies do gênero *Prunus*, “Prunus Bacterial Spot”, que afeta o desenvolvimento de espécies como pessegueiros, ameixeiras e amendoeiras. Sua fitopatogenicidade está relacionada com a qualidade e quantidade de xantana produzida (CIVEROLO; HATTING, 1993).

Comercialmente, o biopolímero xantana é sintetizado pela *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, sendo constituído de glicose, manose, ácido glicurônico, ácido acético e ácido pirúvico (SLONECKER; JEANES, 1962). Entretanto, outros componentes têm sido relatados em polissacarídeos sintetizados por outros patovares e espécies. A xantana produzida pela *Xanthomonas campestris* pv *juglandis* apresenta em sua constituição ramnose (LOWSON; SYMES, 1977). Souza e Vendruscolo (1999) e Moreira et al. (2001) detectaram a presença deste monossacarídeo no biopolímero sintetizado pela *Xanthomonas campestris* pv *pruni*.

A principal característica apresentada pela xantana, e de grande interesse comercial, é sua habilidade de modificar a reologia ou o comportamento de fluxo das soluções; contudo, suas propriedades reológicas são influenciadas por vários fatores como sua estrutura molecular, presença de sais, pH, temperatura e concentração do biopolímero.

As propriedades exibidas pela xantana são determinadas por sua composição química, ligação e arranjo molecular, bem como distribuição do peso molecular (PAPAGIANNI et al., 2001). Estas características podem ser alteradas por mudanças na espécie, patovar ou cepa, condições de crescimento e parâmetros utilizados durante o processo de produção do biopolímero (CADMUS et al., 1976). Entretanto, a estrutura sacarídica básica da xantana, apesar de poder sofrer modificações, é normalmente conservada, enquanto que o conteúdo dos grupos

ligados a esta estrutura, como acetil e piruvato, pode variar bastante (PINCHES; PALLENT, 1986).

Alterações da estrutura do biopolímero podem ser conseguidas intencionalmente também através de mudanças químicas ou genéticas. A xantana pode ser modificada quimicamente através da reação de desacetilação, onde ocorre a remoção dos grupos acetil presentes na cadeia lateral da molécula. Variações nestes grupos podem exercer um efeito nas propriedades do biopolímero e conseqüentemente em suas aplicações (SLONECKER; JEANES, 1962; TAKO; NAKAMURA, 1984).

Relatos da literatura descrevem que essas mudanças químicas têm sido efetuadas principalmente com a xantana comercial (CHEETHAM; NORMA, 1989; BRADSHAW, 1983; TAKO; NAKAMURA, 1984; CALLET; MILAS; RINAUDO, 1987), cuja procedência é o patovar *campestris*. No entanto, existe a necessidade de desvendar o comportamento da xantana sintetizada por outros patovares, em relação às alterações químicas de sua estrutura. Portanto, o presente trabalho tem como finalidade estudar a influência da desacetilação nas propriedades da xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 101.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

A xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* foi utilizada para o desenvolvimento deste experimento.

2.2 Produção do Biopolímero

A cepa foi mantida através de repiques mensais em placas de Petry contendo ágar SPA, incubadas a 28°C por 48 horas e estocadas a 4°C.

O processo de fermentação de *Xanthomonas campestris* envolve dois estágios: crescimento celular e produção do biopolímero. Erlenmeyers de 250mL, contendo 40mL do meio líquido YM (HAYNES; WICKERHAM; HESSELTINE, 1955),

foram inoculados com 10^8 UFC.mL⁻¹. Estes foram incubados em agitador orbital (New Brunswick Scientific, modelo Innova 4230), a 150rpm e 28°C por 24 horas. Após o período de multiplicação celular, o cultivo foi transferido para erlenmeyers de 250mL com 45mL de meio MPII (CADMUS et al., 1978 modificado por VENDRUSCOLO et al., 2000). A produção do biopolímero foi realizada por fermentação aeróbica em batelada, em incubador agitador, nas condições: 28°C, 200rpm por 72 horas (SOUZA; VENDRUSCOLO, 1999).

O meio fermentado foi centrifugado para remoção de células em centrífuga (Sorvall Instruments, RC-5C) a 16.000xg a 4°C por 30 minutos (VENDRUSCOLO, 1995). Ao sobrenadante foi adicionado etanol 96°GL na proporção de 1:4 (v/v) para recuperação dos biopolímeros. Estes foram secos em estufa a 56°C até atingirem peso constante, após foram pesados e triturados em moinho de disco (Fritsch, Pulverisette).

2.3 Purificação do Biopolímero

Soluções de xantana a 2% (m/v) foram dialisadas, sob agitação, em água deionizada durante 48 horas a 4°C, em membranas semipermeáveis de celulose regenerada, com “cut-off” de peso molecular de 12.000-16.000D e porosidade de 24A°; a troca da água foi realizada três vezes ao dia. Após, as soluções de biopolímeros foram secas em estufa a 56°C e o material resultante triturado em moinho de disco. As xantanas purificadas foram consideradas como padrão para realização do experimento.

2.4 Modificação Química

Inicialmente, as melhores condições de concentração de álcali e biopolímero, tempo e temperatura de reação selecionadas nos experimentos feitos com xantana comercial foram testadas para o biopolímero sintetizado pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv pruni.

Para as reações de desacetilação foram utilizadas soluções de xantana 0,5% (m/v) em 0,01mol L⁻¹ de hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e hidróxido

de amônio. Os frascos foram incubados em agitador orbital (New Brunswick Scientific, model Innova 4230), a 300rpm, a 25°C, por 3 horas. Posteriormente, a solução de xantana 0,5% (m/v) em hidróxido de amônio 0,01 mol L⁻¹ foi testada na temperatura de 45°C por 3 horas, condição selecionada na segunda etapa do estudo com xantana comercial.

Para todos os tratamentos, as soluções foram neutralizadas com 2mol L⁻¹ de ácido clorídrico. Os biopolímeros foram recuperados por precipitação com etanol 96°GL na proporção de 1:4 (v/v). Estes foram secos em estufa a 56°C até atingir peso constante e triturados em moinho de disco (Fritsch, Pulverisette).

Todas as reações experimentais foram realizadas em triplicata.

2.5 Determinação de Sódio e Potássio

As amostras para análise dos íons sódio e potássio da xantana sintetizada pela cepa 101, dialisada e desacetilada com 0,01mol L⁻¹ de hidróxido de amônio (0,5% de biopolímero) foram preparadas segundo a AOAC (1987). Os íons foram mensurados segundo ASTM (1981), através da técnica de espectroscopia de emissão de chama em Fotômetro de Chama Cole Parmer Model 2655-00.

2.6 Avaliação da Viscosidade

A viscosidade das soluções aquosas de xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv pruni dialisada e não dialisada foi comparada com ao biopolímero desacetilado nas diferentes condições de reação.

As soluções de xantana a 1% (m/v) em água deionizada foram agitadas por 2 horas, aquecidas a 60°C por 20 minutos e deixadas em repouso à temperatura ambiente por 24 horas (XUEWU et al., 1996).

A determinação da viscosidade das soluções aquosas foi mensurada em reômetro HAAKE RS150, no modo rotativo, a 25°C. Foi utilizado sistema de cilindros coaxiais, sensor DG41, taxa de deformação 0,01-100s⁻¹, tempo de cada ensaio de 300 segundos, totalizando 50 pontos de aquisição.

2.7 Determinação do Grau de Acetilação

A determinação quantitativa de grupos acetil da xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* dialisada, não dialisada e modificada quimicamente foi realizada através de análise colorimétrica.

Para a elaboração da curva padrão foi utilizado 0,1089g de β -D-glicose pentacetato, a qual foi dissolvida através de aquecimento em 5mL de álcool etílico e o volume foi completado para 100mL com água destilada. Foram transferidos 1, 2, 4, 5 e 7mL desta solução para balões volumétricos de 50mL e o volume foi completado com água destilada. Alíquotas de 5mL destas soluções padrões representam 60, 120, 240, 300 e 420 μ g de acetil. Em um balão volumétrico de 25mL foram adicionados 1mL da solução de cloridrato de hidroxilamina 37,5% (m/v), 1mL da solução de hidróxido de sódio 94% (m/v), 5mL da solução padrão contida em cada balão volumétrico de 50mL, preparado anteriormente, 5mL de solução metanólica ácida 70,4% (m/v) e o volume final foi completado com solução de perclorato férrico. A solução estoque de perclorato férrico foi preparada com 1,93g de cloreto férrico, 5mL de ácido clorídrico concentrado e 5mL de ácido perclórico 70%, os quais foram evaporados em banho-maria quase até a secagem. Após evaporação, os 6mL restantes foram transferidos para um balão volumétrico de 100mL e o volume foi completado com água destilada. Transferiu-se 60mL da solução estoque para um balão volumétrico de 500mL e o volume foi completado com metanol absoluto resfriado. A prova em branco foi preparada com 5mL de água destilada. Após 5 minutos, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000) no comprimento de onda máximo de 520nm.

Para o preparo das amostras foi utilizado 0,1g de xantana a qual foi dissolvida sobre vigorosa agitação em 25mL de solução de cloridrato de hidroxilamina 37,5% (m/v) e 25mL de hidróxido de sódio 94% (m/v). Foram transferidos 2mL desta solução para balão volumétrico de 25mL onde foram adicionados 5mL de água destilada e 5mL de solução metanólica ácida 70,4% (m/v), sendo o volume final completado com solução de perclorato férrico. Após 5 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 520nm. Todas as reações experimentais foram realizadas em triplicata (MCCOMB; MCCREADY, 1957).

2.8 Determinação do Grau de Piruvatação

A determinação quantitativa de grupos piruvato da xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* dialisada, não dialisada e modificada quimicamente foi realizada através de análise colorimétrica.

Para a elaboração da curva padrão foi utilizada uma solução estoque 0,1mol L⁻¹ de piruvato de sódio. Por diluição, prepararam-se soluções nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5mmol L⁻¹. A partir dessas, transferiu-se 1mL para tubos de ensaio. A prova em branco foi preparada com 1mL de água destilada. Em cada tubo foram adicionados 1mL da solução 2,4-dinitrofenilhidrazina, 1mL de água destilada, os quais foram agitados e acondicionados em banho-maria a 37°C por 10 minutos e após foram resfriados imediatamente. Em seguida, foram adicionados 5mL de hidróxido de amônio 0,6mol L⁻¹ em cada tubo. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420nm.

A hidrólise das amostras foi realizada utilizando solução de xantana a 1% em ácido clorídrico 2mol L⁻¹, em banho-maria a 80°C por 16 horas. Foram transferidos 2mL do material hidrolisado para um tubo de ensaio e adicionados 18mL de água destilada. A prova em branco foi preparada com 2mL de ácido clorídrico 2mol L⁻¹ e 18mL de água destilada. Foram transferidas alíquotas de 1mL da solução anterior para tubo de ensaio realizando três repetições. A cada tubo foram adicionados 1mL da solução 2,4-dinitrofenilhidrazina, 1mL de água destilada, os quais foram agitados e posteriormente acondicionados em banho-maria a 37°C por 10 minutos e então resfriados imediatamente. Em seguida, foi adicionado 5mL de hidróxido de amônio 0,6mol L⁻¹ em cada tubo. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420nm. A metodologia empregada foi baseada no trabalho SLONECKER e ORENTAS (1962), com modificações. Todas as reações experimentais foram realizadas em triplicata.

2.9 Análise Espectroscópica no Infravermelho

Os espectros de infravermelho da xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* dialisada, desacetilada com 0,01mol L⁻¹ de hidróxido de sódio e desacetilada com 0,01mol L⁻¹ de hidróxido de amônio, foram

obtidos dos compostos pastilhados em brometo de potássio - grau espectroscópico, na faixa de 4000 - 400 cm^{-1} em um espectrofotômetro FTLA 2000 BOOMEN, para observação dos grupos funcionais.

2.10 Análise Estatística

A análise estatística dos dados dos teores de grupos acetil e piruvato foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis, admitindo nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teores de Sódio e Potássio

Os íons sódio e potássio são encontrados na composição do biopolímero produzido pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101, pois são resíduos do processo de síntese deste biopolímero. O íon sódio é proveniente da água utilizada no processo produtivo. No entanto, o íon potássio é oriundo do fosfato de potássio que é um dos componentes integrantes do meio de cultura utilizado na produção do polissacarídeo.

A Tabela 9 ilustra os teores de sódio e potássio da xantana produzida pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101, dialisada e desacetilada com hidróxido de amônio. O teor de potássio (2,51%) presente na xantana natural foi superior ao teor de sódio (2,02%). O processo de purificação empregado removeu parcialmente estes íons. Através da técnica de diálise houve uma redução de 40,1 e 48,2% dos íons sódio e potássio, respectivamente. No entanto, no biopolímero desacetilado a remoção destes íons foi maior, permanecendo apenas 0,53% de sódio e 0,69% de potássio.

Comparando a xantana proveniente do patovar pruni com a xantana comercial Jungbanzlauer utilizada no primeiro experimento, pode-se verificar que o teor de potássio foi 21,1% superior na xantana sintetizada pelo patovar pruni. Contudo, o teor de sódio foi 28,4% superior na xantana comercial, provavelmente devido à incorporação de sais que é feita para comercialização do produto.

Torres et al. (1993), realizaram a caracterização química da xantana proveniente da Keltrol e outra proveniente de uma cepa variante de *Xanthomonas campestris* denominada XC-E2, onde verificaram um conteúdo de sódio de 1,3 e 1,1% e potássio de 2,6 e 3,9%, respectivamente.

TABELA 9 - Teores de sódio e potássio (%) da xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101, dialisada e desacetilada com 0,01mol L⁻¹ da base e concentração de biopolímero de 0,5%

Biopolímeros	Sódio (%)	Potássio (%)
XC 101	2,02	2,51
XCd 101	1,21	1,30
XCD 101 NH ₄ OH	0,53	0,69

XC 101: xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv pruni

XCd 101: xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv pruni dialisada

XCD 101: xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv pruni desacetilada

3.2 Grau de Acetilação

A Tabela 10 apresenta a variação dos teores de grupos acetil da xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101, dialisada e desacetilada com hidróxido de potássio, hidróxido de sódio e hidróxido de amônio.

Pela análise do teor de acetil das amostras verificou-se que estes variaram de 5,3 a 1,0%. Pode-se observar que com o emprego de bases fortes a reação de desacetilação foi mais efetiva do que com bases fracas. Houve uma redução de grupos acetil de 81,1% quando a xantana reagiu com hidróxido de sódio, em comparação ao decréscimo de apenas 1,9% destes grupos com o emprego de hidróxido de amônio. O aumento de temperatura de reação não influenciou no grau de acetilação do biopolímero.

Nos estudos realizados por Shatwell, Sutherland e Ross-Murphy (1991), modificaram biopolímeros através da reação de desacetilação, onde utilizaram hidróxido de amônio mais concentrado e maior temperatura de em relação à metodologia utilizada neste trabalho. Com o emprego deste método, obtiveram uma remoção de 71% e 79% para os biopolímeros sintetizados pela *Xanthomonas*

campestris pv *campestris* cepa 646 e *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* cepa 1128, respectivamente.

TABELA 10 - Teor de grupos acetil (%) da xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* cepa 101, dialisada e desacetilada com 0,01mol L⁻¹ de álcalis e concentração de biopolímero de 0,5%

Biopolímeros		Acetil (%)	Desvio Padrão
XC	101	5,0 AB	0,0400
XCd	101	5,3 A	0,0451
XCD	101 KOH 25°C	2,1 AB	0,0115
XCD	101 NaOH 25°C	1,0 B	0,0115
XCD	101 NH ₄ OH 25°C	5,2 AB	0,0289
XCD	101 NH ₄ OH 45°C	5,1 AB	0,0300

XC 101: xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv *pruni*

XCd 101: xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* dialisada

XCD 101: xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* desacetilada

* Valores seguidos de letras iguais não diferiram pelo teste de Kruskal-Wallis em nível de significância 5%

3.3 Viscosidade

A viscosidade das soluções aquosas do biopolímero sintetizado pela *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 101 diminuiu à medida que a taxa de deformação aumentou, comportamento este denominado de pseudoplasticidade.

A Tabela 10 apresenta os dados de viscosidade da xantana produzida pela cepa 101, dialisada e desacetilada com 0,01mol L⁻¹ de diferentes álcalis e 0,5% de biopolímero, a 25 e 45°C.

A viscosidade da xantana produzida pelo patovar *pruni* cepa 101 na taxa de deformação de 10s⁻¹ foi de 727mPa.s e este mesmo biopolímero dialisado apresentou viscosidade de 941mPa.s, na mesma taxa de deformação. Portanto, a viscosidade do biopolímero dialisado foi superior ao não dialisado. Souza e Vendruscolo (1999) relataram este mesmo comportamento para biopolímeros dialisados sintetizados pela *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 24, onde a diálise proporcionou um incremento de 10 vezes na viscosidade. Estes autores explicaram que tal fato poderia ser, possivelmente, à eliminação parcial das impurezas, tais como componentes do meio e produtos secundários, que precipitam com o biopolímero.

TABELA 11 - Viscosidade (mPa.s) a 25°C da solução aquosa a 1% (m/v) da xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101, dialisada e desacetilada 0,01mol L⁻¹ de álcalis concentração de biopolímero de 0,5%, a 25 e 45°C

Biopolímeros	Viscosidade (mPa.s)			
	Taxa de deformação (s ⁻¹)			
	10	30	60	100
XC 101	727,0	294,0	164,0	109,0
XCd 101	941,0	374,0	217,0	149,0
XCD 101 KOH 25°C	591,0	243,0	135,0	88,5
XCD 101 NaOH 25°C	490,0	203,0	120,0	81,7
XCD 101 NH ₄ OH 25°C	1170,0	481,0	273,0	184,0
XCD 101 NH ₄ OH 45°C	1190,0	491,0	281,0	190,0

XC 101: xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv pruni

XCd 101: xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv pruni dialisada

XCD 101: xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv pruni desacetilada

A escolha do álcali empregado na reação de desacetilação influenciou na viscosidade da xantana sintetizada pelo patovar pruni cepa 101. A maior viscosidade foi observada com a utilização de hidróxido de amônio decrescendo à medida que foi empregado hidróxido de potássio e sódio. O biopolímero desacetilado com hidróxido de amônio apresentou viscosidade 24% superior (1170mPa.s a 10s⁻¹), em relação a xantana sintetizada pela cepa 101 dialisada (941mPa.s a 10s⁻¹), demonstrando excelente qualidade reológica, como está ilustrado na Figura 8.

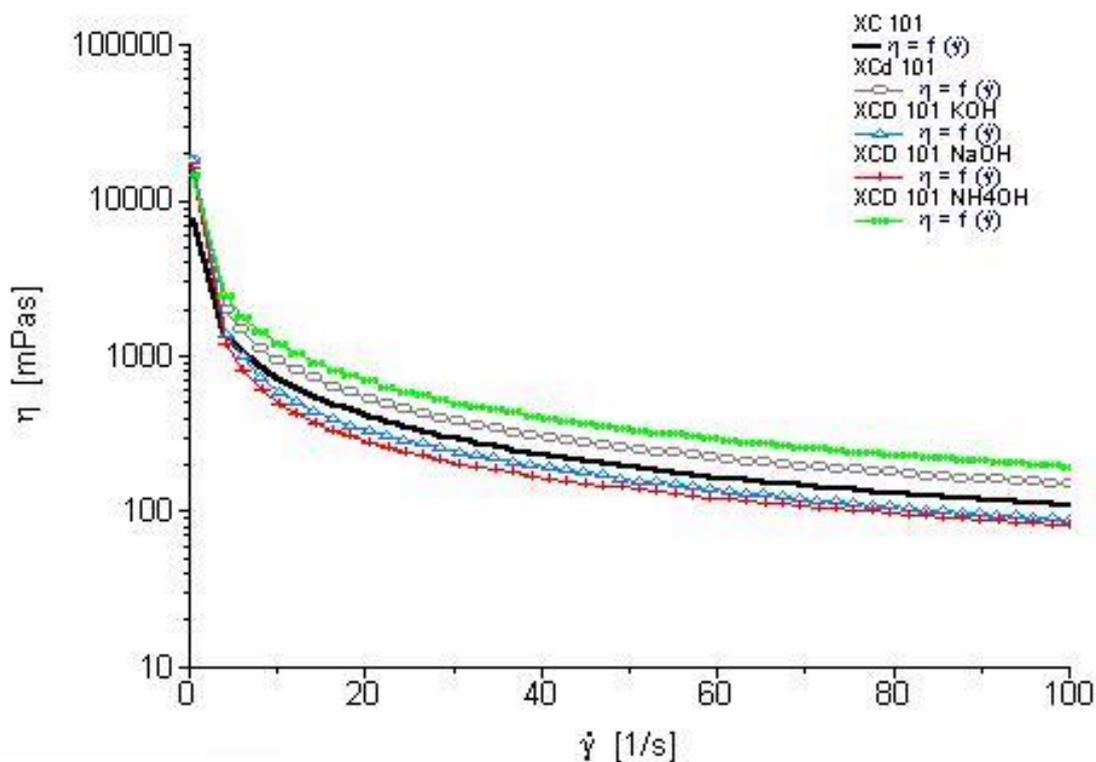


FIGURA 8 - Viscosidade (mPa.s) vs taxa de deformação (s^{-1}) dos biopolímeros desacetilados sintetizados pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101.

A variação da temperatura da reação de desacetilação não influenciou na viscosidade da xantana proveniente da cepa 101. Na Figura 9, pode-se verificar que a viscosidade praticamente manteve-se constante quando a temperatura de reação aumentou de 25°C para 45°C. Neste caso, se for considerado a economia do processo, não existe a necessidade de empregar a temperatura de 45°C para a modificação química, visto que, a viscosidade é muito semelhante ao biopolímero desacetilado em 25°C. Tal fato também foi observado por nós em uma xantana comercial analisada previamente nas mesmas condições (PINTO et al., dados não publicados) ao executar a reação de desacetilação em diferentes temperaturas.

Com base nestes resultados, as melhores condições de reação para a xantana produzida pela cepa 101 foram obtidas com a utilização de hidróxido de amônio, 25°C por 3 horas. Em um experimento prévio, foram estudados os parâmetros concentração de biopolímero e álcalis, tempo e temperatura mais adequados para execução da reação de desacetilação de uma xantana comercial; onde se selecionou os melhores parâmetros de reação, com base na qualidade

reológica do biopolímero obtido, para utilizar no biopolímero sintetizado pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101. Constatou-se que a xantana sintetizada pelo patovar pruni e campestris apresentaram comportamento similar em relação às variações dos parâmetros da reação de desacetilação.

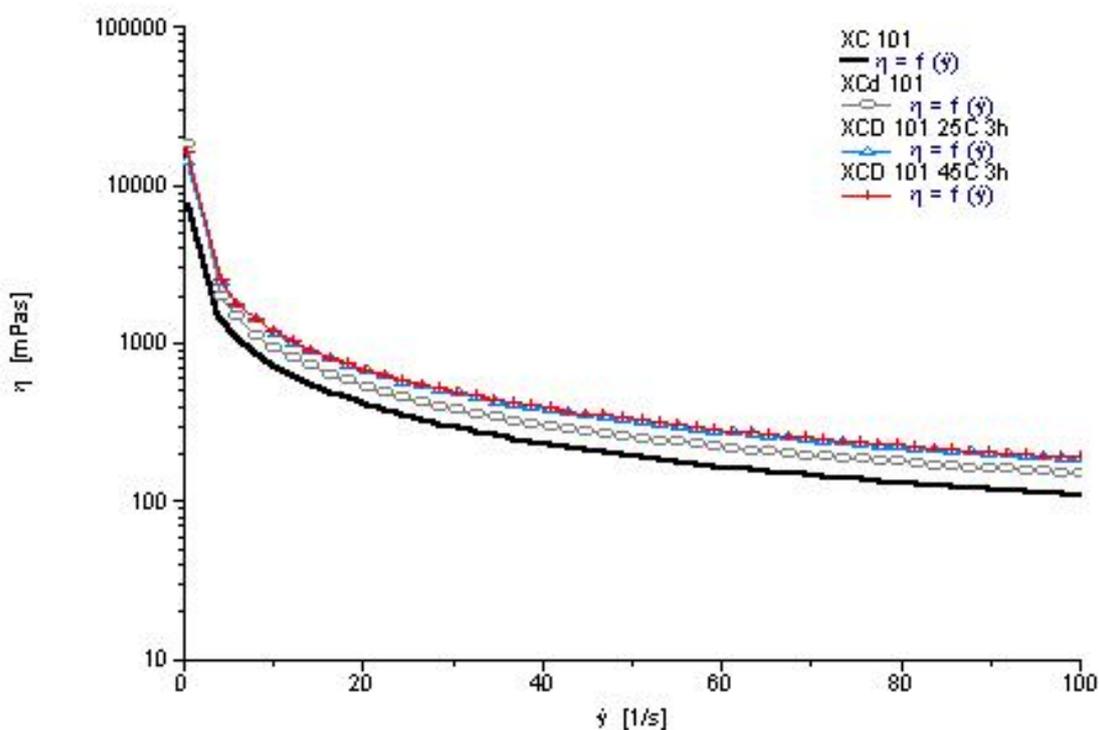


FIGURA 9 - Viscosidade (mPa.s) vs taxa de deformação (s^{-1}) dos biopolímeros sintetizados pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101 desacetilados com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio, a 25 e 45°C.

3.4 Grau de Acetilação vs Viscosidade

A Figura 10 mostra a comparação entre o grau de acetilação (%) e a viscosidade (Pa.s) da xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101, dialisada e desacetilada com $0,01\text{mol L}^{-1}$ de hidróxido de potássio, hidróxido de sódio e hidróxido de amônio, sendo que esta última condição foi efetuada a 25 e 45°C.

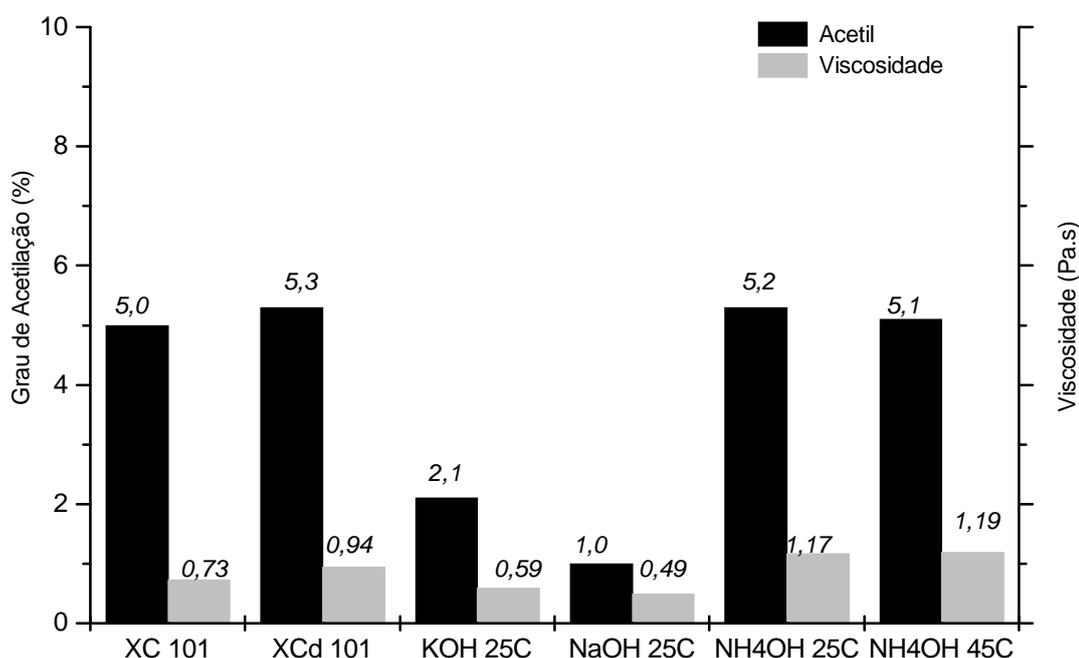


FIGURA 10 - Grau de acetilação vs viscosidade da xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101, dialisada, desacetilada com $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de potássio, hidróxido de sódio e hidróxido de amônio.

A xantana produzida pela cepa 101 desacetilada com hidróxido de amônio apresentou viscosidade superior às demais, no entanto, o teor de acetil foi de 5,2%. A utilização de bases fortes durante o processo de desacetilação propiciou viscosidades inferiores como 490 e 591 mPa.s em 10 s^{-1} com o emprego de hidróxido de sódio e potássio, respectivamente. Estes polissacarídeos apresentaram os valores de acetilação de 1,0% para reação com hidróxido de sódio e 2,1% com hidróxido de potássio, portanto foram os mais desacetilados. A viscosidade e o teor de acetilação mantiveram-se utilizando a base fraca em temperatura mais elevada na reação de modificação química.

A xantana comercial utilizada nas análises prévias (PINTO et al., dados não publicados) não modificada exibiu viscosidade de 430 mPa.s em 10 s^{-1} e grau de acetilação de 4,1%. Em comparação, a xantana proveniente da cepa 101 apresentou viscosidade e teor de acetil mais elevados, tal fato pode ser explicado pelas diferenças existentes na composição química destes polissacarídeos relativos à utilização de patovares e condições operacionais distintas. A xantana comercial

apresenta em sua composição glicose, manose e ácido glicurônico, enquanto que a xantana proveniente do patovar pruni apresenta ainda o monossacarídeo ramnose.

3.5 Grau de Piruvatação

A Tabela 12 mostra os teores de grupos piruvato da xantana produzida pela cepa 101, dialisada e desacetilada em diferentes condições. O biopolímero sintetizado pela *Xanthomonas campestris* patovar pruni cepa 101 apresentou 0,8% de grupos piruvato. Este conteúdo foi baixo em relação a xantana comercial (Jungbunzlauer) utilizada em experimento prévio que apresentou 3,6% de grupos piruvato.

Do mesmo modo que ocorre variação com os grupos acetil na xantana, mudanças na proporção dos grupos piruvato também podem ocorrer. A cepa NRRL B-1459 da *Xanthomonas campestris* pv *campestris* tem sido muito pesquisada por vários autores que utilizaram diferentes condições de processamento e por isso diferentes teores de piruvato têm sido publicados como 3,0 a 3,5% (SLONECKER; ORENTAS, 1962), 2,5 a 4,7% (CADMUS et al., 1976), 0,9 a 8,5% (DAVIDSON, 1978) e 2,2 a 3,9% (TORRESTIANA; FUCIKOVSKY; GALINDO, 1990).

TABELA 12 - Teor de grupos piruvato (%) da xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* cepa 101, dialisada e desacetilada com 0,01mol L⁻¹ de álcalis e concentração de biopolímero de 0,5%

Biopolímeros		Piruvato (%)	Desvio Padrão
XC	101	0,8 A	0,0458
XCd	101	0,9 A	0,0231
XCD	101 KOH 25°C	0,9 A	0,0902
XCD	101 NaOH 25°C	0,8 A	0,0850
XCD	101 NH ₄ OH 25°C	0,7 A	0,0656
XCD	101 NH ₄ OH 45°C	0,8 A	0,0153

XC 101: xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv pruni

XCd 101: xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv pruni dialisada

XCD 101: xantana sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas campestris* pv pruni desacetilada

A modificação química não proporcionou mudanças no teor de piruvatação da xantana produzida pela cepa 101, portanto os grupos piruvato não estão relacionados com a mudança verificada na viscosidade das xantanas desacetiladas.

No entanto, ao correlacionar o teor de piruvato com a viscosidade da xantana sintetizada pelo patovar pruni e campestris sem modificação química, pode-se verificar que a xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101 apresentou uma alta viscosidade (727mPa.s em 10s⁻¹) e baixo conteúdo de piruvato (0,8%) em relação a xantana comercial Jungbunzlauer que apresentou viscosidade de 430mPa.s em 10s⁻¹ e teor de piruvato de 4,1%. Em concordância com estes resultados Ávila, Borges e Vendruscolo (2005), verificaram uma elevada viscosidade e baixo teor de grupos piruvato na xantana natural proveniente do patovar pruni cepa 101.

3.6 Espectroscopia no Infravermelho

A Figura 11 mostra uma comparação dos espectros de infravermelho da xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101 dialisada, desacetilada com 0,01mol L⁻¹ de hidróxido de amônio e desacetilada com 0,01mol L⁻¹ de hidróxido de sódio.

Os espectros da xantana produzida pela cepa 101 apresentaram uma banda forte e larga em 3386cm⁻¹ referente ao grupo hidroxila (OH) em ligação de hidrogênio. A banda 2923cm⁻¹ refere-se à deformação axial assimétrica do grupo metileno (CH₂). A deformação angular simétrica das ligações de C–H do grupo metila (CH₃) gerou uma banda em 1376cm⁻¹. Entretanto, as bandas em 1253cm⁻¹ e 1618cm⁻¹ correspondem à deformação axial da ligação C–O dos ésteres e deformação axial assimétrica do ânion carboxilato, respectivamente.

A deformação axial da ligação C=O de ésteres é caracterizada por uma banda em 1730cm⁻¹. Analisando os espectros, verificou-se que a xantana produzida pela cepa 101 dialisada e a desacetilada com hidróxido de amônio apresentaram esta banda. Contudo, no espectro da xantana desacetilada com hidróxido de sódio houve o desaparecimento parcial desta, comprovando que ocorreu uma maior desacetilação deste biopolímero. A região de 1250cm⁻¹ exibe uma banda característica dos ésteres de metila. Esta banda foi visualizada na xantana dialisada

e desacetilada com hidróxido de amônio, contudo sua intensidade decresceu na amostra desacetilada com hidróxido de sódio.

A espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho propiciou a confirmação da remoção dos grupos acetil da xantana juntamente com a análise química. Esta técnica tem sido bastante utilizada por muitos pesquisadores em seus estudos para comprovar a ocorrência da reação de desacetilação (TAKO; NAKAMURA, 1988, 1989; TAKO, 1991, 1992; RINAUDO et al., 1983; PAKDEE, 1995).

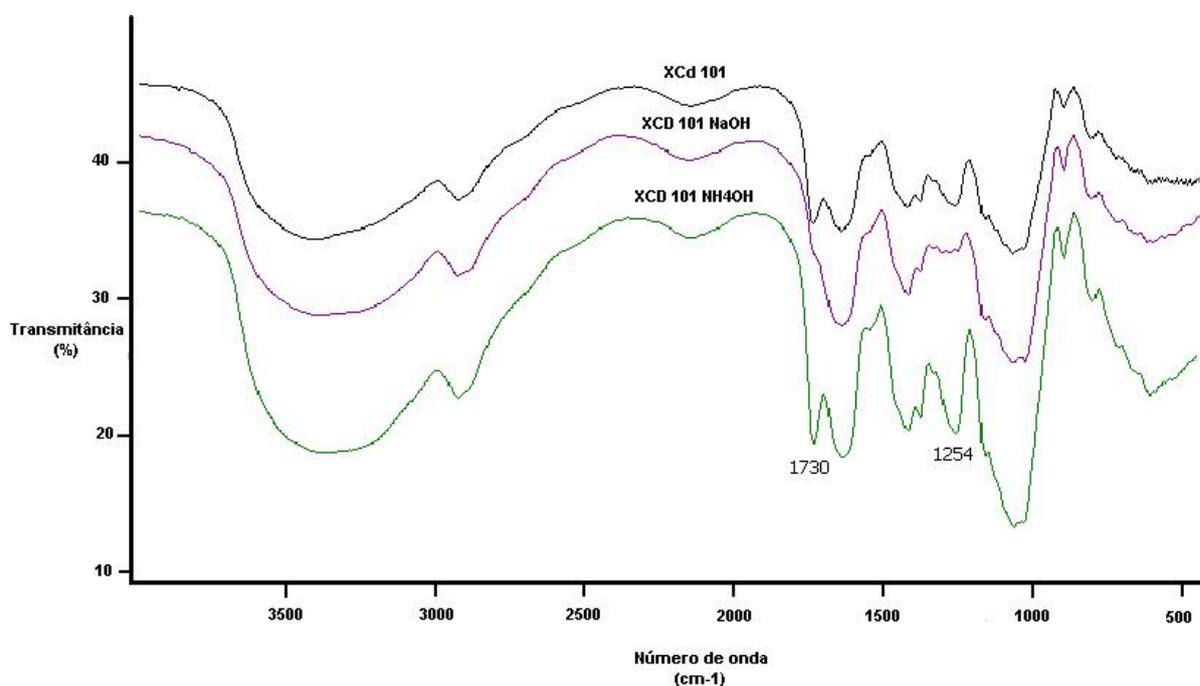


FIGURA 11 – Espectros na região de infravermelho, em pastilha de KBr: xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101 dialisada, desacetilada com $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de amônio e desacetilada com $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ hidróxido de sódio.

4 CONCLUSÕES

As propriedades da xantana proveniente da *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101 foram influenciadas pela adição de álcali. O álcali empregado na reação de desacetilação influenciou na viscosidade e no grau de acetilação do

biopolímero. Entretanto, com a variação da temperatura de reação a viscosidade das soluções e o grau de acetilação praticamente foram mantidos. O grau de piruvatação não variou e, portanto, os grupos piruvato não estão relacionados com a mudança verificada na viscosidade das soluções de xantana.

O emprego de hidróxido de amônio na reação de desacetilação proporciona uma melhoria de 24% na viscosidade da xantana, no entanto, a remoção de grupos acetil é mais eficiente com a utilização de hidróxido de sódio obtendo-se uma redução de 81% destes grupos.

5 REFERÊNCIAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC international**. 14th ed. Washington, 1987.

ASTM D1428-64. Annual Book of ASTM Standards, **American Society for Testing and Materials**, v.10, Philadelphia, 1981.

ÁVILA, S. R.; BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Relação entre conteúdo de ácido pirúvico e viscosidade da xantana sintetizada por diferentes cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni. In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2005, Florianópolis. **Anais do...** Florianópolis, 2005.

CADMUS, M. C.; ROGOVIN, S. P.; BURTON, K. A.; PITTSLEY, J. E.; KNUTSON, C. A.; JEANES, A. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from variant strain. **Canadian Journal of Microbiology**, v.22, p.942-948, 1976.

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 fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.20, p.1003-1014, 1978.

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.

CIVEROLO, E. L.; HATTINGH, M. J. *Xanthomonas campestris* pv pruni: cause of prunus bacterial spot. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993, p.60-64.

DAVIDSON, I. W. Production of polysaccharide by *Xanthomonas campestris* in continuous culture. **FEMS Microbiology Letters**, v.3, p.347-349, 1978.

- HAYNES, W. C.; WICKERHAM, L. J.; HESSELTINE, C. W. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. **Applied Microbiology**, v.3, p.361-368, 1955.
- HAYWARD, A. C. The hosts of *Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993, p.1-17.
- LOWSON, C. J.; SYMES, K. C. Oligosaccharides produced by partial acetolysis of xanthan gum. **Carbohydrate Research**, v.58, p.433-438, 1997.
- MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; GIL-TUNES, C.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.469-474, 2001.
- McCOMB, E. A.; McCREADY, R. M. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. **Analytical Chemistry**, v.29, n.5, p.819-821, 1957.
- PAKDEE, P.; TAKO, M.; YOKOHARI, T.; KINJYO, K.; HONGO, H.; YAGA, S. Synergistic interaction between xanthan and galactomannan isolated from *Leucaena leucephala* de wit. **Oyo Toshitsu Kagaku**, n.2, v.42, p.105-113, 1995.
- PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S. K.; BATSILAS, L.; PARAS, S. V.; KYRIAKIDIS, D. A.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in bath cultures. **Process Biochemistry**, v.37, p.73-80, 2001.
- PINCHES, A.; PALLENT, L. J. Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media. **Biotechnology Bioengineering**, v.28, p.1484-1496, 1986.
- RINAUDO, M.; MILAS, M.; LAMBERT, F.; VINCENDON, M. ¹H and ¹³C investigation of xanthan gum. **Macromolecules**, v.16, p.816-819, 1983.
- SLONEKER, J. H.; JEANES, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. **Canadian Journal of Chemistry**, v.40, p.2066-2071, 1962.
- SLONEKER, J. H.; ORENTAS, D. G. Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide. **Nature**, v.194, n.4827, p.478-479, 1962.
- SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepas 24 e 58. **Ciência e Engenharia**, v.8, n.2, p.115-123, 1999.
- TAKO, M.; NAKAMURA, S. Rheological properties of depyruvated xanthan in aqueous media. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.56, n.6, p.1585-1586, 1988.

TAKO, M.; NAKAMURA, S. Evidence for intramolecular associations in xanthan molecules in aqueous media. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.53, n.7, p.1941-1946, 1989.

TAKO, M. Synergistic interaction between deacylated xanthan and galactomannan. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v.10, n.4, p.619-633, 1991.

TAKO, M. Synergistic interaction between xanthan and konjac glucomannan in aqueous media. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.56, n.8, p.1188-1192, 1992.

TORRES, L. G.; BRITO, E.; GALINDO, E.; CHOPLIN, L. Viscous behaviour of xanthan aqueous solutions from a variant strain of *Xanthomonas campestris*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.75, n.1, p.58-64, 1993.

TORRESTIANA, B.; FUCIKOVSKY, L.; GALINDO, E. Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates. **Letters in Applied Microbiology**, v.10, p.81-83, 1990.

VENDRUSCOLO, C. T. **Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. isolada do solo cultivado com cana-de-açúcar da região de Ribeirão Preto**. 1995. 140f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; ZAMBIAZI, R.; SCAMPARINI, A. R. P. Heteropolysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv pruni C24. In: NISHINARI, K., **Hydrocolloids**. Amsterdam: Elsevier, 2000. p.187-191.

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

CONCLUSÕES GERAIS

- Os íons sódio e potássio foram removidos parcialmente pela técnica de diálise, e sua presença influencia nas propriedades reológicas do biopolímero sintetizado pelo patovar campestris e pruni.
- A propriedade de pseudoplasticidade foi mantida após a modificação química dos biopolímeros.
- A viscosidade da xantana comercial aumentou com o incremento da concentração de álcali empregada na reação de desacetilação, exceto quando foi empregado hidróxido de potássio, que provocou aumento somente com a maior concentração $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.
- A concentração da xantana comercial utilizada para efetuar a reação de desacetilação praticamente não influenciou na viscosidade das soluções e no grau de acetilação.
- As maiores viscosidades foram observadas utilizando a base fraca hidróxido de amônio na reação de desacetilação, sendo superior 53 e 24% a xantana adicionada de sais proveniente do patovar campestris e pruni, respectivamente.
- O grau de acetilação e a viscosidade da xantana diminuíram à medida em utilizou-se uma base mais forte e maior tempo e temperatura na reação de desacetilação.
- O grau de piruvatação das xantanas modificadas quimicamente não variou, demonstrando que não está relacionado à viscosidade e comprovando que estes grupos não influenciaram na reação de desacetilação.
- Os parâmetros de reação de desacetilação ideais para a xantana comercial também foram adequados para a xantana produzida pelo patovar pruni cepa 101, proporcionando a obtenção de um biopolímero desacetilado com qualidade reológica.

ABSTRACT

PINTO, Ellen P. **Desacetilação de xantana: influência no comportamento reológico**. 2005. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Chemical reactions are effectuated to remove acetyl groups of the side chain of the xanthan molecule. This structural change of the biopolymer is providing through of the deacetylation reaction, to give back one option to increase it is rheological behavior. First, to adjust one method to remove acetyl groups of the xanthan synthesized by *Xanthomonas campestris*, studied the influence of de reaction besides the content of acetylation and quality of the result biopolymer. The deacetylation reaction was carried out with variation of the parameters: biopolymer and alkalis concentration, time and temperature. Analyses of the content of sodium and potassium, of the degree of acetylation and pyruvatisation, of the viscosity and infrared spectroscopic were realized in the samples. It was observed that the purification of the biopolymer by dialysis technique propitiated a partial removal of the irons sodium and potassium and that these irons influence in the viscosity of the xanthan. The pseudoplasticity property was kept after of the chemical modification of biopolymer. The viscosity of the xanthan increased with the increment of the alkali concentration used in the deacetylation reaction, except when was used potassium hydroxide. The concentration of the biopolymer used in the deacetylation reaction practically did not influence in the viscosity of the solutions and acetylation degree. Biggest viscosities (680 e 910mPa.s in 10s⁻¹) were observed using the ammonium hydroxide 0,005 and 0,01mol L⁻¹, respectively; superior the xanthan added of salts (430mPa.s in 10s⁻¹). The degree of acetylation and the viscosity of the xanthan decreased when used a stronger alkali (0,01mol L⁻¹) and bigger time (12 hours) and temperature (65°C) in the deacetylation reaction. The degree of pyruvatisation of the modified xanthan did not vary, consequently not related to viscosity in the conditions tested. Deacetylated commercial xanthan showed 53% superior viscosity a xanthan added of salts with the use of the following reaction parameters: 0.5 and 1% of the biopolymer, 0.01mol L⁻¹ ammonium hydroxide, 25°C for 3 hours. However, a bigger removal of acetyl groups that 10% provide a 55% decrease of viscosity. The best parameters selected in the first stage was used to study the influence of the deacetylation in the properties of the xanthan synthesized by *Xanthomonas campestris* pv *pruni* strain 101, effectuated the same analysis. The purification of the biopolymer propitiated a partial removal of the sodium and potassium irons. The high viscosity (1170mPa.s in 10s⁻¹) was observed with the use of ammonium hydroxide decreased with the used of potassium (591mPa.s in 10s⁻¹) and sodium hydroxide

(490mPa.s in $10s^{-1}$). Verified that the viscosity and the degree of acetyl groups was maintained constant when the temperature of reaction increased of 25°C to 45°C. The utilization of ammonium hydroxide in the deacetylation reaction provide 24% increase in the xanthan viscosity, nevertheless, the removal of acetyl groups is more efficient with the utilization of sodium hydroxide obtained 81% reduction of these groups. The chemical modified not provided alteration in pyruvate degree, thus the pyruvate groups not influenced in viscosity of deacetylated xanthan. Thus, the ideal parameters of reaction also was suitable to xanthan produced by pathovar pruni strain 101, provide the obtainment of a deacetylated biopolymer with rheological quality.

Keywords: Xanthan. Deacetylation. Rheological behavior.

REFERÊNCIAS

BEMILLER, J. N.; WHISTLER, R. L. Carbohydrates. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 3ed, 1996, p.81-156.

BETLACH, M. R.; CAPAGE, M. A.; DOHERTY, D. H. HASSLER, R. A.; HENDERSON, N. M. VANDERSLINE, R. W.; WARD, M. B. Genetically engineered polymers: manipulation of xanthan biosynthesis. In: YALPANI, M. **Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications**. Amsterdam: Elsevier, 1987, p.35-50.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 1992. 223p.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 1992. 151p.

BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthan. In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers - biology, chemistry, biotechnology and applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. p. 259-291.

BRADSHAW, I. J.; NISBET, B. A.; KERR, M. H.; SUTHERLAND, I. W. Modified xanthan – its preparation and viscosity. **Carbohydrate Polymers**, v.3, p.23-38, 1983.

BRETAS, R. E. S.; SCURACCHIO, C. H. Reometria de placas paralelas e cone-placa. In: CANEVAROLO, S. V. J. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2003. p.385-404.

CADMUS, M. C.; ROGOVIN, S. P.; BURTON, K. A.; PITTSLEY, J. E.; KNUTSON, C. A.; JEANES, A. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from variant strain. **Canadian Journal of Microbiology**, v.22, p.942-948, 1976.

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 fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.20, p.1003-1014, 1978

CALLET, F.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Influence of acetyl and pyruvate contents on rheological properties of xanthan in dilute solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 9, p.291-293, 1987.

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.

CHALLEN, I. A. Xanthan gum: a multifunctional stabilizer for food products. In: NISHINARI, K.; DOI, E. **Food Hydrocolloids: Structure, Properties, and Functions**. New York: Plenum Press, 1994. p.135-140.

CHEETHAM, N. W. H.; PUNRUCKVONG, A. An HPLC method for the determination of acetyl and pyruvyl groups in polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v.5, p.399-406, 1985.

CHEETHAM, N. W. H.; NORMA, N. M. N. The effect of pyruvate on viscosity properties of xanthan. **Carbohydrate Polymers**, v.10, p.55-60, 1989.

COTTRELL, I. W.; KANG, K. S. Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food applications. **Developments in Industrial Microbiology**, v.9, p.117-131, 1978.

DAVIDSON, I. W. Production of polysaccharide by *Xanthomonas campestris* in continuous culture. **FEMS Microbiology Letters**, v.3, p.347-349, 1978.

DENTINI, M.; CRESCENZI, V.; BLASI, D. Conformational properties of xanthan derivatives in dilute aqueous solution. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.6, p.93-98, 1984.

DUCKWORTH, M.; YAPHE, W. Definitive assay for pyruvic acid in agar and other algal polysaccharides. **Chemistry and Industry**, v.23, p.747-748, 1970.

FLORES, F.; TORRES, L. G.; GALINDO, E. Effect of the dissolved oxygen tension during cultivation of *Xanthomonas campestris* on the production and quality of xanthan gum. **Journal of Biotechnology**, v.34, p.165-173, 1994.

GALINDO, E. Aspects of the process for xanthan production. **Institution of Chemical Engineers**, v.72, part. C, p.227-237, 1994.

GARCÍA-OCHOA, F.; CASAS, J. A.; MOHEDANO, A. F. Precipitation of xanthan gum. **Separation Science and Technology**, v.28, p.1303-1313, 1993.

GARCÍA-OCHOA, F.; CASAS, J. A. Apparent yield stress in xanthan gum solution at low concentration. **Chemical Engineering Journal**. v.53, p.41-46, 1994.

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

HADJIVASSILIOU, A. G.; RIEDER, S. V. The enzymatic assay of pyruvic and lactic acids: a definitive procedure. **Clinica Chimica Acta**, v.19, p.357-361, 1968.

HARDING, N. E.; CLEARY, J. M.; IELPI, L. Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. In: HUI, Y. H.; KHACHATOURIANS, G. G. **Food Biotechnology Microorganisms**. VCH, 1994. p.495-514.

HASSLER, R. A.; DOHERTY, D. H. Genetic engineering of polysaccharide structure: production of variants of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Progress**, v.6, p.182-187, 1990.

HAYWARD, A. C. The hosts of *Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993, p.1-17.

HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. **Journal of Biological Chemistry**, v.180, p.249-261, 1949.

HOLZWARTH, G.; OGLETREE, J. Pyruvate-free xanthan. **Carbohydrate Research**, v.76, p.277-280, 1979.

JANSSON, P. E.; KEENE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v.45, p.275-282, 1975.

JEANES, A.; PITTSLEY, J. E.; SENTI, F. R. Polysaccharide B-1459: a new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. **Journal of Applied Polymer Science**, v.5, p.519-526, 1961.

JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v.28, n.5, p.34-38, 1974.

KANG, K. S.; PETTIT, D. J. Xanthan, gellan, wellan, and rhamnan. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. **Industrial gums**. New York: Academic Press, 1993, p.341-398.

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

KAWANO, Y. Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho. In: CANEVAROLO, S. V. J. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2003, p.17-39.

KENNEDY, J. F.; JONES, P.; BARKER, S. A.; BANKS, G. T. Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures. **Enzyme and Microbiology Technology**, v.4, p.39-43, 1982.

KOEPSSELL, H. J.; SHARPE, E. S. Microdetermination of pyruvic and α -ketoglutaric acids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.38, p.443-449, 1952.

- LILLY, V. G.; WILSON, H. A.; LEARCH, J. G. Bacterial polysaccharides II. Laboratory- scale production of xanthan gum. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.6, p.105-112, 1958.
- LOWSON, C. J.; SYMES, K. C. Oligosaccharides produced by partial acetolysis of xanthan gum. **Carbohydrate Research**, v.58, p.433-438, 1997.
- MANRESA, A.; ESPUNY, M. J.; GUINEA, J.; COMELLES, F. Characterization and production of a new extracellular polymer from *Pseudomonas* sp. GSP-910. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.347-351, 1987.
- McCOMB, E. A.; McCREADY, R. M. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. **Analytical Chemistry**, v.29, n.5, p.819-821, 1957.
- MELTON, L. D.; MINDT, L.; REES, D. A.; SANDERSON, G. R. Covalent structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v.46, p.245-257, 1976.
- MILAS, M.; RINAUDO, M.; TINLAND, B. Conformational investigation on the bacterial polysaccharide xanthan. **Carbohydrate Research**, v.76, p.189-196, 1979.
- MOLECULAR Structure of Xanthan Gum. Disponível em:
<http://www.cpkelco.com/xanthan/industrial/molecular_structure.html> Acesso em: 20 jun. 2005.
- MORRIS, E. R. Molecular origin of xanthan solution properties. In: SANDFORD, P. A.; LASKIN, A. **Extracellular microbial polysaccharides**. ACS Symposium Series v. 45, Washington, D. C.: American Chemical Society, 1977. p.81-89.
- MORRIS, E. R. Rheology of hydrocolloids. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. **Gums and stabilizers for the food industry**. Oxford: Pergamon Press, 1984, p.57-78.
- MORRIS, V. J. Bacterial Polysaccharides. In: STEPHEN, A. M. **Food Polysaccharide and their applications**. New York: Basel Marcel Dekker, 1995, p.341-375.
- MORRIS, E. R. Rheology of xanthan: suspension of particles and stabilization of emulsions. **Food & Ingredients Journal of Japan**, v.167, p.31-36, 1996.
- MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Química orgânica**. 13 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.
- NAVARRO, R. F. **Fundamentos de reologia de polímeros**. Caxias do Sul: EDUCS, 1997. 256p.
- PACE, G. W.; RIGHELATO, R. C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, v.15, p.41-70, 1981.

- PAKDEE, P.; TAKO, M.; YOKOHARI, T.; KINJYO, K.; HONGO, H.; YAGA, S. Synergistic interaction between xanthan and galactomannan isolated from *Leucaena leucephala* de wit. **Oyo Toshitsu Kagaku**, n.2, v.42, p.105-113, 1995.
- PETERS, H-U; SUH, I. S.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W. D. The pyruvate content of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation. **Biotechnology Letters**, v.15, p.565-566, 1993.
- PHILLIPS, J. C.; MILLER, J. W.; WERNAU, W. C.; TATE, B. E.; AUERBACH, M. H. A high-pyruvate xanthan for EOR. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v.25, p.594-602, 1985.
- RAO, M. A. Rheology of liquid foods-a review. **Journal of Texture Studies**, v.8, p.135-168, 1977.
- REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. v.3. Pelotas: Gráfica Universitária, 2000. 218p.
- RINAUDO, M.; MILAS, M.; LAMBERT, F.; VINCENDON, M. 1H and 13C investigation of xanthan gum. **Macromolecules**, v.16, p.816-819, 1983.
- ROCKS, J. K. Xanthan gum. **Food Technology**, v.25, p.476-483, 1971.
- SANDFORD, P. A.; PITTSLEY, J. E.; KNUTSON, C. A.; WATSON, P. R.; CADMUS, M. C.; JEANE, A. Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: characterization of xanthan products of differing strains. In: SANDFORD, P. A.; LASKINS, A. **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington, D. C.: American Chemical Society, 1977. p.192-210.
- SHATWELL, K. P.; SUTHERLAND, I. W.; DEA, I. C. M.; ROSS-MURPHY, S. B.; The influence of acetyl and pyruvate substituents on the helix-coil transition behavior of xanthan. **Carbohydrate Research**, v.206, p. 87-103. 1990.
- SHATWELL, K. P.; SUTHERLAND, I. W. Influence of the acetyl substituent on the interaction of xanthan with plant polysaccharides – I. Xanthan – Locust bean gum systems. **Carbohydrate Polymers**, v.14, p. 29-51. 1991.
- SHAW, D. J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1975, 180p.
- SHU, Ch-H; YANG, Sh-T. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Bioengineering**, v.35, p.454-468, 1990.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora, 2000, 460p.

SLONEKER, J. H.; JEANES, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. **Canadian Journal of Chemistry**, v.40, p.2066-2071, 1962.

SLONEKER, J. H.; ORENTAS, D. G. Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide. **Nature**, v.194, n.4827, p.478-479, 1962.

SMITH, I. H.; SYMES, K. C.; LAWSON, C. J. Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. **International of Journal Biological Macromolecules**, v.3, p.129-134, 1981.

SMITH, J. H.; PACE, G. W. Recovery of microbial polysaccharides. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.32, p.119-129, 1982.

SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepas 24 e 58. **Ciência e Engenharia**, v.8, n.2, p.115-123, 1999.

STANKOWSKI, J. D.; MUELLER, B. E.; ZELLER, S. G. Location of second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. **Carbohydrate Research**, v.241, p.321-326, 1993.

STOKKE, B. T.; ELGSAETER, A.; SMIDSRØD, O. Electron microscopic study of single- and double-stranded xanthan. **International of Journal Biological Macromolecules**, v.8, p.217-225, 1986.

SUTHERLAND, I. W. *Xanthomonas* polysaccharides: improved methods for their comparison. **Carbohydrate Polymers**, v. 1, p.107-115, 1981.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Advances Microbial Physiology**, v. 23, p.80-142, 1982.

SUTHERLAND, I. W. Physiology and industrial production. In: BADDILEY, J.; CAREY, N. H.; HIGGINS, I. L.; POTTER, W. G. **Biotechnology of microbial exopolysaccharides**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990, p.88-70.

SUTHERLAND, I. W.; TAIT, M. I. Biopolymers. **Encyclopedia of Microbiology**, v.1, p.339-349, 1992.

SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993, p.363-388.

SUTHERLAND, I. W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v.12, p.393-448, 1994.

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

TAIT, M. I.; SUTHERLAND, I. W.; CLARKE-STURMAN, A. J. Effect of growth conditions on the production composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. **Journal of General Microbiology**, v.132, p.1483-1492, 1986.

TAIT, M. I.; SUTHERLAND, I. W. Synthesis and properties of a mutant type of xanthan. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.475-460, 1989.

TAKO, M.; NAKAMURA, S. Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous media. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.48, n.12, p. 2887-2993, 1984.

TAKO, M.; NAKAMURA, S. Synergistic interactions between xanthan and guar gum. **Carbohydrate Research**, v.138, p.207-213, 1985.

TAKO, M.; NAKAMURA, S. Rheological properties of depyruvated xanthan in aqueous media. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.56, n.6, p.1585-1586, 1988.

TAKO, M.; NAKAMURA, S. Evidence for intramolecular associations in xanthan molecules in aqueous media. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.53, n.7, p.1941-1946, 1989.

TAKO, M. Synergistic interaction between deacylated xanthan and galactomannan. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v.10, n.4, p.619-633, 1991.

TAKO, M. Synergistic interaction between xanthan and konjac glucomannan in aqueous media. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.56, n.8, p.1188-1192, 1992.

TAYLOR, K. C.; NASR-EL-DIN, H. A. Xanthan biopolymers: a review of methods for the determination of concentration and for the measurement of acetate and pyruvate content. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v.9, p.273-279, 1993.

TRILSBACH, G. F.; PIELKEN, P.; HAMACHER, K.; SAHM, H. Xanthan formation by *Xanthomonas campestris* under different culture conditions. In: 3rd EUROPEAN CONGRESS OF BIOTECHNOLOGY, 1984, Weinheim. **Anais do...** Weinheim: Verlag Chemie, 1984. p.65-70.

VANDERSLICE, R. W.; DOHERTY, D. H.; CAPAGE, M. A.; BETLACH, M. R.; HASSLER, R. A.; HENDERSON, N. M.; RYAN-GRANIERO, J.; TECKLENBURG, M. Genetic engineering of polysaccharide structure in *Xanthomonas campestris*. In: CRESCENZI, V.; DEA, I. C. M.; PAOLETTI, S.; STIVALA, S. S.; SUTHERLAND, I. W. **Biomedical and biotechnological advances in industrial polysaccharides**. New York: Gordon & Breach, 1989, p.145-156.

VOGEL, A. I. **Análise Química Quantitativa**. 5.ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos Científicos Editora, 1992, 712p.