UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial



Dissertação

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DIGESTÃO ÁCIDA PARA DETERMINAÇÃO DE SAIS EM XANTANA E POTENCIALIZAÇÃO REOLÓGICA DE XANTANA DE *Xanthomonas arboricola* pv pruni POR TROCA IÔNICA

Paula Michele Abentroth Klaic

Pelotas, 2010

PAULA MICHELE ABENTROTH KLAIC

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DIGESTÃO ÁCIDA PARA DETERMINAÇÃO DE SAIS EM XANTANA E POTENCIALIZAÇÃO REOLÓGICA DE XANTANA DE Xanthomonas arboricola pv pruni POR TROCA IÔNICA

> Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial.

Comitê de Orientação: Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira Prof^a. Dr^a. Claire Tondo Vendruscolo Prof^a. Dr^a. Lígia Furlan Dados de catalogação na fonte: Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901 Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

III.Furlan, Lígia. IV.Título.

 K63d Klaic, Paula Michele Abentroth Desenvolvimento de método de digestão ácida para determinação de sais em xantana e potencialização reológica de xantana de Xanthomonas arboricola pv pruni por troca iô-nica / Paula Michele Abentroth Klaic ; orientador Angelita da Silveira Moreira ; co-orientador Claire Tondo Vendruscolo e Lígia Furlan. – Pelotas, 2010. – 111f. : il. – Dissertação (Mes-trado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.
 1.Xantana. 2.Reologia. 3.Xanthomonas arboricola pv pruni. 4.Digestão ácida. 5.Sódio. 6.Cálcio. 7.Troca iônica I.Moreira, Angelita da Silveira. II.Vendruscolo, Claire Tondo.

CDD: 664.06

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira – UFPel (Presidente/Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Caroline Dellinghausen Borges – UFPel

Dr^a. Adriane Medeiros Nunes

Dr^a. Patrícia Silva Diaz

Dedíco,

Ao meu amado esposo Éder, fiel e compreensivo companheiro e aos meus querídos país Nelson e Rute, com amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus que guiou meus passos para vencer mais esta etapa de minha vida.

Ao meu esposo Éder por todo amor e compreensão.

Aos meus pais por serem meus maiores incentivadores.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

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

À Professora Dr^a. Angelita da Silveira Moreira pela valiosa orientação e amizade durante a minha trajetória acadêmica.

Às Professoras Claire Tondo Vendruscolo e Lígia Furlan pela orientação.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial pelos ensinamentos.

Aos membros da banca pelas contribuições dadas a este trabalho.

Ao Laboratório de Metrologia Química do Departamento de Química Analítica e Inorgânica da UFPeI, em especial ao Professor Dr. Anderson Schwingel Ribeiro e a Dr^a. Adriane Medeiros Nunes, pelo auxílio e oportunidade de realizar parte da pesquisa, contribuindo para o resultado final do trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biopolímeros, em especial, Amanda, Carla, Fernanda, Fernando, Joyce, Leidi, Lizandra e Matheus, pelo auxílio, amizade e apoio.

A todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

"O que ímporta não é o que você tem na vída, mas quem você tem na vída"

Willian Shakespeare

Resumo

KLAIC, Paula Michele Abentroth. Desenvolvimento de método de digestão ácida para determinação de sais em xantana e potencialização reológica de xantana de *Xanthomonas arboricola* pv pruni por troca iônica. 2010. 111f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A xantana é um polissacarídeo aniônico cujas propriedades são afetadas pela natureza e teor de cátions ligados à sua estrutura molecular. Variações na concentração desses íons podem exercer forte efeito nas propriedades do biopolímero e em suas aplicações. Com o objetivo de tornar mais rápida e precisa a análise de cátions metálicos em xantana, um método simples, rápido, eficiente e econômico, guando comparado ao método tradicional, foi desenvolvido. As amostras foram tratadas em presenca de ácido nítrico a 100°C por 2h e, após resfriamento a temperatura ambiente, ácido perclórico foi adicionado, a mistura foi novamente aquecida por mais 1h. Após a completa digestão da amostra, os teores de sódio e potássio e de cálcio e magnésio foram determinados por espectrometria de emissão atômica e de absorção atômica, respectivamente. A eficiência do método foi verificada através da comparação dos resultados com o método convencional de decomposição por calcinação. O método de digestão ácida requer menor quantidade de amostra não havendo diferenca significativa entre os resultados pelo teste T pareado a um nível de 95% de confiança. Objetivando avaliar a influência das condições de pH nas características físicas e químicas, bem como no rendimento da xantana sintetizada por Xanthomonas pruni, foram produzidas xantanas em pH livre, 7 e 9. As condições de pH utilizadas durante o processo fermentativo afetaram a produção, composição química e viscosidade do polímero. Xantanas sintetizadas sob condições neutras e alcalinas tiveram maior produção e viscosidade. Com o objetivo de aumentar a viscosidade das xantanas produzidas sob pH7 e 9 um método pós-fermentativo de troca iônica foi proposto. Após a troca iônica de soluções de xantana a 1% (p/v), quantidades crescentes de Na⁺ (0,5-15% p/p) e de Ca²⁺ (0,5-10% p/p), em relação ao teor de xantana, foram adicionadas. Uma pequena redução na viscosidade das soluções de xantana Xa-pH9 foi observada antes do processo de recuperação, em oposição, não foi observada variação na viscosidade de soluções de xantana Xa-pH7. Um grande incremento na viscosidade foi observado em soluções (1% p/v) de ambas as xantanas preparadas com o polímero recuperado. O maior incremento na viscosidade foi proporcionado pela adição de 5% de Na⁺ e 0,5% de Ca²⁺ para ambas as xantanas. A modificação química através do processo pós-fermentativo de troca iônica resultou em xantanas com propriedades reológicas diferenciadas e com amplas possibilidades de aplicação.

Palavras Chave: xantana, *Xanthomonas arboricola* pv pruni, digestão ácida, sódio e cálcio, troca iônica, reologia.

Abstract

KLAIC, Paula Michele Abentroth. Development of acid digestion method for determination of salts in xanthan and xanthan rheological enhancement of *Xanthomonas arboricola* pv pruni by ion exchange. 2010. 111f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Xanthan is an anionic polysaccharide whose properties are affected by the type and content of cations associated in its molecular structure. Variations in the concentration of these ions can exert a strong effect on the properties of the biopolymer and its applications. Aiming to become faster and more accurate analysis of metal ions in xanthan, a simple, fast, efficient and economical method was developed. The samples were treated in the presence of nitric acid at 100°C for 2h, and, after cooling to room temperature, perchloric acid was added, and the mixture was again heated for more than 1h. After complete digestion of the samples, the content of sodium and potassium and of calcium and magnesium were determined by flame atomic emission and flame atomic absorption spectrometry, respectively. The accuracy of the method was verified by comparing the results with those obtained from the conventional decomposition by calcination method. The method of acid digestion requires less amount of sample, showed good response and there were no significant differences between the results at the 95% confidence level. Aiming evaluate the influence of pH conditions on the physical and chemical characteristics, as well on the yield of xanthan synthesized by Xanthomonas pruni, xanthans were produced at uncontrolled pH, pH7 and 9. The conditions of pH used during fermentation process affected yield, chemical composition and viscosity of polymer. Xanthans synthesized under neutral and alkaline conditions had the higher yield and viscosity. Aiming increase the viscosity of xanthans produced under pH7 and 9 a post-fermentation process by ion exchange was proposed. After ion exchange of xanthan solutions at 1% (w/v), increasing amounts of Na⁺ (0.5-15% w/w) and of Ca²⁺ (0.5-10% w/w) in relation to the xanthan content, were added. A small reduction in viscosity of xanthan Xa-pH9 solutions was observed before the recovery process, in opposition, no variation was observed in viscosity of xanthan Xa-pH7 solutions. A great increase in viscosity was observed in solutions (1% w / v) of both xanthans prepared with the polymer recovered. The highest increase in viscosity was proportionate by addition of 5% Na^+ and 0.5% of Ca^{2+} for both xanthans. The chemical modification through post-fermentation process of ion exchange resulted in xanthans with different rheological properties and wide applications.

Keywords: xanthan, *Xanthomonas arboricola* pv pruni, acid digestion, sodium and calcium, ion exchange, rheology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Unidade de repetição pentassacarídica da goma xantana	23
Figura 2 – Moléculas de goma xantana por microscopia de força atômica	25
Figura 3 – Processo de adsorção dos cátions da amostra na matriz	42
Figura 4 – Processo de regeneração da resina de troca iônica.	43

IMPROVEMENT OF VISCOSITY OF XANTHAN PRODUCED BY Xanthomonas arboricola pv pruni BY ION EXCHANGE

Figure 2 – Infrared spectra, in KBr tablet of xanthans produced at uncontrolled pH, pH7 and pH9......77

LISTA DE TABELAS

NEW METHOD OF XANTHAN MINERALIZATION FOR Na, K, Ca AND Mg DETERMINATION

 Table 4 Analytical results for xanthan samples, obtained with different sample

 preparation methods, by flame atomic emission spectrometry

 57

Table 5 Figures of merit for the determination of Ca and Mg in xanthan by flame atomic absorption spectrometry after treatment with acid digestion and calcination .58

IMPROVEMENT OF VISCOSITY OF XANTHAN PRODUCED BY Xanthomonas arboricola pv pruni BY ION EXCHANGE

Table 2 – Carboxyl,	pyruvate and	l acetyl conte	nt (% w/w) of	f xanthan	produced by
different pH condition	IS				76

Table 3 – Sodium, potassium, calcium and magnesium content (% w/w) of xanthan produced by different pH conditions......79

Table 5- Recovery of xanthan and sodium and calcium content after ion exchange.83

Table 7 – Apparent viscosity (mPas) of 1% (w/v) aqueous solutions of xanthans after ion exchange and addition of Na⁺ and Ca²⁺ measures after recovery85

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
INTRODUÇÃO GERAL	15
1 Revisão de Literatura	17
1.1 Xantana	17
1.1.1 Aplicações	18
1.1.2 Produção	20
1.1.3 Estrutura	22
1.1.4 Composição Química	27
1.1.4.1 Influência do microrganismo na composição química	28
1.1.4.2 Influência do meio e das condições operacionais na composição quír da xantana	nica 29
1.1.5 Propriedades Físicas	31
1.1.5.1 Influência do meio e das condições operacionais nas propriedades reológicas da xantana	33
1.1.5.2 Influência da composição química nas propriedades reológicas da xa	antana 34
1.1.5.3 Influência de sais nas propriedades reológicas da xantana	36
1.1.6 Modificações Químicas	40
1.2 Troca Iônica	41
1.3 Determinação de Na, K, Ca e Mg em xantana	44
NEW METHOD OF XANTHAN MINERALIZATION FOR Na, K, Ca AN	ID Mg
DETERMINATION	47
Abstract	47
1. Introduction	48

	2. Materials and methods	.50
	2.1. Materials	.50
	2.1.1. Bacterial strain	.50
	2.1.2. Xanthans	.50
	2.1.3. Reagents	.50
	2.1.4. Apparatus and instrumental parameters	.51
	2.1.4.1. Flame photometer	.51
	2.1.4.2. Atomic Absorption Spectrophotometer	.51
	2.2. Methods	.51
	2.2.1. Xanthan production	.51
	2.2.2. Sample treatment	.52
	2.2.2.1. Calcination	.52
	2.2.2.2. Acid digestion	.52
	2.2.3. Procedure	.53
	2.2.4. Statistical analysis	.53
	3. Results and discussion	.53
	3.1. Preliminary studies	.53
	3.1.1. Evaluation of conventional procedure for xanthan sample preparation	.53
	3.1.2. Optimization of digestion in acid	.55
	3.2. Sodium and potassium analysis	.56
	3.3. Calcium and magnesium analysis	.58
	4. Conclusions	.60
	Acknowledgements	.61
	References	.61
11	MPROVEMENT OF VISCOSITY OF XANTHAN PRODUCED BY Xanthomo	nas
а	<i>rboricola</i> pv pruni BY ION EXCHANGE	.66
	Abstract	.66
	1 Introduction	.67
	2 Materials and methods	.69
	2.1 Bacterial strain	.69
	2.2 Xanthan production	.69
	2.3 Chemical and physical characterization	.70
	2.3.1 Nitrogen, ash and moisture content	.70

	2.3.2 Viscosity of xanthans produced	70
	2.3.3 Carboxyl, pyruvate and acetyl content	70
	2.3.4 Infrared Spectroscopy	71
	2.3.5 Sodium, potassium, calcium and magnesium content	71
	2.3.6 Qualitative determination of monosaccharide and acid derivates	71
	2.4 Ion-exchange	72
	2.5 Statistical analysis	72
	3 Results and discussion	72
	3.1 Yield and viscosity of xanthan produced under different pH conditions	72
	3.2 Nitrogen, ash and moisture content	74
	3.3 Carboxyl, pyruvate and acetyl content	75
	3.4 Infrared Spectroscopy	77
	3.5 Sodium, potassium, calcium and magnesium content	78
	3.6 Qualitative determination of monosaccharide and acid derivates	80
	3.7 Ion-exchange	82
	4 Conclusions	90
	Acknowledgements	90
	References	90
С	ONCLUSÕES GERAIS	98
R	EFERÊNCIAS GERAIS	99

14

INTRODUÇÃO GERAL

A xantana é um heteropolissacarídeo aniônico de alto peso molecular, produzido extracelularmente através da fermentação de carboidratos por bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* (JANSSON; KENNE; LINDBERG, 1975; GALINDO, 1994; ROSS-MURPHY; MORRIS; MORRIS, 1983). Foi descoberta nos anos 50 por pesquisadores do *Northern Regional Research Laboratory* (NRRL) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002) e foi o primeiro biopolímero produzido em escala industrial utilizado em alimentos (ROSALAM; ENGLAND, 2006). Teve sua aprovação para utilização em alimentos no Brasil em 1965 através do decreto Lei nº 55.871 (BRASIL, 1965).

A xantana encontra-se entre o seleto grupo de biopolímeros produzidos comercialmente em grande escala (SUTHERLAN, 1996). A produção industrial é realizada utilizando-se o patovar campestris (BECKER et al., 1998; ROSELAM; ENGLAND, 2006); porém, a produção de xantana pelo patovar pruni vem sendo intensivamente estudada por pesquisadores do Núcleo de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas (Pelotas/RS – Brasil) (ANTUNES, 2000; BORGES et al., 2008; BORGES et al. 2009a; DIAZ, 2002; MOREIRA et al., 2001; MOREIRA, 2002; PINTO, 2005; VENDRUSCOLO et al., 2000).

A funcionalidade apresentada pela xantana é uma consequência direta de sua composição química e estrutura única (CASAS; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000; CHALLEN, 1994; BORGES et al., 2008; MOREIRA et al. 2001). A estrutura terciária confere alta viscosidade às soluções de xantana (GALINDO, 1994; MORRIS, 1984) e a conformação rígida ordenada é responsável, em parte, pelas notáveis propriedades reológicas da molécula (CAPRON; BRIGAND; MULLER,

1997). Por outro lado, a estrutura e seu tamanho molecular (CADMUS et al., 1978; GARCÍA-OCHOA et al., 2000;) e a composição química (BORGES et al., 2009a; BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; MOREIRA, 2002; PAPAGIANNI et al., 2001) da xantana são influenciados por modificações nas condições operacionais, espécie, patovar ou cepa.

A conformação ordenada da goma xantana é estabilizada por sais (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002, KATZBAUER, 1998). Essa ordenação da conformação é responsável por suas extraordinárias propriedades reológicas (CAPRON; BRIGAND; MULLER, 1997) e pela estabilidade do polímero. Portanto, a presença de sais é necessária para ótima funcionalidade da xantana (KATZBAUER, 1998) e para incremento da estabilidade térmica do polímero (BORGES et al., 2009a, KIERULF; SUTHERLAND, 1988; XIE; LECOURTIER, 1992).

A determinação do conteúdo de sais mono e bivalentes é uma das análises envolvidas no controle de qualidade da xantana ao final do processo de produção (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Para tanto, a amostra deve ser convenientemente preparada, de modo que a porção orgânica seja destruída, restando apenas seu conteúdo inorgânico.

É possível modificar quimicamente a estrutura da molécula da xantana e, consequentemente, suas propriedades (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002) através de tratamentos pós-fermentativos. Elevar a qualidade de um biopolímero através de modificações químicas pode ser mais simples e eficaz do que produzir um novo polímero.

Este trabalho teve como objetivos: desenvolver um novo método, simples e de fácil execução, para mineralização de amostras de xantana por digestão ácida para determinação de Na, K, Ca e Mg; avaliar a influência do pH no rendimento e nas características físicas e químicas da xantana sintetizada por *Xanthomonas arboricola* pv pruni cepa 101 e potencializar as propriedades reológicas das xantanas produzidas através de processo pós-fermentativo de troca iônica.

1 Revisão de Literatura

1.1 Xantana

Goma xantana é um polissacarídeo aniônico extracelular de alto peso molecular produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas* (JANSSON; KENNE; LINDBERG, 1975; GALINDO, 1994; ROSS-MURPHY; MORRIS; MORRIS, 1983), através da fermentação de carboidratos por culturas puras (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002).

A descoberta da goma xantana ocorreu nos anos 50, pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos quando cientistas do *Northern Regional Research Laboratory* (NRRL) pesquisavam microrganismos que produzissem uma goma de interesse industrial solúvel em água (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002). A xantana foi o primeiro biopolímero produzido industrialmente (ROSALAM; ENGLAND, 2006), a primeira produção foi em 1960 e a produção em escala comercial por volta de 1964 (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; GARCÍA-OCHOA et al., 2000), sua aprovação para utilização em alimentos no Brasil ocorreu em 1965 pelo decreto Lei nº 55.871 (BRASIL, 1965), enquanto nos Estados Unidos só ocorreu em 1969 pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (PRADELLA, 2006; ROSALAM; ENGLAND, 2006) e em 1974 pela FAO/OMS (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*/Organização Mundial da Saúde) (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002).

A xantana tem propriedades reológicas superiores quando comparada à outros polissacarídeos microbianos; isto somado à fácil obtenção e reprodutibilidade de lotes lhe permite competir com um grande número de gomas naturais. Estima-se que o crescimento anual da produção industrial de xantana ocorra a uma taxa de 5-10% (ROSALAM; ENGLAND, 2006) e seu sucesso comercial está baseado em suas

importantes propriedades reológicas (BECKER et al., 1998). De uma forma geral só um pequeno número de biopolímeros são produzidos comercialmente em grande escala, e dentre estes se encontra a xantana (SUTHERLAN, 1996). A goma xantana é considerada o polissacarídeo bacteriano comercialmente mais importante (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Industrialmente, a xantana é produzida pela bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* pv campestris (BECKER et al., 1998; ROSELAM; ENGLAND, 2006), que causa a chamada podridão negra (*black rot*) em crucíferas como couve-flor, repolho e brócolis (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; GALINDO, 1994). Além do patovar campestris, outros produzem polissacarídeos, dentre estes os patovares phaseoli, malvacearum, carotae, citrumelo e jugladis. Alguns autores (ANTUNES, 2000; BORGES et al., 2008; BORGES et al. 2009a; DIAZ, 2002; MOREIRA et al., 2001; MOREIRA, 2002; PINTO, 2005; VENDRUSCOLO et al., 2000) vêm estudando intensamente a produção de xantana pelo patovar pruni.

1.1.1 Aplicações

Sem a utilização de estabilizantes e espessantes, muitos alimentos, como os semi preparados, não seriam possíveis (KATZBAUER, 1998). A goma xantana possui uma grande linha de aplicações em indústrias alimentares e não alimentares devido às suas propriedades físicas (BECKER et al., 1998; SUTHERLAND, 1996). A associação de cadeias na xantana forma uma rede tridimensional que faz dela um eficiente viscosificante, agente suspensivo e estabilizador de emulsões (BECKER et al., 1998; KATZBAUER, 1998; VUYST; LOO; VANDAMME, 1987), sendo extensivamente utilizada em fluidos de perfuração de poços de petróleo. Uma importante e particular aplicação é seu uso na recuperação melhorada de petróleo (VUYST; LOO; VANDAMME, 1987) por não ser sujeita à degradação de cisalhamento (TAYLOR; NASR-EL-DIN, 1998), ter excelente compatibilidade com sais e ser resistente a degradação por temperatura (MCNELLY; KANG, 1973; ROSALAM; ENGLAND, 2006).

A viscosidade de soluções de xantana em água decresce rapidamente com o aumento da tacha de cisalhamento. Este é um processo instantâneo e reversível, o que torna a xantana altamente pseudoplástica (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; MCNELLY; KANG, 1973). Esta pseudoplasticidade garante um elevado grau de mistura, bombeamento e capacidade de escoamento na indústria (KATZBAUER, 1998) e reforça qualidades sensoriais em alimentos, como liberação de sabor e sensação não gomosa na boca (CHALLEN, 1994).

Na indústria de alimentos é expressivamente utilizada, principalmente pela sua ampla gama de compatibilidade com muitos ingredientes alimentares, não alimentares e aditivos (CHALLEN, 1994). A xantana é compatível com proteínas, lipídios e outros polissacarídeos como o amido e pectina (SUTHERLAND, 1998), podendo ser utilizada em produtos de panificação, onde aumenta a vida de prateleira e contribui para a estrutura. A goma é utilizada em misturas secas para produtos como molhos, recheios e sobremesas devido ao fato de dissolver facilmente em água fria ou quente proporcionando rápido incremento da viscosidade. Confere boa consistência em xaropes ou coberturas de chocolate; dá corpo a bebidas, além de estabilizar e suspender polpas de frutas em bebidas por um longo período. A xantana também é utilizada em produtos combinada a outros polissacarídeos como carboximetilcelulose e goma guar (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; KATZBAUER, 1998). A adição de goma xantana melhora a estabilidade de alimentos congelados através da ligação da água livre, evitando a comum sinérese (KATZBAUER, 1998); age como estabilizante em sorvetes e em substitutos de clara de ovo à base de proteína de soro e gelatina; previne aderência e adiciona corpo em géis de frutas, além de proporcionar viscosidade a molhos utilizados em pizza, inibindo sua absorção pela massa (PRADELLA, 2006). A goma xantana é estável em uma ampla faixa de pH (SUTHERLAND, 2001), fato importante para aplicações em alimentos ácidos como molhos para salada e produtos à base de frutas (KATZBAUER, 1998). Outra vantagem de sua utilização em produtos alimentares é que a concentração necessária para conferir as propriedades desejadas é pequena sem afetar o sabor do produto final (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

A xantana também possui importante aplicação em produtos farmacêuticos, produtos de higiene e cosméticos. Na indústria farmacêutica é utilizada em emulsões ou suspensões impedindo a separação de ingredientes não solúveis, já em cosméticos a maior utilização é em cremes e géis, proporcionando suavidade e maciez devido a sua pseudoplasticidade. Em linhas de higiene a principal aplicação é em cremes dentais e xampus (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; KATZBAUER, 1998).

1.1.2 Produção

Para se ter uma boa produção de xantana é necessária uma linhagem de *Xanthomonas* confiável e bem preservada, que normalmente é cultivada em um meio rico para reproduzir a bactéria constituindo o inóculo (GALINDO, 1994, MCNEELY; KANG, 1973). A estabilidade da bactéria e sua correta preservação são os principais responsáveis pela reprodutibilidade requerida num processo de fermentação industrial (GALINDO, 1994).

Para síntese de polissacarídeos microbianos o meio de cultivo deve conter uma fonte de carboidratos, de nitrogênio e sais adequados (KATZBAUER, 1998); para produção comercial o substrato utilizado é a glicose, porém não é considerada uma matéria prima econômica devido ao preço crescente no mercado (ROSALAM; ENGLAND, 2006). Podem-se utilizar produtos químicos puros ou ainda substratos de origem local e de fácil obtenção, reduzindo os custos de produção. Outra prática comum é a utilização de meios semi-sintéticos que contenham produtos químicos relativamente puros além de substratos de resíduos (SUTHERLAND, 1996) como, por exemplo, soro de leite (ANTUNES, 2000; FU; TSENG, 1990; KONICEK; KONICKOVÁ-RADOCHOVÁ, 1992), água de maceração de arroz (ANTUNES, 2000) e resíduos agrícolas (MORENO et al., 1998). Meios ricos em carboidratos proporcionam uma ótima biossíntese de xantana, fornecendo a energia requerida para tal, além de serem necessários para constituição da molécula de xantana (VUYST; LOO; VANDAMME, 1987). Aproximadamente 70% da fonte de carbono podem ser transformadas em polissacarídeo sob ótimas condições de fermentação (SUTHERLAND, 2001). Alterações no meio como diferentes substratos e limitação de nutrientes não influenciam a estrutura primária, mas afetam a massa molecular e o rendimento da xantana (BECKER et al., 1998, GARCÍA-OCHOA et al., 2000). O rendimento da xantana depende da composição do meio e da cepa utilizada para sua obtenção (MOREIRA et al., 2001).

As condições operacionais empregadas no processo fermentativo exercem influência no rendimento e na qualidade da xantana produzida. A produção de xantana é realizada empregando-se temperaturas entre 25 e 34°C, sendo muito

comum a utilização de 28 e 30°C, em fermentadores aerados e normalmente dotados de agitação por períodos variados de 24 a 144h (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Psomas, Liakopoulou-Kyriakides e Kyriakidis (2007) estudaram os efeitos individuais e interativos de três variáveis independentes sobre a produção de goma xantana e de biomassa por *Xanthomonas campestris ATCC 33913*: taxa de agitação (100-600rpm), temperatura (25-35°C), e tempo de cultivo (24-72h) e observaram que os níveis mais elevados de goma xantana e biomassa podem ser produzidos em valores de agitação crescente e o tempo de fermentação num espaço de 72h, ajustando-se a temperatura de fermentação entre 25 e 35°C, sendo que o valor máximo de produção de xantana foi alcançado nas condições de 600rpm, 30°C e 72h e de biomassa foi obtido a 600rpm, 25°C e 72h. Os autores também observaram que rendimentos mais elevados de produção de xantana podem ser conseguidos aumentando o tempo de cultivo, desde que haja nutrientes no meio.

Resultados semelhantes foram observados por Borges et al. (2008) ao realizarem estudo sobre a influência das condições de agitação e aeração sobre a produção de xantana por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101, no qual maior agitação e aeração favoreceram a produção e a viscosidade da xantana.

A xantana é normalmente produzida em processo de batelada, ao invés de processo contínuo. Este é outro fator que pode elevar o custo, pois pode limitar a capacidade de produção (ROSALAM; ENGLAND, 2006). Terminado o processo de fermentação é feita a inativação ou lise e/ou remoção das células microbianas, após a xantana é recuperada do caldo fermentado através da precipitação do biopolímero, desidratação, secagem e moagem, e o produto final é geralmente na forma de pó seco. É importante ressaltar que o tratamento não deve ocasionar degradação do biopolímero (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). A recuperação da xantana contida no caldo é um processo difícil devido à alta viscosidade do caldo em função da grande concentração do biopolímero (GARCÍA-OCHOA et al. 2000), e o tipo de processo aplicado irá determinar o uso final da goma (MCNEELY; KANG, 1973), além de aproximadamente 50% dos de produção (BORN; representar custos LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002, GALINDO, 1994). A inativação das bactérias e enzimas pode ser realizada submetendo o caldo fermentado a um tratamento térmico (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; KATZBAUER, 1998; MCNEELY; KANG, 1973; ROSALAM; ENGLAND, 2006), e, para remoção das células e obtenção de produtos claros, o caldo é centrifugado (MCNEELY; KANG, 1973).

Segundo Smith e Pace (1982), a forma mais comum de realizar a primeira purificação é a precipitação com solventes não miscíveis em água, como é o caso dos alcoóis inferiores. Para recuperação de xantana com fins alimentícios ou farmacológicos é recomendado o uso de isopropanol (BURDOCK, 1997; GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Um dos métodos propostos é a adição de álcool em presença de sais (MEDEIROS et al., 2000; RAIMANN; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2002; ROSALAM; ENGLAND, 2006) com o objetivo de melhorar a precipitação pela criação de cargas de efeito inverso. A adição de sais em concentração suficiente causa precipitação ou complexa coacervação devido à ligação dos cátions do sal aos grupos ionizados da molécula, reduzindo a quantidade de álcool necessária para precipitação (GARCÍA-OCHOA et al. 2000). O álcool utilizado é posteriormente recuperado em colunas de destilação e o custo deste processo representa uma proporção significante dos custos totais de produção (SMITH; PACE, 1982).

O produto final apresenta um teor de umidade entre 8 e 15% (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; BURDOCK, 1997; GARCÍA-OCHOA et al., 2000), sendo normalmente ao redor de 10%, estado no qual os polímeros são higroscópicos, e sujeitos a degradação hidrolítica, assim, é importante fazer uso de embalagens com baixa permeabilidade à água (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; SMITH; PACE, 1982).

1.1.3 Estrutura

Xantana comercial é composta por repetidas unidades pentassacarídicas. A estrutura química da cadeia principal é semelhante à da celulose e é formada por duas unidades de glicose linearmente unidas por ligações do tipo β1→4, que conferem rigidez a molécula. A cadeia lateral trissacarídica é composta por duas unidades de D-manose alternadas pelo ácido D-glicurônico; a manose interna é acetilada e aproximadamente metade da D-manose terminal (externa) contém resíduos de ácido pirúvico (CADMUS et al. 1976; GALINDO, 1994; JANSSON; KENNE; LINDBERG, 1975; SLONEKER, JEANES, 1962). A estes resíduos ácidos ligam-se, em diferentes proporções, os cátions, como sódio, potássio, cálcio e magnésio oriundos dos sais utilizados no meio de produção ou adicionados após a fermentação. A massa molecular é de aproximadamente 1MDa ou entre 4 e 12x10⁶g

mol⁻¹ (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002). A Figura 1 representa a estrutura da molécula de xantana.

A funcionalidade apresentada pela xantana é uma consequência direta de sua estrutura química única (CHALLEN, 1994). Sua estrutura terciária bem como o alto peso molecular conferem alta viscosidade às soluções de xantana além de propriedades interessantes (GALINDO, 1994; MORRIS, 1984); a conformação rígida ordenada é responsável, em parte, pelas notáveis propriedades reológicas da molécula (CAPRON; BRIGAND; MULLER, 1997). Variações na posição e quantidade de substituintes piruvato e acetato conferem certa irregularidade à estrutura da molécula de xantana que, por outro lado, parece ser muito regular (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002).



Figura 1- Unidade de repetição pentassacarídica da goma xantana. Fonte: Adaptado de Azuaje; Sánchez (1999).

A molécula de xantana pode estar em uma conformação desordenada ou ordenada (estrutura secundária), que depende das condições em que a molécula é caracterizada. Diversos autores (MORRIS, 1977; MORRIS, 1984; CAPRON;

BRIGAND; MULLER, 1997) sugeriram a estrutura secundária helicoidal da xantana. Capron, Brigand e Muller (1997) demonstraram que a xantana existe em uma conformação rígida ordenada quando está abaixo da temperatura de transição conformacional, enquanto que acima da temperatura de transição ocorre uma conformação desordenada flexível com uma menor viscosidade. Sugeriram, ainda, que a forma ordenada seria, pelo menos para algumas amostras de xantana, fita dupla e a transição de ordem para a desordem pode estar associada com a ruptura completa ou parcial da fita dupla (Fig. 2)¹ em favor de um processo de dissociação intermolecular que ocorre com a mudança no peso molecular Resultados semelhantes foram encontrados por Rinaudo (2001), e, segundo a autora, o desordenamento induzido pela temperatura ocorre por meio de um processo intermolecular que implica em uma dissociação da dupla hélice ordenada em cadeias simples desordenadas. Entretanto, alguns resultados demonstram um processo estritamente intramolecular, onde ocorre reordenação ao resfriar-se uma molécula de xantana tratada termicamente, sem mudança de peso molecular. A molécula de xantana no estado nativo adota uma conformação em hélice simples e quando soluções diluídas são aquecidas pode ocorrer uma mudança conformacional irreversível, e a xantana passa a adotar uma conformação de dupla hélice (RINAUDO, 2001), elevando a viscosidade. Born, Langendorff e Boulenguer (2002) corroboraram com a proposta da ocorrência das formas estruturais de hélice simples e dupla.

As formas nativa (presente no caldo fermentativo) e renaturada (em solução) podem apresentar a conformação ordenada, que na forma nativa está naturalmente presente abaixo da temperatura de transição e na forma renaturada após a solução resfriada atingir temperaturas inferiores a temperatura de transição. A temperatura de transição é dependente da força iônica do meio em que a xantana foi dissolvida (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002), além de ser influenciada pelos substituintes acetato e piruvato e adição de sais (SUTHERLAND, 2001). A estrutura helicoidal da molécula de xantana é bastante idêntica,

¹ Os valores da altura e largura de moléculas de goma xantana em imagens de microscopia de força atômica (Fig. 2) indicam fortemente que as moléculas são em mono ou dupla camada (LIJIMA et al., 2007).

independentemente da sua forma nativa ou renaturada (CAPRON; ALEXANDER; MULLER, 1998).



Figura 2 – Moléculas de goma xantana por microscopia de força atômica. Fonte: LIJIMA et al., (2007).

Segundo Ross-Murphy, Morris e Morris (1983), amostras de xantana natural (de cátions mistos) e xantana na forma de Na⁺ mantém a ordem da estrutura helicoidal após tratamento térmico (90°C). A estrutura secundária da xantana não é afetada pela força iônica a 0,005 e 0,01M [0,03 e 0,06%] de NaCl, porém, em altas concentrações do sal, uma parcial agregação das moléculas de xantana pode ocorrer (GAMINI; MANDEL, 1994). A hélice é estabilizada por ligações não covalentes, como as ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, efeitos estéricos (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002) e presença de eletrólitos (KATZBAUER, 1998; SUTHERLAND, 2001). A forma desordenada é favorecida pela baixa concentração de sal e altas temperaturas (KATZBAUER, 1998).

A modificação nas propriedades da solução das moléculas de xantana está associada com a transição de ordem-desordem induzida pela temperatura. Existe uma correlação entre a viscosidade intrínseca e a medida das massas molares. Uma diminuição no tamanho molecular e correspondente diminuição na viscosidade da solução demonstram que a variação de peso molecular é associada a mudanças conformacionais. As cadeias laterais têm um papel importante na conformação da

molécula desordenada e representam cerca de 65% da massa molar (CAPRON; BRIGAND; MULLER, 1997).

Quando em alta concentração (20g L⁻¹) as moléculas de xantana desnaturadas são apenas parcialmente dissociadas por causa dos efeitos estéricos. As cadeias laterais, alinhadas ao longo da cadeia principal quando a molécula está em uma forma ordenada helicoidal, são apenas parcialmente liberadas da cadeia principal e as duas fitas podem então formar associações com moléculas vizinhas; essas interações são mantidas quando as condições de renaturação são restauradas. Já quando em solução diluída (1g L⁻¹), a difusão das cadeias laterais interagindo com a cadeia principal pode ser seguida por uma dissociação irreversível da molécula em duas cadeias simples dimerizadas, seguida por associações intramoleculares, mas não organizações intermoleculares. Isso pode explicar o aumento da viscosidade observado em alguns casos após o tratamento térmico, principalmente durante o processo pós-fermentativo (CAPRON; ALEXANDER; MULLER, 1998); Borges et al. (2009a) verificaram este efeito experimentalmente.

Segundo Lijima et al. (2007), quando o biopolímero é dissolvido em água à temperatura ambiente, montagens moleculares em grande escala são formadas e atuam como dispersão coloidal. Por outro lado, uma estrutura homogênea é formada quando a goma xantana é aquecida a 40°C por 24h devido a uma mudança estrutural em meio aquoso. Durante o aquecimento, as montagens moleculares iniciais se decompõem, e as cadeias moleculares começam a se reorganizar com o decorrer do tempo. Quando as moléculas de xantana são liberadas a uma temperatura moderada por um longo tempo, a rede molecular move-se livremente, e o sistema atinge a homogeneidade. Géis firmes são formados após o resfriamento de soluções homogêneas assim obtidas, devido a uma estrutura de rede observada em soluções de xantana aneladas.

Capron, Alexander e Muller (1998) realizaram um estudo com o objetivo de visualizar interações existentes em solução, e, para tanto, observaram moléculas de xantana antes e depois de realizar tratamento térmico em um intervalo de concentrações onde ocorre uma dissociação da dupla fita. Em soluções diluídas de xantana (0,2mg L⁻¹) em água destilada, moléculas isoladas e pouca adsorção foram observadas. Já para soluções em presença de 0,01M [0,06%] de NaCI, muitas moléculas adsorvidas foram visualizadas devido a agregações induzidas pelo sal.

1.1.4 Composição Química

Os exopolissacarídeos sintetizados por microrganismos variam muito em sua composição e, consequentemente, nas suas propriedades químicas e físicas. Polissacarídeos bacterianos extracelulares possuem uma ampla gama de monossacarídeos, porém apenas um pequeno número é comumente encontrado, dentre estes, D-glicose, D-galactose, D-manose; polissacarídeos bacterianos também contêm hexoses ou metil pentoses, como L-fucose e L-ramnose. Tendo em vista os ácidos, o D-glucurônico e D-galacturônico são os mais comuns. Entre os substituintes não carboidratos de polissacarídeos bacterianos encontramos acetato e piruvato (SUTHERLAND, 2002).

O polissacarídeo B-1459, produzido a partir de bactérias *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, extensivamente estudado por diversos autores é composto por D-glicose, D-manose, e ácido D-glicurônico, além de ácido acético e ácido pirúvico (CADMUS et al., 1976; CADMUS et al., 1978; SLONEKER; JEANES, 1962) numa razão de 2,8:3,0:2,0:1,7:0,51-0,63, sendo o primeiro polissacarídeo bacteriano com substituintes ácido pirúvico reportado (SLONEKER; JEANES, 1962), contendo de 3,0 a 3,5% deste componente (ORENTAS; SLONEKER; JEANES, 1963).

Alguns autores recomendam um conteúdo de nitrogênio compreendendo valores entre 0,3 e 1% (GARCÍA-OCHOA et al., 2000), com valor máximo preconizado em 1,5% (BURDOCK, 1997). O polímero deve estar livre de células viáveis (BURDOCK, 1997) e o conteúdo de nitrogênio presente na xantana pode ser oriundo da inadequada remoção das células ou ainda do meio de produção utilizado. Já para o teor de cinzas, que corresponde ao resíduo inorgânico resultante da queima da fração orgânica da amostra em forno tipo mufla (MAGALHÃES et al., 2008), o valor estipulado varia de 7 a 12% (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Durante o processo de calcinação podem ocorrer perdas por volatilização, interação entre os componentes e reação com o material do cadinho utilizado; ou ainda, contaminação das amostras. Desta forma, o conteúdo de cinzas não corresponde necessariamente ao teor total de substâncias minerais. O teor de sais monovalentes estimado para amostras comerciais de xantana é de 3,6 a 14,3%, enquanto de sais bivalentes está entre 0,085 e 0,17% (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Vários estudos relacionados à composição química da xantana vêm sendo desenvolvidos, uma vez que esta é influenciada pela espécie, patovar ou cepa do microrganismo utilizado, pelo meio de produção e pelas condições operacionais do processo fermentativo (CADMUS et al., 1978; GARCÍA-OCHOA et al., 2000), além de exercer grande influência nas propriedades exibidas pela goma.

1.1.4.1 Influência do microrganismo na composição química

Orentas, Sloneker e Jeanes (1963) estudaram os açúcares constituintes de várias espécies do gênero *Xanthomonas* e verificaram a presença de glicose, manose e ácido glicurônico na grande maioria das espécies avaliadas, com exceção de *Xanthomonas vesicatoria* que não possui manose e sim galactose em sua composição e, em consequência, menor conteúdo de piruvato.

Xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv pruni possui ramnose em sua composição química, diferindo da xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv campestris. Moreira et al. (2001), em estudo da composição química de xantana produzida por diversas cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni, verificaram que todos os polímeros eram compostos por glicose, manose, ácido glicurônico e também apresentavam a ramnose em sua composição. Entretanto, os carboidratos encontravam-se em diferentes proporções. Resultados semelhantes foram encontrados por Vendruscolo et al. (2000), Borges e Vendruscolo (2007) e Borges et al. (2008). A presença de ramnose também foi reportada em polissacarídeos elaborados por *Xanthomonas* ATCC 53159 (CHOWSHURY; LINDBERG; LINDQUIST, 1987) e por uma cepa mutante de *Xanthomonas campestris* (HEYRAUD et al., 1998).

Com relação aos substituintes acetil e piruvato, estudos têm mostrado que ocorrem maiores variações quantitativas do que qualitativas. Xantanas produzidas por diferentes espécies possuem piruvato em sua composição variando de 1,00 a 7,40% (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; ORENTAS; SLONEKER; JEANES, 1963), e a grande variação nas quantidades dos substituintes acetil e piruvato que estão ligados na cadeia lateral dependem particularmente da cepa utilizada para produção da xantana (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; CADMUS et al., 1976; CADMUS et al., 1978). Para *X. campestris* pv campestris estima-se um conteúdo médio de 4,7% de acetil (ROCKS, 1971; UNITED STATES, SECRETARY OF

AGRICULTURE. Method of producing an atypically salt-responsive alkalideacetylated polysaccharide. U. S., Patente n. 3 000 790, 19 set. 1961); dependendo da espécie de *Xanthomonas* pode chegar até a 10% (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

1.1.4.2 Influência do meio e das condições operacionais na composição química da xantana

O meio de cultura e as condições operacionais influenciam tanto o rendimento quanto a estrutura da xantana produzida (GARCÍA-OCHOA et al, 2000). Variações nas condições operacionais utilizadas na produção também podem influenciar na massa molar da goma (CADMUS et al., 1978; GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

O tempo de incubação influencia na composição de carboidratos da xantana. Polímeros obtidos após 72h e 96h de fermentação por *X. campestris* pv pruni apresentaram diferença qualitativa nos monossacarídeos (VENDRUSCOLO et al., 2000). Diferentes condições de aeração e tempos de fermentação também influenciam o teor de açúcares presentes (MOREIRA, 2002).

Os conteúdos de piruvato e acetil são variáveis com as condições de fermentação da xantana (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002). Existe uma dependência entre a condição de agitação e o grau de piruvatação, que é mais elevado com maior agitação (PAPAGIANNI et al., 2001; PSOMAS; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES; KYRIAKIDIS, 2007). Psomas, Liakopoulou-Kyriakides e Kyriakidis (2007) mostraram que, a 30°C e após 48h de fermentação, não houve diferença significativa no teor de piruvato entre xantana produzida com agitação de 100 e 350rpm resultando em 1,5% e 2%, respectivamente; o efeito foi ainda menor entre xantana produzida a 350 e 600rpm, que resultou em concentrações de 2% e 2,2% de piruvato, nesta ordem. Borges et al. (2009a) também observaram que um aumento na taxa de agitação favoreceu a síntese de substituintes piruvato e acetil. Já Cadmus et al. (1978) não observaram influência da taxa de agitação sobre o conteúdo de piruvato. Segundo Psomas, Liakopoulou-Kyriakides e Kyriakidis (2007) a massa molar do polissacarídeo não é afetada por esse fator.

Em estudo realizado por Cadmus et al. (1978), também foi verificado que as condições de temperatura afetaram o conteúdo de piruvato. Um alto conteúdo de piruvato foi obtido a temperaturas mais baixas (20°C), quando comparado a

temperaturas mais elevadas (30°C), concordando com os resultados obtidos por Psomas, Liakopoulou-Kyriakides e Kyriakidis (2007). Casas, Santos e García-Ochoa (2000) também observaram influência da temperatura no grau de piruvatação e acetilação.

O teor de piruvato tem tendência a aumentar com o tempo de fermentação (PSOMAS; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES; KYRIAKIDIS, 2007). Baixo conteúdo de piruvato é encontrado durante as horas iniciais da fermentação, porém é dependente da proporção de goma formada. Ao analisar diferentes fermentações em tempos variados, foram encontrados polissacarídeos com diferentes conteúdos de piruvato, indicando que o produto final seja uma mistura de gomas de baixo e alto conteúdo de piruvato, visto que é improvável sua formação extracelularmente (CADMUS et al., 1978). Por outro lado, para alguns autores, polissacarídeos formados em diferentes estágios de fermentação possuem a mesma quantidade de piruvato (ORENTAS; SLONEKER; JEANES, 1963). O tempo de fermentação também influencia o grau de acetilação da molécula (TAIT; SUTHERLAND; CLARKE-STURMAN, 1986). Casas, Santos e García-Ochoa (2000) observaram incremento no grau de acetilação, bem como, no peso molecular de xantana com o tempo de fermentação.

Fosfato inorgânico no meio de cultivo resulta em baixo conteúdo de piruvato, já com o aumento gradual na concentração de citrato, um aumento concomitante no teor de piruvato é observado (VUYST; VERMEIRE, 1994). A fonte de carboidratos e a disponibilidade de oxigênio e nitrogênio no meio de cultura afetam o conteúdo de acetato da xantana (CADMUS et al., 1978). Menores conteúdos de acetil são encontrados em polímeros isolados de meios com esgotamento de amônio. A extensão da acetilação da molécula de xantana é influenciada pelo esgotamento de nutrientes e taxa de diluição em culturas contínuas (TAIT; SUTHERLAND; CLARKE-STURMAN, 1986). Em estudo realizado por Tait, Sutherland e Clarke-Sturman (1986), em diferentes meios de cultura e diferentes tempos de fermentação, foram encontrados teores de acetil variando de 1,9 a 4,5%, mas valores de até 10,0% já foram relatados (GARCÍA-OCHOA et al. 2000).

Um conteúdo maior de acetil pode ser obtido quando o processo de fermentação é conduzido em condições ácidas (pH5 e pH livre) enquanto maiores teores de piruvato podem ser obtidos em pH neutro. Os processos pós-fermentativos também podem influenciar os substituintes, como, por exemplo, a aplicação de

tratamento térmico que degrada parcialmente o substituinte piruvato da molécula de xantana (BORGES et al., 2009a).

1.1.5 Propriedades Físicas

As propriedades reológicas constituem uma das mais importantes determinações do comportamento da molécula e sua aplicação final. Dependendo da concentração do polímero, condições de meio (adição de sais ou outros hidrocolóides), os sistemas de xantana podem ser soluções Newtonianas ou pseudoplásticas ainda. formarem (BORN: LANGENDORFF; ou, qéis BOULENGUER, 2002). A pseudoplasticidade é verificada pela mudança na viscosidade aparente quando crescentes tensões de cisalhamento são aplicadas; quanto maior a taxa de cisalhamento menor a viscosidade, sendo este um processo reversível (CHALLEN, 1994; GARCÍA-OCHOA et al. 2000; KATZBAUER, 1998; MCNEELY; KANG, 1973). A goma xantana exibe alta viscosidade em solução, mesmo a baixas concentrações (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; GALINDO, 1994; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; MCNEELY; KANG, 1973; ROCKS, 1971), em consequência de seu alto peso molecular e sua estrutura secundária. O comportamento reológico das soluções de xantana é determinado pela forma e rigidez das macromoléculas (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002), podendo ser tomado como um indicador da qualidade da xantana e uma característica importante a ser considerada na seleção de cepas para produção industrial do polímero (NITSCHKE; THOMAS, 1995).

A determinação do comportamento reológico da xantana pode ser feita utilizando-se viscosímetros através da aplicação de uma taxa de cisalhamento e medição do estresse de deformação ou viscosidade. Podem ainda serem utilizados reômetros com taxa de cisalhamento e estresse de deformação controlados para medir a viscosidade e a viscoelasticidade dinâmica ou fluxo (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002).

A xantana é solúvel tanto em água fria como quente (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; CHALLEN, 1994; GARCÍA-OCHOA et al. 2000; MCNEELY; KANG, 1973; ROCKS, 1971), porém a temperatura de dissolução afeta a viscosidade e influencia a conformação molecular e a estrutura ordenada. Além da temperatura de dissolução, a temperatura de leitura também exerce influência na viscosidade das soluções de xantana (GARCÍA-OCHOA et al. 2000). Segundo Diaz (2002), maiores viscosidades podem ser alcançadas utilizando-se aquecimento (60°C) para solubilização das amostras de xantana durante o preparo das soluções. A xantana necessita de agitação intensa quando introduzida no meio aquoso, a fim de evitar a formação de grumos (KATZBAUER, 1998), comportandose de maneira diferente quando dissolvida em água pura ou soluções salinas; na água pura começa com o rompimento de agregados que diminuem com adição de sal. A presença da cadeia lateral aniônica na molécula favorece a hidratação, o que proporciona sua solubilidade em água fria (BORN: LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002).

A solução de xantana possui pH neutro (BURDOCK, 1997), é compatível com vários sais de diferente força iônica em concentrações relativamente elevadas, é estável em ampla faixa de pH, tanto ácido quanto alcalino, e suas soluções são muito resistentes a altas temperaturas (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; CHALLEN, 1994; GALINDO, 1994; MCNEELY; KANG, 1973; ROCKS, 1971; SUTHERLAND, 2001). A estabilidade da goma frente ao pH é importante para aplicações em alimentos ácidos (KATZBAUER, 1998) e, segundo McNeely e Kang (1973), a viscosidade de soluções aquosas de xantana é quase independente do pH na faixa de 6 a 9, e mostra apenas pequenas variações na faixa de pH de 1 a 11. Quando adicionadas de 0,1% de NaCl, as soluções de xantana são essencialmente independentes do pH (MORRIS, 1984). Soluções de xantana não têm a viscosidade afetada por temperaturas de até 90°C (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002) e, a notável resistência da xantana quando exposta a altas temperaturas ainda pode ser melhorada pela adição de sais (MCNEELY; KANG, 1973)

A cadeia principal celulósica da xantana também é altamente resistente a hidrólise (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002) e essa estabilidade sob certas condições, é superior a de muitos outros polissacarídeos solúveis em água ou polímeros em geral. Isso pode ser devido ao fato de que a estrutura helicoidal da goma xantana em sua forma ordenada protege a molécula de despolimerização (KATZBAUER, 1998) ou, ainda, a cadeia lateral envolve a cadeia principal protegendo assim as ligações β –1,4 (já naturalmente resistentes) de hidrólise e subsequente perda de viscosidade (CHALLEN, 1994).

O tratamento térmico causa diferentes efeitos sobre soluções de polímeros de diferentes origens, presentes tanto no caldo fermentativo quanto em soluções

(GALINDO, 1994). Para alguns autores (KATZBAUER, 1998), o tratamento térmico causa mínimos efeitos sobre a viscosidade de soluções de xantana e para outros (CAPRON; BRIGAND; MULLER, 1998; OVIATT; BRANT, 1994) proporciona mudanças na viscosidade da goma. O tratamento térmico pode alterar diferentes propriedades reológicas dependendo das condições de processo (temperatura, sais, duração) e da concentração de xantana no caldo, sendo controlado, em grande parte, pelas associações das moléculas de xantana (CAPRON; BRIGAND; MULLER, 1998).

Oviatt e Brant (1994) estudaram o efeito do tratamento térmico em soluções aquosas semidiluídas de xantana na presença de 0,1M [0,6%] de NaCl, e concluíram que o tratamento térmico proporcionou grande aumento na viscosidade das amostras devido ao aumento na extensão da estrutura ramificada. A cadeia dupla é perturbada e após o resfriamento, ocorrem interpenetrações na rede do polímero para formar adicionais zonas duplas de junção da rede, formando uma extensa rede de ligações cruzadas. Outros tipos de junções da rede podem estar presentes, como, por exemplo, ligações inespecíficas de hidrogênio e interações mediadas por cátions.

1.1.5.1 Influência do meio e das condições operacionais nas propriedades reológicas da xantana

A consistência e a pseudoplasticidade da xantana são claramente influenciadas pelo tempo de fermentação, meio de cultivo e, ainda, pela taxa de diluição quando for utilizado processo contínuo (TAIT; SUTHERLAND; CLARKE-STURMAN, 1986). Em estudo realizado por Cadmus et al. (1978), foi verificado que as condições de aeração, temperatura e meio de produção afetam a qualidade e rendimento da xantana produzida a partir de *X. campestris* NRRL B-1459. A produção e a viscosidade foram maiores em temperaturas mais elevadas (30°C) diminuindo significativamente em temperaturas mais baixas (20°C). A viscosidade foi superior com a maior taxa de aeração (1,5vvm). Casas, Santos e García-Ochoa (2000), também verificaram influência do meio e das condições operacionais nas propriedades reológicas. Observaram aumento na viscosidade com o aumento no tempo de fermentação para todas as condições utilizadas; um incremento na viscosidade da xantana produzida em temperaturas mais baixas (25°C) quando

comparada a produzida em temperaturas mais elevadas (34ºC) além de diminuição na viscosidade com o incremento na concentração de nitrogênio no meio de produção.

As condições de agitação e aeração influenciam o rendimento e a viscosidade de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni. Maior agitação e aeração favorecem a produção (BORGES et al., 2008; BORGES et al., 2009a; MOREIRA, 2002); entretanto, a ação destes parâmetros sob a viscosidade da xantana é cepa dependente (MOREIRA, 2002). Meio de produção e tempo de incubação também influenciam a produção e a viscosidade (MOREIRA, 2002; VENDRUSCOLO et al, 2000). Em estudo realizado por Moreira et al. (2001) uma maior viscosidade foi observada em polímeros produzidos com 24h de fermentação, porém a maior produção foi alcançada com 72h.

1.1.5.2 Influência da composição química nas propriedades reológicas da xantana

A viscosidade de polímeros produzidos por *Xanthomonas campestris* pv pruni pode ser influenciada pelo conteúdo de açúcares que compõe a molécula. Aparentemente xantanas com alto teor de manose apresentam maiores viscosidades (MOREIRA et al. 2001, MOREIRA, 2002). Resultado concordante foi encontrado por Borges et al. (2008) ao observar que diminuição no conteúdo de manose coincide com uma diminuição na viscosidade de xantana produzida pelo mesmo patovar. Além da manose, o ácido glicurônico pode exercer influência favorável na viscosidade de polímeros produzidos pelo patovar pruni (ANTUNES, 2000). Em estudo realizado por Heyraud et al. (1998), os autores observaram que uma maior quantidade de ramnose na molécula pode conferir solubilidade a xantana em etanol a 70%. Casas, Santos e García-Ochoa (2000) em estudo também observaram que as propriedades reológicas das soluções são relacionadas com a estrutura molecular.

Não existe um consenso na literatura sobre a influência exercida pelos substituintes acetil e piruvato no comportamento reológico da xantana. O conteúdo de piruvato pode influenciar a viscosidade de soluções diluídas de xantana (CADMUS et al., 1978), sendo considerado um indicador das propriedades das soluções de xantana. Para Sandford et al. (1977), o aumento do teor de piruvato aumenta correspondentemente a viscosidade da xantana. O autor demonstrou que

amostras de xantana com baixo conteúdo de piruvato (2,5-3%) possuem viscosidade significantemente menor comparadas a xantanas com alto teor de piruvato (>4%). Flores Candia e Deckwer (1999) estudaram os efeitos do conteúdo de piruvato sobre a viscosidade de soluções de xantana em presença de 0,12M [0,9%] de KCI verificando grande efeito sobre os parâmetros reológicos. Resultados semelhantes foram encontrados por Smith e Pace (1982). O aumento na viscosidade de soluções de xantana obtidas com maior tempo de fermentação pode ser explicado pelo aumento no grau de auto-associação de moléculas de xantana com maior do teor de piruvato (>3%). Essas associações são promovidas por interações apolares entre os grupos metílicos dos substituintes pirúvicos; os substituintes acéticos também contém grupos metílicos, porém estão localizados mais próximos ao centro da hélice e são menos propensos a estar disponíveis para interações intermoleculares (FLORES; CANDIA; DECKWER, 1999).

Por outro lado, alguns estudos mostraram baixa ou nenhuma correlação entre o teor de piruvato do biopolímero e a capacidade viscosificante (BORGES et al., 2009a; BRADSHAW et al. 1983; TORRESTIANA; FUCIKOVSKY; GALINDO, 1990). Também não foi verificada influência da baixa concentração de piruvato na viscosidade de soluções aquosas de xantana em estudo realizado por Borges, Bastos e Vendruscolo (2007).

A remoção dos grupos acetil da manose interna da cadeia lateral da molécula de xantana causa mudanças na viscosidade de soluções de xantana em água destilada ou soluções salinas (SMITH; PACE, 1982), que segundo Sloneker e Jeanes (1962) é melhorada. A desacetilação também aumenta a força de interação da goma xantana com outras gomas, como guar e locusta (TAKO; NAKAMURA, 1985; TAKO; NAKAMURA, 1986). Para alguns autores a desacetilação tem pouco (MCNEELY; KANG, 1973) ou nenhum efeito nas propriedades da solução (BRADSHAW et al. 1983) e outros autores (CASAS; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000) relacionaram alta viscosidade com alto conteúdo de acetato. Ross-Murphy et al. (1996) em seu estudo não conseguiram avaliar a influência dos grupos acetil no comportamento de interação da goma xantana com outros hidrocolóides.
1.1.5.3 Influência de sais nas propriedades reológicas da xantana

A presença de eletrólitos em soluções de xantana exerce influência no comportamento reológico destas, especificamente na viscosidade (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; SLMOLKA; BELMONTE, 2006), afetando também a elasticidade (SLMOLKA; BELMONTE, 2006). A xantana é um polissacarídeo aniônico cujas propriedades são influenciadas, primariamente, pela concentração de suas moléculas em solução (SANDFORD et al., 1977). Assim, a mudança que ocorre na viscosidade quando um eletrólito é adicionado é influenciada não só pela concentração e natureza do sal, mas também pela concentração do polímero (CADMUS et al., 1976; RINAUDO, 2001).

Soluções de xantana são geralmente termicamente estáveis na presença de altas concentrações de NaCl (acima de 0,1%), na faixa de pH 6-10 (XIE; LECOURTIER, 1992). Dependendo da concentração e composição externa dos sais a redução das repulsões eletrostáticas podem causar uma extensão na molécula e interações intercadeias (RINAUDO, 2001).

A conformação ordenada da goma xantana é estabilizada por sais e se acredita que esta conformação ordenada seja responsável pela extraordinária estabilidade do polímero, portanto, a presença de sais é necessária para sua ótima funcionalidade (KATZBAUER, 1998), uma vez que aumenta a estabilidade térmica de soluções de xantana (KIERULF; SUTHERLAND, 1988; ROCKS, 1971; SUTHERLAND, 2001; XIE; LECOURTIER, 1992). Borges et al. (2009b) observaram que amostras de xantana que possuíam um teor de sais divalentes superior às demais apresentaram menor queda na viscosidade com o aumento da temperatura.

A temperatura de transição de ordem-desordem da molécula de xantana é fortemente dependente da presença de eletrólitos (CAPRON; BRIGAND; MULLER, 1998; CLARKE-STURMAN; PEDLEY; STURLA, 1986; XIE; LECOURTIER, 1992), sendo geralmente elevada com a adição de sais (SUTHERLAND, 2001). Estudos mostram que pode ser diminuída na presença de altas concentrações de ânions brometo ou tiocianato, afetando a estabilidade do biopolímero e aumentando sua susceptibilidade à degradação catalisada por ácido. Já na presença de ânions como sulfato e fosfato a temperatura de transição é elevada, aumentando assim a estabilidade térmica do biopolímero (CLARKE-STURMAN; PEDLEY; STURLA,

1986). A transição conformacional induzida pelo sal demonstra ser um processo intramolecular, onde não ocorrem mudanças no peso molecular (MULLER et al., 1986).

Apesar da concentração do polieletrólito influenciar a temperatura de transição de ordem-desordem da xantana, quando a molécula já está num estado ordenado, as características estruturais e as propriedades reológicas não são afetadas pela adição de eletrólitos. Essa conformação ordenada é adotada pela xantana em soluções a 1% e 25°C, mesmo na ausência de eletrólitos (PELLETIER et al., 2001).

A adição de eletrólitos reduz o valor do módulo viscoelástico² de soluções de xantana que ainda apresentam comportamento de soluções semidiluídas, ou seja, abaixo da concentração crítica (c**)³ do polímero, o que pode ser atribuído à diminuição do volume hidrodinâmico que causa diminuição de vários parâmetros reológicos (PELLETIER et al., 2001). A baixas concentrações (0,01%) de xantana, a adição de traços de sais pode causar ligeira diminuição na viscosidade (ROCKS, 1971) pois com aumento da força iônica (adição de sais), observa-se um progressivo colapso na molécula, que passa de uma conformação expandida para uma forma compactada alterando, assim, o volume hidrodinâmico da molécula, refletindo em redução da viscosidade (CARRINGTON et al., 1996). Este comportamento é típico de polieletrólitos (PELLETIER et al., 2001).

Por outro lado, um aumento nos valores dos parâmetros reológicos pode ser induzido pela adição de eletrólitos quando a solução está acima da concentração crítica do biopolímero, devido a associações intermoleculares que são facilitadas pela redução das repulsões eletrostáticas e ordenação das cadeias, levando ao desenvolvimento de uma rede tridimensional (PELLETIER et al., 2001). A presença de material iônico estabiliza a rede tridimensional da goma xantana, promovendo

²Representa uma combinação do caráter viscoso e elástico do material (STEFFE, 1996), ou seja, do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') (ROSS-MURPHY; MORRIS; MORRIS, 1983).

³ Concentração na qual ocorre a transição de uma solução semi diluída para uma solução concentrada, onde as moléculas atingiram sua contração máxima com formação de agregados (NASH et al., 2002). É dependente do tipo de polímero especialmente da massa molar, rigidez intrínseca (LAUNAY; CUVELIER; MARTINEZ-REYES, 1997), além do volume molar (DIAZ, 2008). C* é a concentração que limita os regimes diluído e semi diluído, assim, soluções semi diluídas apresentam C* < C < C** (DIAZ, 2008).</p>

assim uma adicional viscosidade estável com a adição 0,1% de cloreto de sódio ou cloreto de potássio (CHALLEN, 1994; JEANES; PITTSLEY; SENTI, 1961) para concentrações de polímero entre 0,2 e 0,5% (JEANES; PITTSLEY; SENTI, 1961; ROCKS, 1971). Esse benefício é evidente em alimentos contendo concentrações de sal acima desse valor (CHALLEN, 1994; ROCKS, 1971).

A adição de sais exerce efeitos distintos na viscosidade em xantanas diferentes. Esta diversidade de efeitos possivelmente reflete diferenças na massa molar, conformação molecular ou composição química (NITSCHKE; THOMAS, 1995). Xantanas em soluções aquosas na presença de sais inorgânicos sofrem um modesto incremento na viscosidade, já um grande aumento é observado em soluções aquosas de xantana desacetilada sob adição de sais inorgânicos, como cloreto de potássio, e orgânicos como acetato de cálcio (UNITED STATES, SECRETARY OF AGRICULTURE. Method of producing an atypically salt-responsive alkali-deacetylated polysaccharide. U. S., Patente n. 3 000 790, 19 set. 1961). Flores Candia e Deckwer (1999) estudaram os efeitos da adição de sais sobre a viscosidade de soluções a 0,5g L⁻¹ [0,05%] de xantana com diferentes conteúdos de piruvato, verificando grande efeito sobre os parâmetros reológicos em presença de 0,12M [0,9%] de KCI. Segundo os autores, o aumento da viscosidade devido à adição de sai (KCI) só ocorre quando o grau de piruvatação da xantana é alto o suficiente para promover associações intermoleculares.

A organização "supramolecular" (cadeia em espiral interagindo por associações não covalentes) e as associações intermoleculares das cadeias dos polímeros exercem efeito sobre as propriedades de semelhança a gel e resposta mecânica predominantemente elástica das soluções de xantana, respectivamente. À semelhança do que ocorre com a viscosidade, os efeitos sobre as propriedades de gel são modificados pela escolha de cátions associados, força iônica e teor de substituintes acetato e piruvato. Alterações no conteúdo de polieletrólitos modificam a viscoelasticidade de amostras de xantana a uma concentração fixa (0,5%). As interações iônicas são modificadas pela concentração e tipo de íon e pelo teor de piruvato. Esses efeitos são muito mais pronunciados do que seriam quando esperados puramente do caráter polieletrólito das cadeias laterais. Assim, mudanças no balanço de cátions associados podem induzir alterações na resposta viscoelástica, sendo que o efeito das interações intermoleculares é muito maior do que para associações não específicas (ROSS-MURPHY; MORRIS; MORRIS, 1983).

A estabilidade na presença de cálcio depende da natureza da amostra de xantana, especialmente sobre o grau de substituição do piruvato (XIE; LECOURTIER, 1992). Lambert, Milas e Rinaudo (1985) estudaram a correlação da atividade dos íons sódio e cálcio com as estruturas conformacionais da xantana, mostrando que seus efeitos estabilizadores podem estar relacionados com os sítios de ligação dos grupos carboxílicos do polímero.

Ross-Murphy, Morris e Morris (1983) em estudos mostram que a viscosidade e o comportamento da xantana são substancialmente afetados pela natureza do cátion para amostras que sofreram troca iônica. Os autores avaliaram o comportamento de amostras de xantana modificadas por troca iônica para as formas de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ sem tratamento com uréia e após tratamento com 0,02 e 2mol L⁻¹ de uréia. A xantana natural de cátions mistos tem a viscosidade diminuída com o aumento da concentração de uréia Em comparação, a xantana na forma de Na⁺ possui comportamento completamente diferente, pois após o tratamento com 0,02mol L⁻¹ de uréia praticamente não se altera quando mais uréia é adicionada. Já a xantana na forma de K⁺ se comporta semelhantemente à xantana natural em ausência de uréia. Entretanto, após tratamento com 0,02mol L⁻¹ de uréia, observa-se um considerável decréscimo na viscosidade que não ocorre com a xantana nativa. Quando é utilizada uma alta concentração (2mol L⁻¹) de uréia, ambas têm comportamento similar, reduzindo a propriedade de semelhança a gel. Já a xantana na forma de Ca²⁺, quando comparada à forma nativa, apresenta um grande aumento da viscosidade e pouca alteração pelo tratamento com uréia, segundo os autores.

Mohammed et al. (2007) exploraram o efeito dos íons cálcio observando as mudanças na reologia induzida através da adição de uma quantidade crescente de CaCl₂ a soluções de xantana transformada na forma de Na⁺ por troca iônica ou na forma de Me₄N⁺ em presença de cloreto de tetrametilamônio (Me₄NCl). A aproximadamente 100 e 200% de equivalência estequiométrica de Ca²⁺ e grupos carboxil, as soluções de xantana passam através dos estados de máximo e mínimo caráter de gel. O aumento inicial no caráter de gel com o aumento da concentração de Ca²⁺ é devido aos sítios de ligação dos íons cálcio entre pares de grupos carboxil de hélices distintas, promovendo associações intermoleculares e reforço da rede de gel. Segundo Smith e Pace (1982), cátions divalentes tendem a requerer dois sítios ativos monovalentes no poliânion; ligações intra ou intercadeias podem ocorrer, predominando em baixas concentrações de cátions divalentes, porém, as ligações

dos cátions podem não ter lugar apenas nos grupos carboxílicos, mas também nos átomos de oxigênio adjacentes. A redução no caráter de gel nas condições de 100% de equivalência é atribuída por tentativa à substituição parcial dos sítios de ligações intermoleculares de íons cálcio pela ligação individual com os grupos carboxil, para maximizar o grau de complexação, causando consequente diminuição na extensão de ligações cruzadas (MOHAMMED et al., 2007).

Os resultados obtidos por Bergmann, Furth e Mayer (2008) ao estudarem interações de xantana com cátions bivalentes (Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ e Pb²⁺) mostram que as cadeias de xantana se ligam reversivelmente com espécies bivalentes em solução aquosa a pH6. Os autores também observaram que um cátion bivalente forma um complexo que envolve duas unidades de dissacarídeo da cadeia principal, juntamente com duas cadeias laterais, e de acordo com a estequiometria entre cátions e unidades dissacarídicas, um único cátion bivalente é ligado entre as extremidades terminais de duas cadeias laterais, levando a uma ligação cruzada intramolecular.

1.1.6 Modificações Químicas

Além de modificações no processo, empregando diferentes meio e condições operacionais e selecionando a cepa indicada para produção de polímeros com as qualidades desejadas, uma ferramenta para elaboração de xantana com propriedades diferenciadas pode ser a modificação da estrutura da molécula ou composição química no produto depois de elaborado ou durante os processos de recuperação após a fermentação.

Dentre as modificações químicas relatadas na literatura podemos destacar a desacetilação. Os ligantes acetil podem ser quantitativamente removidos da cadeia lateral da molécula de xantana com álcali diluído, ou ainda pela adição de álcali como parte do processo de precipitação juntamente com cloreto de potássio e álcool (UNITED STATES, SECRETARY OF AGRICULTURE. Method of producing an atypically salt-responsive alkali-deacetylated polysaccharide. U. S., Patente n. 3 000 790, 19 set. 1961). A desacetilação começa a ocorrer em pH9 ou acima deste (MCNEELY; KANG, 1973). Vários autores (MCNEELY; KANG, 1973; PAZUR; MISKIEL; MARCHETTI, 1995; ROSS-MURPHY et al., 1996; SLONEKER; JEANES, 1962; TAKO; NAKAMURA, 1985; TAKO; NAKAMURA, 1986;) têm realizando

estudos da influência da desacetilação no comportamento reológico da xantana, além de estudar os parâmetros envolvidos no processo (PINTO, 2005), como álcali empregado, tempo e temperatura de reação. Segundo Pinto (2005), o grau de desacetilação aumenta com o aumento da força da base utilizada, por exemplo, a desacetilação é maior utilizando-se hidróxido de sódio quando comparado a hidróxido de amônio. Também ocorre maior desacetilação com o aumento do tempo de reação de 3 para 12h e com o aumento na temperatura de 45 para 65°C.

Além da desacetilação, a despiruvatação também é viável, e pode ser realizada por meio de tratamento com ácido trifluoroacético em temperaturas elevadas (PAZUR; MISKIEL; MARCHETTI, 1995; ROSS-MURPHY et al., 1996), reduzindo a massa molar da xantana. Pazur, Miskiel e Marchetti (1995) também citam outras modificações químicas como redução dos resíduos de ácido urônico (grupos carboxil) com carbodiimida e borohidreto de sódio e oxidação com meta periodato de sódio.

Outra modificação química passível de aplicação em xantana é o *cross-linking* com formaldeído resultando num complexo estável com viscosidade melhorada (SMITH; PACE, 1982). A goma xantana também faz *cross-linking* com íons trivalentes, tais como íons cromo em condições alcalinas (MCNEELY; KANG, 1973).

A xantana pode, ainda, sofrer modificação química através de alterações na composição química, como, por exemplo, pela remoção de sais através de troca iônica. A remoção total ou parcial dos sais é realizada utilizando-se resinas trocadoras de cátions e tem sido empregada por alguns autores (MOHAMMED et al., 2007; ROSS-MURPHY; MORRIS; MORRIS, 1983) que estudam a influência desses componentes no comportamento reológico de xantana.

1.2 Troca lônica

O processo de troca iônica tem diversas aplicações analíticas e preparativas, tanto em pesquisa quanto em indústria (PESSOA, 2005). A xantana, por ser um polieletrólito, pode sofrer modificação química em solução através de troca iônica com o objetivo de variar quantitativamente e qualitativamente a composição de eletrólitos (cátions) presentes na molécula.

O princípio da troca iônica baseia-se na competição dos íons a serem trocados pelos grupos carregados da fase estacionária, também conhecida como resina, fase sólida ou matriz. Inicialmente ocorre adsorção de moléculas de solutos eletricamente carregados a grupos funcionais com cargas opostas que estão imobilizados em uma matriz sólida. Durante a aplicação da amostra e adsorção, as moléculas de soluto, em uma taxa adequada, deslocam os contra-íons e se vinculam reversivelmente à fase estacionária (KILIKIAN; PESSOA, 2001; PESSOA, 2005; SUPELCO, 1995), conforme a Figura 3.



Figura 3 – Processo de adsorção dos cátions da amostra na matriz. Fonte: o autor.

Por ser um processo reversível, os solutos adsorvidos podem ser subsequencialmente eluídos por deslocamento com outros íons de mesma carga, mas com maior força de interação com a fase estacionária (SPADARO, 2006), ou seja, o processo é regido pelos diferentes graus de afinidade eletrostática entre os sítios iônicos da matriz e os íons da solução (KILIKIAN; PESSOA, 2001; PESSOA, 2005; SPADARO, 2006; SUPELCO, 1995). A fase estacionária retém os solutos da amostra, pois está eletricamente carregada com sinais opostos (KILIKIAN; PESSOA, 2001).

A cromatografia de troca iônica é um processo descontínuo, e pode ser dividido em três etapas principais: adsorção da amostra, eluição da amostra e regeneração da fase estacionária (KILIKIAN; PESSOA, 2001). A regeneração da fase estacionária (Figura 4) deve ser realizada para que esta possa ser novamente utilizada. Os íons do eluente utilizado para regeneração têm uma menor afinidade pelo grupo trocador da matriz, porém, passando-se um volume de 5 a 10 vezes a capacidade da resina, a condição de equilíbrio pode ser alcançada, pois o grau de afinidade é superado pela maior concentração de íons (PESSOA, 2005; SPADARO, 2006).



Figura 4 – Processo de regeneração da resina de troca iônica. Fonte: o autor.

A resolução e o custo do processo são influenciados pelo tipo de matriz, (PESSOA, 2005). A matriz, ou trocador iônico, é constituída de um material inerte, poroso, natural ou sintético e insolúvel em água e solventes orgânicos (KILIKIAN; PESSOA, 2001; SPADARO, 2006). Os trocadores iônicos podem ser classificados em trocadores aniônicos e catiônicos, dependendo do grupo que está ligado à matriz. Resinas positivamente carregadas são denominadas trocadores aniônicos e resinas negativamente carregadas são denominadas trocadores catiônicos (PESSOA, 2005; SPADARO, 2006). Também podem ser classificados em fortes, médios e fracos, sendo que estes últimos são aqueles em que o grau de dissociação e a capacidade de troca são influenciados pelo pH, ao passo que os trocadores iônicos fortes são completamente ionizados em ampla faixa de pH (KILIKIAN; PESSOA, 2001).

Ao se realizar a escolha da resina de troca, devem-se observar algumas de suas propriedades como a capacidade de troca e a seletividade. A capacidade pode ser definida como a quantidade de íons que podem ser trocados entre a matriz e a fase móvel (amostra), e é expressa em meq g⁻¹ ou meq mL⁻¹ de suspensão da resina, sendo determinada por titulação. A capacidade da resina depende das condições do processo (temperatura, pH e força iônica do eluente) da mesma forma que a seletividade depende do grau das ligações cruzadas da matriz, carga e tamanho dos íons em solução (SPADARO, 2006).

1.3 Determinação de Na, K, Ca e Mg em xantana

O controle de qualidade do polímero produzido faz parte da etapa final de produção industrial e uma das análises envolvidas neste controle é a determinação do conteúdo de sais mono e bivalentes (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). A presença de sais na xantana exerce influência sobre suas propriedades químicas e físicas, como estabilização da sua conformação ordenada (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002, KATZBAUER, 1998, SUTHERLAND, 2001) e aumento da viscosidade em soluções com alta concentração de goma (PELLETIER et al., 2001; ROCKS, 1971). Por outro lado, uma concentração de sais muito elevada pode provocar uma mudança conformacional na molécula de xantana, reduzindo o volume hidrodinâmico e, consequentemente, a viscosidade (CARRINGTON et al., 1996; PELLETIER et al., 2001).

A xantana de nível comercial deve apresentar um conteúdo de sais monovalentes total de 3,6 a 14,3% (p/p) e de sais bivalentes entre 0,085 e 0,17% (p/p) (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Os sais são oriundos do meio de produção (residuais), manutenção do pH através da adição de diferentes tipos de base, ou ainda, são adicionados posteriormente. Xantanas comerciais são produzidas em meios contendo sais de sódio, potássio, cálcio e magnésio (BURDOCK, 1997; GARCÍA-OCHOA et al., 2000). A manutenção do pH é realizada utilizando-se bases como NaOH e KOH (GARCIA-OCHOA et al., 2000;); durante esse processo um excesso de íons de sódio e potássio são adicionados e um alto teor desses sais na xantana pode ser resultado de um processo de recuperação inadequado. Também podem ser oriundos da adição de NaCl, KCl, CaCl₂ e MgCl₂ para melhorar a precipitação do polímero durante o processo de recuperação a partir do caldo fermentado (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; MEDEIROS et al., 2000; RAIMANN; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2002). Portanto, a determinação quantitativa dos sais presentes na molécula se faz necessária, uma vez que o conteúdo de sais pode ser considerado um dos parâmetros de gualidade do polímero.

Para que um produto orgânico, como é o caso da xantana, possa ter seu conteúdo mineral ou de sais analisado, a amostra deve ser convenientemente preparada, de modo que a porção orgânica seja destruída, restando apenas seu conteúdo inorgânico. Na sequência, os sais resultantes podem ser determinados por fotometria de chama para sais monovalentes e espectrometria de absorção atômica

para sais bivalentes. O método reportado na literatura para o preparo de amostras de xantana (BORGES et al., 2009a; BORGES et al. 2009b; PINTO, 2005) e outros polissacarídeos (FREITAS et al., 2009) para a determinação quantitativa dos sais presentes é a calcinação, recomendada para alimentos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC,1987) e pela *American Society for Testing and Materials* (ASTM, 1981).

O método constitui-se na decomposição da amostra por via seca em forno tipo mufla. Baseia-se na queima da fração orgânica da amostra obtendo-se um resíduo inorgânico na forma de cinza, solúvel em ácido diluído. A amostra é aquecida em atmosfera ambiente até que todo o material orgânico seja queimado. A temperatura conveniente para a pirólise da amostra encontra-se, frequentemente, entre 450 e 550°C, formando um resíduo inorgânico não volátil. Para tanto, podem ser empregados cadinhos de porcelana, quartzo, platina ou zircônio ou, alternativamente, béqueres; utilizam-se, geralmente, os cadinhos de porcelana (KEBBEKUS, 2003; MAGALHÃES et al., 2008; OHLWEILER, 1976). O método pode gerar perda de componentes voláteis e, dependendo da composição da amostra, pode ser demorado. A amostra também pode reagir com o cadinho resultando em perdas ou contaminação dos analitos o que é dependente da temperatura, composição da amostra e material que compõem o cadinho empregado na calcinação. Devido aos erros sistemáticos, a literatura recomenda evitar o uso da decomposição por via seca em forno tipo mufla (MAGALHÃES et al., 2008) e o estudo de outros métodos de preparo de amostras pode ser uma alternativa para minimizar erros e gerar resultados confiáveis.

1º ARTIGO

Artigo Submetido à Revista Food Chemistry

NEW METHOD OF XANTHAN MINERALIZATION FOR Na, K, Ca AND Mg DETERMINATION

Paula Michele Abentroth Klaic^a, Adriane Medeiros Nunes^b, Anderson Schwingel Ribeiro^{b,*}, Angelita da Silveira Moreira^{c,d}, Claire Tondo Vendruscolo^{c,d}

 ^aDepartamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário s/nº, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.
 ^bDepartamento de Química Analítica e Inorgânica, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário s/nº, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.
 ^cDepartamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário s/nº, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.
 ^dCentro de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Biopolímeros, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil.

Abstract

We propose a very simple alternative decomposition procedure for the determination of Na, K, Ca, and Mg in xanthan gum. The samples were treated in the presence of HNO₃ at 100 °C for 2 h, and, after cooling to room temperature, we subsequently added HClO₄. The mixture was again heated at the same temperature for more than 1 h, ensuring complete digestion. After decomposition, we determined

Na and K content by flame atomic emission spectrometry and Ca and Mg content by flame atomic absorption spectrometry. We verified the accuracy of the method by comparing the results with those obtained from the conventional decomposition by calcination method, and there were no significant differences between the results at the 95% confidence level. The limits of detection in the sample were 0.011, 0.004, 0.45 and 0.001 mg g⁻¹ for Na, K, Ca and Mg, respectively. The relative standard deviations were lower than 10%. The method proposed is simple, easy, fast, reproducible, and requires less sample than conventional method.

Keywords: xanthan; sodium, potassium, calcium and magnesium determination; acid digestion.

1. Introduction

Xanthan gum, an extracellular microbial polysaccharide produced by bacteria of the genus *Xanthomonas* (Jansson, Kenne & Lindberg, 1975; Ross-Murphy, Morris & Morris, 1983; Galindo, 1994) has a wide range of applications in food and non-food industries as a thickening, suspending agent and stabilizer of emulsions (Katzbauer, 1998; Vendruscolo, Rodrigues, Pereira, Redies & Vendruscolo, 2006) due to its rheological properties. Xanthan gum produces highly viscous solutions, even at low concentrations (McNeely & Kang, 1973, Galindo, 1994; García-Ochoa, Santos, Casas & Gómez, 2000; Born, Langendorff & Boulenguer, 2002) because of its high molecular weight and its secondary structure (Katzbauer, 1998; Rinaudo, 2001, Born et al., 2002), but the viscosity decreases with decreasing molecular weight (Viturawong, Achayuthakan & Suphantharika, 2008; Borges, Paula, Feitosa & Vendruscolo, 2009a).

Xanthan gum is used in the food industry mainly because of its compatibility with many food ingredients and additives (Challen, 1994), such as proteins, lipids and other polysaccharides, such as starch and pectin (Sutherland, 1998). Xanthan gum is also compatible with various salts (ionic strength), even at high concentrations. It is stable over a wide pH range and its solutions are very resistant to high temperatures (McNeely et al., 1973; Challen, 1994; Galindo, 1994; Born et al., 2002).

Xanthan is an anionic heteropolysaccharide (Ross-Murphy et al., 1983) whose primary structure is based on repeated pentasaccharide units. The backbone

chain is composed of two glucose units linearly linked by $\beta 1 \rightarrow 4$ linkages, and the trisaccharide side chain consists of two D-mannose units alternating D-glucuronic acid; the internal mannose unit is acetylated and about half of the terminal D-mannose units (external) contain pyruvic acid residues (Sloneker & Jeanes, 1962; Jansson et al., 1975; Cadmus, Rogovin, Burton, Pittslev, Knutson & Jeanes, 1976; Galindo, 1994). In these acidic residues, cations, such as Na, K, Ca and Mg, originate from the salts used in production media or added after fermentation, are linked in different proportions.

Xanthan properties are influenced by the concentration and nature of added salts (Ross-Murphy et al., 1983; Rinaudo, 2001). The presence of electrolytes in xanthan solutions influences rheological behavior, especially viscosity (García-Ochoa et al., 2000; Borges, Vendruscolo, Martins & Lomba, 2009b), and the influence of the salts on viscosity is dependent on xanthan concentration (Cadmus et al., 1976; Carrington, Odell, Fisher, Mitchell & Hartley, 1996; Pelletier, Viebke, Meadows & Williams, 2001; Rinaudo, 2001).

The ordered conformation of xanthan gum is stabilized by salt (Katzbauer, 1998; Born et al., 2002) and is responsible for its remarkable rheological properties (Capron, Brigand & Muller, 1997) and by the extraordinary stability of the polymer. Therefore, the presence of salt is necessary for optimal functionality (Katzbauer, 1998) mainly divalent cations, because it increases the thermal stability of xanthan solutions (Kierulf & Sutherland, 1988; Xie & Lecourtier, 1992; Borges et al., 2009a).

Because the salt content affects xanthan behavior, it is necessary to have an easy, appropriate, and reliable method for its determination. In the literature, calcination is used to prepare samples of xanthan (Borges et al., 2009a; Borges et al., 2009b) and other polysaccharides (Freitas et al., 2009) for quantitative determination of Na, K, Ca and Mg by photometric and spectrometric methods. While drying in muffle furnace, the sample decomposes via burning of the organic fraction to yield an inorganic ash residue, soluble in dilute acid. This method can be result in loss by volatilization and, depending on the sample's composition, can be time consuming. The sample can react with the crucible material and create loss or contaminate the analytes, depending of the temperature, the crucible material and sample composition (Kebbekus, 2003; Magalhães, Flores, Krug, Barin & Mesko, 2008). Because of systematic errors, some authors recommend avoiding decomposition through drying in muffle furnace (Magalhães et al., 2008).

In this study, we propose a new and very simple method of preparing samples of xanthan by acid digestion for Na and K determination by flame photometry and Ca and Mg determination by atomic absorption spectrometry. To develop the method, we used five different xanthan samples and the results were compared with the currently-used calcination method to check its accuracy.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Bacterial strain

Xanthomonas arboricola pv pruni strain 101 was used in this study. The bacterial strain was maintained on a SPA agar (Hayward, 1964) stored at 4 °C and subcultured monthly.

2.1.2. Xanthans

In this study, we used both commercial xanthan samples and samples produced in our laboratory by fermentation, as described in Section 2.2. Three samples of xanthan obtained from commercial sources were used: xanthan gum packaged and distributed by Farmaquímica Industrial Ltda, (Part Number: 200708A-N05, Brazil), xanthan produced by Sigma-Aldrich (Part Number: 056K007, United States) and xanthan packaged and distributed by Aksy Comercial Ltda (Part Number: 200805BG02, Brazil), here codified as Xc-A, Xc-B and Xc-C, respectively.

2.1.3. Reagents

Analytical reagent grade materials were used in all of the experiments. The ultrapure water used to prepare all solutions was obtained in a Direct-Q 3 Water Purification System (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), with a resistivity of 18.3 M Ω cm. All glass apparatus was washed and subsequently immersed in 10% v/v HNO₃ for 48 h and then rinsed with ultrapure water prior to use. Working reference solutions of Na, K, Ca and Mg were prepared in acid, as the samples were, by serial dilution of a stock solution containing 1000 mg L⁻¹ of ultrapure water from a standard concentrate solution (Fluka, Buchs, Germany). The following reagents were used for the digestion and calcination of samples: nitric acid, chloridric acid (Synth, Brazil) and

perchloric acid (Vetec, Brazil). The nitric acid and the chloridric acid used in this work were further purified by distillation in a sub-boiling quartz system (MA-075 from Marconi, Piracicaba, SP, Brazil). Potassium chloride (Synth, Brazil) and cesium chloride (Sigma Aldrich, Germany) were used as ionization buffers.

2.1.4. Apparatus and instrumental parameters

A heated digestor block (MA-4025 from Marconi, Piracicaba, SP, Brazil) was used for acid digestion of the sample. All samples were weighed using an Ohaus Adventurer analytical balance (Model AR 2140, Pine Brook, NJ, USA) with a resolution of 0.1 mg and tare maximum of 210 g.

2.1.4.1. Flame photometer

A flame photometer (Model B462 Micronal, São Paulo, SP, Brazil) was used for sodium and potassium determination. The analyses by flame atomic emission spectrometry (FAES) were performed under the following conditions: 5 mL min⁻¹ sample volume, 8 s settling time of reading, air (9 L min⁻¹) at a pressure of 1 Kgf cm⁻² and butane gas flame (liquefied petroleum gas).

2.1.4.2. Atomic Absorption Spectrophotometer

Calcium and magnesium were determined in xanthan samples using an atomic absorption spectrophotometer (Model AA- 6300 Shimadzu, Japan) equipped with a deuterium arc background correction by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). An air-acetylene flame was used for all determinations. The spectrometer was operated under the following conditions: flame mode with a Ca and Mg hollow cathode lamp source, wavelengths of 422.7 nm for Ca and 285.2 nm for Mg, a spectral band pass of 0.7 nm for both elements. The lamp current used was 10 mA for Ca and 8 mA for Mg.

2.2. Methods

2.2.1. Xanthan production

The xanthan was produced by fermentation in a submerged culture. The process was performed in a bioreactor (BioStat® B Braun Biotech International) with a 7 L production medium (Universidade Federal de Pelotas. WO/2006/047845, 2005)

under two pH conditions: uncontrolled pH and pH 9 controlled by addition of 2 mol L⁻¹ NaOH.

The resulting fermented broths were thermally treated at 121 °C for 15 min and the polysaccharides were recovered by precipitation with 96% ethanol. The xanthan samples were dried until they reached constant weight at 56°C and then were powdered to particle size using 60-150 mesh and will be referred to as Xp-pH uncontrolled and Xp-pH9.

2.2.2. Sample treatment

2.2.2.1. Calcination

To validate the proposed procedure, all samples were prepared by the method in current use, and the results were compared by statistical analysis. Two hundred milligrams of xanthan was calcinated in a muffle furnace at 550 °C to form ash. The duration varied from 5 to 8 h. The ashes formed were treated with 6 mL of aqua regia (1HNO₃:3HCl v/v), and resulting salts were diluted in 50 mL of 1% HCl solution (ASTM D1428-64, 1981).

Two calcination procedures were performed in order to verify the accuracy of the results and identify possible sources of error: calcination in a Pyrex® beaker and calcination in a Chiarotti® porcelain crucible. To this end, we analyzed Na and K.

2.2.2.2. Acid digestion

We performed two procedures to decompose the samples using acid digestion. Initially, two xanthan samples (Xc-B and Xc-C) were treated only in the presence of HNO₃. One hundred milligrams of each sample was weighed into glass digester flasks, and 5 mL of concentrated HNO₃ was added. The mixture was heated in a digester block at 100 °C for about 3 h. After cooling at room temperature, the samples were diluted with ultrapure water to a final volume of 50 mL using a volumetric flask, with subsequent dilutions appropriate for each analyte for subsequent analysis. Next, all the samples were treated as previously described. However, after 2 h of heating in the presence of HNO₃ (at which point only the material that is most difficult to oxidize remains), the mixture was cooled at room temperature, and 2 mL of HClO₄ was added carefully to promote more efficient oxidation of organic material. The mixture was again heated at the same temperature

for more 1 h, and the complete digestion was observed with total removal of the organic material. The samples were diluted with ultrapure water to a final volume of 50 mL using a volumetric flask after cooling at room temperature, and were diluted to appropriate levels for each analyte for subsequent analysis.

2.2.3. Procedure

Calibration curves for Na and K determination were used with concentration ranges of 0.5 to 10 mg L⁻¹ and 0.2 to 0.8 mg L⁻¹, respectively. To minimize ionization interference, 0.1% w/v cesium chloride was added to the calibration solutions and samples for K determination. Concentration ranges of 0.5 to 3 mg L⁻¹ and 0.1 to 0.6 mg L⁻¹ was used to obtain calibration curves of Ca and Mg, respectively. Potassium chloride (0.1% w/v) was added to all samples and calibration solutions to minimize ionization interference. Calibration curves were obtained for all analytes used in this work, and all solutions used to generate these curves were in the same media later used in sample decomposition.

2.2.4. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate with three readings each, and the results were submitted to statistical paired t-tests (t-tests with paired data) with a 95% limit of confidence and also to variance analysis, with a comparison of means using the Tukey test at the 5% significance level.

3. Results and discussion

3.1. Preliminary studies

3.1.1. Evaluation of conventional procedure for xanthan sample preparation

In the initial stages of this work, the accuracy of the conventional calcination procedure was verified and possible sources of error were identified. The calcination times until obtaining light ash, varied for different samples; this is probably due to differences in the chemical composition of the xanthan because the stability of xanthan depends on the molecular conformation, the rigidity of the cellulosic chain and the composition of the side chain (Born et al., 2002). The results and summary statistics (Table 1) show a significant difference between the results obtained for

calcination in a porcelain crucible and calcination in a beaker (Pyrex®). The samples of xanthan calcinated in porcelain crucibles had higher concentrations of Na and K compared to samples calcinated in beakers with the exception of sample Xc-B, which had statistically similar values of K concentration. This exception can be explained by the high standard deviation in the measured potassium concentrations for this sample.

Apolyto	Sampla -	mg g ⁻¹			
Analyte	Sample	porcelain crucible	Beaker		
	Xc-A	34.2 ± 0.24^{a}	31.2 ± 1.49 ^b		
	Xc-B	55.8 ± 0.08^{a}	50.5 ± 1.11 ^b		
Na	Xc-C	$34,8 \pm 0.45^{a}$	29,6 ± 0.41 ^b		
	Хр-рН 9	74.4 ± 0.42^{a}	65.0 ± 0.47^{b}		
	(p-pH uncontrolled 3.05 ± 0.16^{a}		1.99 ± 0.02 ^b		
	Xc-A	2.03 ± 0.13^{a}	1.41 ± 0.15 ^b		
	Xc-B	56.4 ± 1.91 ^a	54.8 ± 0.52^{a}		
K	Xc-C	3,07 ± 0.12 ^a	2.46 ± 0.02^{b}		
	Хр-рН 9	29.2 ± 0.47^{a}	26.3 ± 0.41 ^b		
	Xp-pH uncontrolled	54.3 ± 0.97^{a}	42.4 ± 0.51^{b}		
+h) / 1	00 0				

Table 1 Analytical results for Na and K determination by flame atomic emission spectrometry after calcination

*Values = means ± SD; n = 9

** Lines with different letters are significantly different by Tukey test (p<0.05).

To judge the accuracy of the results, a comparison of the methods was performed through paired t-tests with a confidence level of 95%, and the Na concentrations of the xanthan samples yielded a value of $t > t_{crit}$. This result verifies that the two procedures provide different results. The K determination showed a value of $t < t_{crit}$ within a 95% confidence, indicating statistically similar results. However, comparing the results with the mean comparison (Tukey, p<0.05), there is a significant difference.

The differences between the two sample preparations may be a result of interaction between the sample and the crucible material (Kebbekus, 2003; Magalhães et al., 2008). Porcelain is made from clay, which contains the elements of interest (Na and K) (Kamseu et al., 2007) and overestimation of these elements in the samples is certainly the result of contamination with the porcelain crucibles during the calcination process. Porcelain is a porous material and can form active sites through interaction with acid during the decontamination process, making it difficult to

clean between calcination steps and resulting in a memory effect (Kebbekus, 2003). Therefore, it is recommended that the conventional calcination procedure of xanthan samples is carried out in high-quality Pyrex® glass beakers.

3.1.2. Optimization of digestion in acid

In order to develop a methodology for the sample preparation by acid digestion, preliminary studies were performed with the aim of completely decomposing the samples. We attempted to digest the samples Xc-B and Xc-C using nitric acid only and then compared the results for Na and K determination with the conventional calcination decomposition method performed in a beaker.

The results presented in Table 2 were submitted to statistical analysis, which verified that the different procedures gave significantly different results. The acid digestion yielded lower values for both analytes because the cellulosic main chain is highly resistant to hydrolysis, which may be related to its chemical composition; specifically, the presence of salts, side chain size and composition (Challen, 1994; Katzbauer, 1998; Born et al., 2002) and thermal stability against hydrolysis under certain conditions. The thermal stability of xanthan solutions is superior to many other water-soluble polysaccharides and polymers in general (Katzbauer, 1998).

	Sample	Acid digesti	on	Calcination in b	Calcination in beaker	
Analyte			RSD	ma a ⁻¹	RSD	
-	-	ng g	(%)	nig g	(%)	
No	Xc-B	30.7 ± 1.16	3.8	50.5 ± 1.07	2.1	
ina	Xc-C	19.1 ± 0.29	1.5	29.6 ± 0.41	1.4	
K	Xc-B	33.3 ± 0.82	2.4	54.8 ± 0.52	1.0	
n	Xc-C	1.77 ± 0.01	0.3	2.46 ± 0.02	0.8	
*\/alues - mos	$nc + SD \cdot n = 0 \cdot DSD$	 Polativo standard dov 	viation			

Table 2 Analytical results for xanthan samples after treatment with acid digestion in nitric acid and calcination by flame atomic emission spectrometry

*Values = means ± SD; n = 9; RSD = Relative standard deviation

Chemical degradation of xanthan can be achieved using strong oxidants at high temperature (Born et al., 2002). Differences in chemical composition of the xanthan samples influence the stability of the molecule. The stability of xanthan is increased when the molecule is in an ordered conformation (Smith, Symes, Lawson & Morris, 1981; Katzbauer, 1998; Pelletier et al., 2001; Born et al., 2002), and the double helix confers resistance against degradation by acid (Born et al., 2002) because it impedes depolymerization (Katzbauer, 1998). Some authors suggest that the side chain protects the linkages β –1,4 on the main chain against hydrolysis and subsequent loss of viscosity (Challen, 1994). Acetyl groups tend stabilize the ordered form, while pyruvate groups tend to favor the disordered form (Smith et al., 1981; Pelletier et al., 2001). Therefore, xanthan samples with different amounts of these substituents have different resistances against degradation.

According to Kebbekus (2003) and Flores, Krug, Barin & Arruda (2008), some substances are difficult to degrade with a single acid. Therefore, a combination of two or more acids may be used in order to take advantage of interactions in the acid mixture that generate chemically unstable intermediates that considerably accelerate decomposition. It is very difficult to obtain complete oxidation using only nitric acid because of its very low boiling point (120 °C). This low boiling point limits its oxidative efficiency because high temperatures are required to break carbon-carbon linkages. Perchloric acid has high oxidizing power but, when used alone, it presents an explosion risk and should be used in combination with other acids for safety reasons. Thus, perchloric acid is generally used after the addition of nitric acid (Flores et al., 2008) as proposed in the procedure developed for xanthan sample mineralization, the results of which we describe below.

3.2. Sodium and potassium analysis

The calibration curves for these analytes studied show good linear correlation coefficients (R>0.99) independent of the method used for sample preparation. The limits of detection (LDs) were calculated as 3 times the standard deviation of 10 measurements of the blank on the sensitivity curve and were calculated for each method (Table 3).

Table 3 Figures of merit for the determination of Na and K in xanthan by flame atomic)
emission spectrometry after treatment with acid digestion and calcination	

	nalyte Range (mg L ⁻¹) Acid digestion (mg L ⁻¹) a LD s.(mg L ⁻¹) (mg g ⁻¹) R		۱	Calcination				
Analyte			LD (mg g ⁻¹)	R	a s.(mg L ⁻¹)	LD (mg g ⁻¹)	R	
Na	0.5 – 10	0.1402	0.011	0.9974	0.1322	0.011	0.9982	
K	0.2 – 0.8	1.3300	0.004	0.9984	0.9750	0.004	0.9998	

*Range: concentration range of the calibration solutions; a: slope of the calibration curve; LD: limit of detection in the measuring solution; R: correlation coefficient of the calibration curve.

A comparison of the acid digestion and calcination methods was performed to obtain information about the accuracy of the results. As shown in Table 4, similar results were achieved using the two approaches.

		Acid digesti	on	Calcination	
Analyte	Sample	ma a ⁻¹	RSD	ma a ⁻¹	RSD
		ng g	(%)	nig g	(%)
	Xc-A	$30.5 \pm 0.14^{\circ}$	0.5	31.2 ± 1.49 ^c	4.8
	Xc-B	48.1 ± 1.55 ^b	3.2	50.5 ± 1.07 ^b	2.1
Na	Xc-C	28.7 ± 0.25 ^c	0.9	29.6 ± 0.41 ^c	1.4
	Хр-рН 9	64.2 ± 0.78^{a}	1.2	65.0 ± 0.47 ^a	0.7
	Xp-pH uncontrolled	1.93 ± 0.03^{d}	1.5	1.99 ± 0.02^{d}	1.0
	Xc-A	1.35 ± 0.05 ^e	3.8	1.41 ± 0.15 ^e	10.4
	Xc-B	53.7 ± 0.30 ^a	0.6	54.8 ± 0.52^{a}	1.0
K	Xc-C	2.49 ± 0.02 ^d	0.8	2.46 ± 0.02 ^d	0.8
	Хр-рН 9	25.4 ± 0.24 ^c	0.9	26.3 ± 0.41 ^c	1.6
	Xp-pH uncontrolled	43.1 ± 0.13^{b}	0.3	42.4 ± 0.51 ^b	1.2

Table 4 Analytical results for xanthan samples, obtained with different sample preparation methods, by flame atomic emission spectrometry

* Values = means \pm SD; n = 9

**Columns with different letters to each element are significantly different by Tukey test (p < 0.05)

The results were analyzed using statistical paired t-tests and the concentration measured for both elements using acid digestion compared with calcination showed no significant differences (t < t_{crit} , accepting the null hypothesis) between the results at the 95% confidence level, indicating that acid digestion is an appropriate sample preparation method.

As shown above, the difference between the measured analyte concentrations between the acid digestion and calcination methods was less than 5%, indicating good agreement between results obtained using these different sample preparation procedures. The relative standard deviations (RSD) were low for all measurements except for the calcinated Xc-A concentration of K, which was high because of the low K concentrations in the sample.

The functionality of the xanthan gum is a direct consequence of its unique chemical structure (Challen, 1994; Rinaudo, 2001; Born et al., 2002). The rigid ordered conformation is responsible for the rheological properties of the molecule (Capron et al., 1997), and the organized state is stabilized by salts (Katzbauer, 1998; Rinaudo, 2001; Born et al., 2002); therefore, the presence of salts is necessary. According to García-Ochoa et al. (2000), commercial xanthan is about 3.6-14.3%

w/w monovalent salt. Our results show that the commercial samples Xc-A and Xc-C are not within the specified limits, with values below the estimated 3.18 and 3.12% w/w, respectively. However, these values are close to the expected minimum. The other samples had values within the limits specified by the literature: Xc-B has 10.18%, Xp-pH9 8.96% and Xp-pH uncontrolled 4.50% w/w.

Both commercial xanthan and that produced by *X. arboricola* pv pruni strain 101 showed significantly different results for Na and K content as assessed by the Tukey test at the 5% significance level with the exception of commercial samples Xc-A and Xc-C, which yielded similar results for Na content as seen in Table 3. This is a consequence of operational conditions, such as fermentation medium composition and pH control. Xanthan Xp-pH9 presents a higher content of Na; this may be due to the large volume of NaOH added to maintain this pH condition during fermentation. As expected, we also observe that the xanthan produced at uncontrolled pH has the lowest concentration of Na. Our results agree with the findings of Borges et al., (2009a). These authors found that the Na content in xanthan produced by strain 106 of *X. arboricola* pv pruni varied with the volume of NaOH used to maintain the pH and with the stirrer speed. Specifically, Na content increased with increased stirrer speed and pH.

3.3. Calcium and magnesium analysis

The detection limits (LDs) were calculated as described above and are presented in Table 5. Each method presents different limits of detection as a result of different values of the blank sample. Good linearity (R>0.99) was obtained for the calibration curves of Ca and Mg from both sample preparation methods (acid digestion and calcination).

Table 5	Figures of merit for the determination of Ca and Mg in xanthan by flame
	atomic absorption spectrometry after treatment with acid digestion and
	calcination

	caromation							
		Acid digestion			Ca	Calcination		
Analyte	Range (mg L ⁻¹)	a s.(mg L ⁻¹)	LD (mg g ⁻¹)	R	a S.(mg L ⁻¹)	LD (mg g ⁻¹)	R	
Ca	0.5 – 3	0.0808	0.45	0.9995	0.0850	0.11	0.9977	
Mg	0.1 – 0.6	0.9817	0.0010	0.9986	1.9050	0.0004	0.9998	
*Range =	concentration ra	inge of the cal	ibration sol	utions: a = slo	ope of the calibr	ation curve	e: LD = limit	

of detection in the measuring solution; R = correlation coefficient of the calibration curve

Table 6 shows the analytical results obtained for the two analytes in xanthan from both methods of sample treatment.

		Acid digestion	on	Calcination		
Analyte	Sample	mg g⁻¹	RSD (%)	mg g⁻¹	RSD (%)	
	Xc-A	10.9 ± 0.15 ^a	1.4	10.8 ± 0.06 ^a	0.5	
	Xc-B	<ld< td=""><td></td><td><ld< td=""><td></td></ld<></td></ld<>		<ld< td=""><td></td></ld<>		
Ca	Xc-C	9.59 ± 0.16 ^b	1.7	10.0 ± 0.24 ^b	2.4	
	Хр-рН 9	<ld< td=""><td></td><td><ld< td=""><td></td></ld<></td></ld<>		<ld< td=""><td></td></ld<>		
	Xp-pH uncontrolled	<ld< td=""><td></td><td><ld< td=""><td></td></ld<></td></ld<>		<ld< td=""><td></td></ld<>		
	Xc-A	0.69 ± 0.02^{d}	2.9	0.67 ± 0.01^{d}	1.5	
	Xc-B	0.24 ± 0.01 ^e	2.4	0.22 ± 0.01 ^e	2.6	
Mg	Xc-C	0.88 ± 0.01 ^c	0.7	$0.89 \pm 0.01^{\circ}$	0.6	
-	Хр-рН 9	2.12 ± 0.03 ^b	4.0	2.01 ± 0.02^{b}	0.9	
	Xp-pH uncontrolled	2.97 ± 0.08^{a}	2.9	2.91 ± 0.05 ^a	1.8	

Table 6 Analytical results for xanthan samples, obtained different sample preparation
methods, by flame atomic absorption spectrometry

* Values = means \pm SD; n = 9; <LD = below the detection limit

** Columns with different letters to each element are significantly different by Tukey test (p < 0.05)

Applying the statistical paired t-tests at a confidence level of 95%, the sample preparation procedures of acid digestion and calcination did not present significant differences in determination of the analytes studied here. In other words, the two procedures provide similar results for Ca and Mg content in xanthan. Therefore, xanthan samples can be treated by acid digestion for analyte determination and this procedure is simpler, easier, and requires less time than the conventional calcination method.

As demonstrated above, good rates of agreement were obtained for the results between the different sample preparation procedures, with differences of less than 10% for both analytes between values obtained by acid digestion and calcination. This difference is a result of the low concentrations of the analytes studied in the xanthan samples. For all samples and for both sample preparation procedures, the relative standard deviations (RSD) were below 5%.

The xanthan samples differed significantly in Mg content; however, only Xc-A and Xc-C showed values of Ca content higher than the detection limits, and there was a significant difference between the results. The total content of divalent salts for xanthan have been estimated to be in the range of 0.085 to 0.17% w/w (García-Ochoa et al., 2000), and both commercial samples and those produced by *X*.

arboricola pv pruni presented different values from the literature. Xc-B has a total content of divalent salts below the expected value (0.024% w/w) and in the other samples, the values found were above the expected values: Xc-A 1.620%, Xc-C 1.047%, Xp-pH9 0.212% and Xp-pH uncontrolled 0.297% w/w.

Xanthan is an anionic polysaccharide whose properties are influenced by the nature and concentration of salts (Cadmus et al., 1976; Carrington et al., 1996; Rinaudo, 2001). The presence of ionic material stabilizes the three-dimensional network of xanthan gum, thus promoting additionally stabilizing viscosity (Kierulf et al., 1988; Xie et al., 1992; Challen, 1994) because the order-disorder temperature transition of the xanthan molecule is strongly dependent on the presence of electrolytes (Xie et al., 1992; Rinaudo, 2001), such that the transition temperature is higher after the addition of salt. According Ross-Murphy et al. (1983) and Xie et al. (1992), divalent salts are more effective. On the other hand, a high salt concentration can cause a conformational change in the xanthan molecule, reducing the hydrodynamic volume and consequently decreasing the viscosity (Carrington et al., 1996; Pelletier et al., 2001).

The salt content can stem from the production media (residual), alkali added to maintain pH, or salts added after fermentation (Borges et al., 2009a). Therefore, the high salt content in xanthan can be the result of an inadequate recovery process. The salt content is a very important parameter for controlling polymer quality, and this is why the development of a reliable and easy to perform sample preparation method, as proposed in this work, is so important.

4. Conclusions

Considering the results obtained in our preliminary studies on the conventional calcination procedure, it is recommended that xanthan samples be prepared in high quality glass beakers. The procedure proposed for sample treatment by acid digestion using nitric acid and perchloric acid compares well with the more conventional calcination decomposition method for the purpose determining Na, K, Ca and Mg in xanthan. This is a fast, easy, simple, and reproducible method and requires half the amount of sample, avoids loss of volatile analytes and is less susceptible to contamination. This method for sample preparation by acid digestion is thus adequate for routine analysis of analytes studied in xanthan samples, resulting in precise and accurate values.

Acknowledgements

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their research scholarship and to the Ministério da Agricultura, Pecuária, e Abastecimento (Mapa) and CNPq for their financial support.

References

ASTM D1428-64 (1981). Annual Book of ASTM Standard, vol. 10. Philadelphia, USA.

Borges, C. D.; Paula, R. C. M. de; Feitosa, J. P. A. & Vendruscolo, C. T. (2009a). The influence of thermal treatment and operational conditions on xanthan produced by *X. arboricola* pv pruni strain 106. *Carbohydrate Polymers*, 75, 262–268.

Borges, C. D.; Vendruscolo, C. T.; Martins, A. L. & Lomba, R. F. T. (2009b). Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 19(2), 160-165.

Born, K.; Langendorff, V. & Boulenguer, P. (2002). Xanthan. In: Steinbüchel, A.; Vandamme, E. J.; De Baets, S. *Biopolymers*, vol. 5 (pp. 259-291) Weinheim: Weley-VCH.

Cadmus, M. C.; Rogovin, S. P.; Burton, K. A.; Pittslev, J. E.; Knutson, C. A. & Jeanes, A. (1976). Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. *Canadian Journal of Microbiology*, 22, 942-948.

Capron, I.; Brigand, G. & Muller, G. (1997). About the native and renatured conformation of xanthan exopolysaccharide. *Polymer*, 38(21), 5289-5295.

Carrington, S.; Odell, J.; Fisher, L.; Mitchell, J. & Hartley, L. (1996). Polyelectrolyte behaviour of dilute xanthan solutions: salt effects on extensional rheology. *Polymer*, 37(13), 2871-2875.

Challen, I. A. (1994). Xanthan gum: a multifunctional stabilizer for food products. In: Nishinari, K.; Doi, E. *Food hydrocolloids: Structures, properties and finctions* (pp. 135-140). New York: Plenum Press.

Flores, E. M. M.; Krug, F. J.; Barin, J. S. & Arruda, M. A. Z. (2008). Decomposição de materiais orgânicos por via úmida. In: KRUG, F. J. *Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos Sobre Preparo de Amostras Orgânicas e Inorgânicas para análise elementar*. (pp. 252-275) Piracicaba.

Freitas, F.; Alves, V. D.; Pais, J.; Costa, N.; Oliveira, C.; Mafra, L.; Hilliou, L.; Oliveira, R. & Reis, M. A. M. (2009). Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresource Technology*, 100, 859-865.

Galindo, E. (1994). Aspects of the process for xanthan production. *Institution of Chemical Engineers*, 72, 227-237.

García-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Casas, J. A. & Gómez E. (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18(7), 549-579.

Hayward, A. C. (1964). Bacteriophage sensitivity and biochemical type in *Xanthomonas malvacearum. Journal of General Microbiology*, 33, 287-298.

Jansson, P. E., Kenne, L. & Lindberg, B. (1975). Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas* campestris. *Carbohydrate Research*, 45, 275-282.

Kamseu, E.; Leonelli, C.; Boccaccini, D. N.; Veronesi, P.; Miselli, P.; Pellacani, G. & Melo, U. C. (2007). Characterisation of porcelain compositions using two china clays from Cameroon. *Ceramics International*, 33, 851-857.

Katzbauer, B. (1998). Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 81-84.

Kebbekus, B. B. (2003). Preparation of samples for metals analysis. In: MITRA, S. *Chemical Analysis: Samples Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, vol. 162 (pp. 227- 270). New Jersey: Wiley-Interscience.

Kierulf, C. & Sutherland, I. W. (1988). Thermal stability of xanthan preparations. *Carbohydrate Polymers*, 9(3), 185-194.

Magalhães, C. E. C.; Flores, E. M. M.; Krug, F. J.; Barin, J. S. & Mesko, M. F. (2008). Decomposição de Materiais Orgânicos por Combustão. In: KRUG, F. J. *Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos Sobre Preparo de Amostras Orgânicas e Inorgânicas para análise elementar*. (pp. 184-251) Piracicaba.

McNelly, W. H. & Kang, K. S. (1973). Xanthan and some other biosynthetic gums. In: WHISTLES, R. L; BEMILLER, J.N., Editors. *Industrial gums*, New York: Academic Press.

Pelletier, E.; Viebke, C.; Meadows, J. & Williams, P. A. (2001). A rheologiacal study of the order disorder conformational transition of xanthan gum. *Biopolymers*, 59, 339-346.

Rinaudo, M. (2001). Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. *Food Hydrocolloids*, 15, 433-440.

Ross-Murphy, S. B., Morris, V. J. & Morris, E. R. (1983). Molecular viscoelasticity of xanthan polysaccharide. *Faraday Symposium of the Chemical Society*, 18, 115-129.

Sloneker, J. H. & Jeanes, A. (1962). Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B - 1459. *Canadian Journal of Chemistry*, 40(11), 2066-2071.

Smith, I. H.; Symes, K. C.; Lawson, C. J. & Morris, E. R. (1981). Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 3(2), 129-134.

Sutherland, I. W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology*, 16(1), 41-46.

Universidade Federal de Pelotas; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Clima (2005). Process for preparing a xanthan biopolymer. International Patent WO/2006/047845.

Vendruscolo, C. T.; Rodrigues, S. A.; Pereira, E. R. B.; Redies, C. R. & Vendruscolo, J. L. (2006). Caracterization of blueberry topping using xanthan gum at thickening agent. In: IFT – Annual Meeting + Food Expo, Orlando.

Viturawong, Y.; Achayuthakan, P. & Suphantharika, M. (2008). Gelatinization and rheological properties of rice starch/xanthan mixtures: Effects of molecular weight of xanthan and different salts. *Food Chemistry*, 111, 106–114.

Xie, W. & Lecourtier, J. (1992). Xanthan behaviour in water-based drilling fluids. *Polymer Degradation and Stability*, 38(2), 155-164.

2º ARTIGO

IMPROVEMENT OF VISCOSITY OF XANTHAN PRODUCED BY Xanthomonas arboricola pv pruni BY ION EXCHANGE

Paula Michele Abentroth Klaic¹, Angelita da Silveira Moreira², Lígia Furlan³, Claire Tondo Vendruscolo²

¹Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário s/nº, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.
²Departamento de Ciência dos Alimentos – Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário s/nº, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.
³Departamento de Química – Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário s/nº, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

Abstract

We propose a very simple post-fermentative process that resulted in xanthans with differentiated rheological properties. Xanthans produced by *Xanthomonas arboricola* pv pruni strain 101 under pH7 and 9 showed higher yield and viscosity than that produced at uncontrolled pH, being selected to be modified by an ion exchange post-fermentative process. The pH used during fermentation affected the characteristics of xanthans and the ion exchange process. On the xanthan salt free solutions at 1% (w/v) were added increasing amounts of Na⁺ (0.5-15% w/w), and Ca²⁺ (0.5-10% w/w) in relation of xanthan content. No variation in viscosity on xanthan pH7 and slight variation on xanthan pH9 were observed before

recovery. An improvement of viscosity was observed on all xanthans after recovery, mainly by addition of 5% of Na⁺ and 0.5% of Ca²⁺ to both xanthans.

Keywords: xanthan; ion-exchange; sodium and calcium; rheology.

1 Introduction

Xanthan gum is a high molecular weight extracellular polysaccharide produced by bacteria of the genus *Xanthomonas*, and may be chemically considered as an anionic polyelectrolyte (ROSS-MURPHY; MORRIS; MORRIS, 1983), with a backbone chain of two units $1 \rightarrow 4 \beta$ -D glucose linked to a trisaccharide side chain consisting of two D-mannose units alternating D-glucuronic acid (JANSSON; KENNE; LINDBERG, 1975; SLONEKER, JEANES, 1962). The internal mannose unit is variably acetylated and about half the terminal D-mannose (external) contains pyruvic acid residues; the proportion of these substituents is dependent on the bacterial strains and fermentation conditions (CADMUS et al., 1976; CADMUS et al., 1978). To these acidic residues are linked, in different proportions, cations such as Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ coming from the salts used in media of production and in maintenance pH solution or added after fermentation.

The applications of xanthan such as stabilizer, emulsifier and suspending agent derive from the physical properties of the polymer (SUTHERLAND, 1996; VUYST; LOO; VANDAMME, 1987). Xanthan gum exhibits high viscosity in solution, even at relatively low concentrations; is soluble in both hot and cold water (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; MCNEELY; KANG, 1973; ROCKS, 1971); is compatible with a range of salts (ionic strength); stable in wide pH range and their solutions are very resistant to high temperatures (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; CHALLEN, 1994; GALINDO, 1994; MCNEELY; KANG, 1973). Because of its physical properties and compatibility with many food ingredients and additives (CHALLEN, 1994) as proteins, lipids and other polysaccharides as starch and pectin (SUTHERLAND, 1998), xanthan is significantly used in food industry.

The rigid ordered conformation is responsible, in part, by the remarkable rheological properties of the molecule (CAPRON; BRIGAND; MULLER, 1997). The presence of salt stabilizes the ordered conformation of molecule (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002, KATZBAUER, 1998).

It seems to be well established that the effect of salt addition in the xanthan viscosity depends on concentration and nature of salt, and concentration of the polymer in solution (CADMUS et al., 1976; MULLER et al., 1986; PELLETIER et al., 2001; RINAUDO, 2001; SANDFORD et al., 1977). The critical concentration (C*) is the dividing point between a dilute and a concentrated solution (NASH et al., 2002) and depends on the type of polymer, especially of molecular weight and intrinsic rigidity (LAUNAY; CUVELIER; MARTINEZ-REYES, 1997). With increased ionic strength (addition of salt), in xanthan solutions that still exhibit typical semidilute solution behavior (below the critical concentration), it was observed a progressive collapsing from an extended random-coil conformation to a more compact coil; causing a decrease in hydrodynamic volume of the molecule, which leads to a decrease in the values of rheological parameters, such as viscosity (CARRINGTON et al., 1996; PELLETIER et al., 2001). Monovalent salts such as NaCl cause a slight lowering in the viscosity at low concentration (below 0,2% w/w) of xanthan gum. On the other hand, solutions containing higher gum concentration have an increase in viscosity upon the addition of NaCI (JEANES; PITTSLEY; SENTI, 1961).

An increase in the values of rheological parameters can be induced by adding electrolyte when the solution is above the critical concentration of the polymer due to intermolecular associations that are facilitated by reducing the electrostatic repulsions and ordering of the chains, leading to the development of threedimensional network (PELLETIER et al., 2001). The cations have the most effect for anionic polymers (CLARKE-STURMAN; PEDLEY; STURLA, 1986). In accordance with some authors the increasing in viscosity of xanthan, due to the addition of salts, only occurs when the degree of pyruvate substitution is high enough to promote the intermolecular associations (FLORES CANDIA; DECKWER, 1999; MULLER et al., 1986; SMITH et al., 1981; ROSS-MURPHY; MORRIS; MORRIS, 1983).

The order of effectiveness of counterions in promoting of associations increases through the order $Na^+ < K^+ < Ca^{2+}$ (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; ROSS-MURPHY; MORRIS; MORRIS, 1983). Lambert, Milas e Rinaudo (1985) studied the activity of Na^+ and Ca^{2+} , showing that its effects are related to the site-binding of the carboxyl groups of the polymer. Changes in the balance of associated cations can induce changes in "weak-gel" properties, since the effect of interactions intermolecular is much greater than for associations nonspecific. The effectiveness of Ca^{2+} in the viscosity increment can be explained by site-binding

of the ions between pairs of carboxil groups on separate helices; thus promoting intermolecular cross-linking and strengthening the weak-gel network (BERGMANN; FURTH; MAYER, 2008; LAMBERT; MILAS; RINAUDO, 1985; MOHAMMED et al., 2007; SMITH; PACE, 1982).

In this study, we aimed evaluate the influence of pH on the characteristics of xanthan produced by *X. arboricola* pv pruni strain 101 and propose a post-fermentation process for removal, by ion exchange, the ions incorporated in the gum during the fermentation process, improving the rheological properties of xanthan by the incorporation of Na⁺ and Ca²⁺ in variables concentrations.

2 Materials and methods

2.1 Bacterial strain

Xanthomonas arboricola pv pruni strain 101 used in this study was isolated at the Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (EMBRAPA), Pelotas, Brazil). The bacterial strain was maintained on SPA agar (HAYWARD, 1964) stored at 4°C and subcultured monthly.

2.2 Xanthan production

The xanthan was produced in bioreactor (BioStat B Braun Biotech International®) at a 10L vessel with 7L of fermentation medium (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. Process for preparing a xanthan biopolymer. WO/2006/047845, 01 nov. 2005). Fermentations with three conditions of pH were performed: uncontrolled pH and controlled at pH7 and 9 by addition of 2M NaOH. The xanthans produced will be referred to as Xa-pH uncontrolled, Xa-pH7 and Xa-pH9, respectively. In the end of fermentation the pH was around 3.5 for uncontrolled pH condition. The others conditions, such as stirrer speed, air flow rate, temperature and fermentation time, were the same for all fermentations (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS; EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. Process for preparing a xanthan biopolymer. WO/2006/047845, 01 nov. 2005).

The fermented broths resulting from these three conditions of pH were thermal treated at 121°C for 15min and the polysaccharides were recovered by

precipitation with addition 96% ethanol at a 4:1 ratio (v/v). After recovery the xanthan were dried at 56°C until constant weight and then were powdered to particle size using 60-150 mesh. The xanthan yield was determined by gravimetric methods in grams of dry polymer per liter of fermented broth (g L^{-1}).

2.3 Chemical and physical characterization

2.3.1 Nitrogen, ash and moisture content

The xanthan produced were characterized by determination of the nitrogen, ash and moisture by the methods 036/IV, 018/IV and 012/IV, respectively (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004).

2.3.2 Viscosity of xanthans produced

Xanthan gum solutions (1% w/v) were prepared by dissolving xanthan powder in ultrapure water and stirring for 2h at room temperature. Stirring was not too vigorous in order to minimize air incorporation into the solutions. The xanthan solutions were heated at 60°C for 20min (XUEWU et al., 1996). Before use, the solutions were stored for 24h at 4°C to minimise bacterial growth.

The viscosity of the xanthan aqueous solutions were measured with a RS 150 Haake rheometer in the rotary mode at 25°C, using a cone-and-plate geometry (C35/1° sensor; 0.052mm gap) and shear rate of 0.01-1000s⁻¹, during 400s.

2.3.3 Carboxyl, pyruvate and acetyl content

To carboxyl determination 300mg of the samples were demineralized with 30mL 0.1M HCl, recovered by 96% ethanol addition at a 4:1 ratio (v/v) and the precipitated polymers were washed thoroughly with 96% ethanol. After washing, the polymers were dispersed in 300mL of ultrapure water and titrated with 0.1M NaOH according Smith (1967).

The acetyl and piruvate content were measured according McComb and McCready (1957) and Slonecker and Orentas (1962) by colorimetric methods of the hydroxamic acid and 2.4-dinitrophenylhydrazone, in that order.

2.3.4 Infrared Spectroscopy

The infrared spectra of xanthans produced was obtained by grinding it with potassium bromide (KBr) powder, spectrophotometer degree, then pressed into a disk. It was used the range of the electromagnetic spectrum between 4000-400 cm⁻¹ in spectrophotometer (Model IR Prestige 21, Shimadzu®) in order to observe the functional groups.

2.3.5 Sodium, potassium, calcium and magnesium content

Sodium and potassium determination were performed using a flame photometer (Model B462, Micronal®). Calcium and magnesium were determination using a atomic absorption spectrophotometer (Model AA- 6300, Shimadzu®). The samples were treated by acid digestion; 100mg of xanthan samples were weighed into glass digester flasks and 5mL of concentrated HNO₃ was added. The mixture was heated in a digester block (Model MA-4025, Marconi®) at 100°C for about 2h. After cooling at room temperature 2mL of HClO₄ was added and the mixture was again heated at the same temperature for more than 1h. After cooling at room temperature, the samples were diluted with ultrapure water to a final volume of 50mL into volumetric flask, with subsequent dilutions appropriate for each analyte for subsequent analysis (Klaic et al. unpublished results).

All glass apparatuses were washed and subsequently immersed in 10% v/v HNO₃ for at least 48h and then rinsed with ultrapure water prior to use. The nitric acid and the cloridric acid (Synth, Brazil) used for the samples treat and for washing glass apparatuses were further purified by distillation in a sub-boiling quartz system (Model MA-075, Marconi®).

2.3.6 Qualitative determination of monosaccharide and acid derivates

For the qualitative determination of monosaccharides and acids derivates the comparative thin-layer chromatography (TLC) technique was used. For this, the polymers were hydrolyzed in a concentration of 3% (w/v) with 2M HCI. A volume of 3μ L of standards and hydrolyzed samples were applied on TLC aluminum sheets silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Germany) and eluted with chloroform: methanol: acetic acid: water, at a ratio of 40:40:10:10 (v/v/v/v). The spots were visualized using a sulfuricanisaldehyde reagent and heating at 100°C for 5min (VENDRUSCOLO et al., 2000).
2.4 Ion-exchange

The samples were hydrated by ultrapure water addition at a 99:1 ratio (v/w) for 24h being stored until use at 4°C to minimise bacterial growth. After, the mixtures were stirred for 2h at room temperature and ion exchanged with Amberlite® IR 120 H⁺, a gel type strongly acidic cation exchange resin of Styrene-Divinylbenzene composition (Sigma-Aldrich USA). The resin has a sulfonic acid active group and total exchange capacity of 1.9 meq mL⁻¹, mesh/bead size 16-50, moisture 45%, maximum operating temperature of 120°C and pH range of 0-14.The exchange was controlled by pH and conductivity of xanthan solution. After ion exchange, the resin was washed with ultrapure water and regenerated with 1M HCI.

To the xanthan solutions Xa-pH7 and Xa-pH9 (1% w/v) salt free, were added 0.5, 2.5, 5.0, 10.0 and 15.0% (w/w in relation of xanthan content) of Na⁺ by NaCl addition; and 0.5, 2.5, 5.0 and 10.0% (w/w in relation of xanthan content) of Ca²⁺ by CaCl₂ addition. The solutions remained in repose for about 4h. The influence of these ions was measure by viscosity of the solutions before and after ions addition (before recovery). Subsequently, the xanthan were recovered by precipitation with non-solvents, dried and powdered according section 2.2. Solutions of xanthan at 1% (w/v) were prepared as described in section 2.3.2 for viscosity measure again. A control was prepared by purification of xanthans; the polymers were dissolved and recovered without ion exchange and without salts added.

To check the ion incorporation in the xanthan molecule, the Na⁺ and Ca²⁺ content was determined as described previously at section 2.3.4.

2.5 Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and the results were submitted to a variance analysis, with comparison of means using the Tukey test at 5% significance level.

3 Results and discussion

3.1 Yield and viscosity of xanthan produced under different pH conditions

As showed in Figure 1, xanthan production and viscosity were influenced by the pH conditions used in fermentation process.



Figure 1 – Yield (g L⁻¹) and viscosity (mPas) at 100s⁻¹ of xanthans produced at different pH conditions. Means with different letters are significantly different from each other. Capital letters for yield and small letters for viscosity (p<0.05)

All conditions of pH presented significantly different results by Tukey test at 5% significance level. The highest xanthan yield (19.16g L⁻¹) was found under pH7 controlled and the lowest yield (10.39g L⁻¹) in uncontrolled pH. Our results agree with the previous findings of others. Borges et at. (2009a) found similar results to xanthan yield, but with a slightly lower production, growing another strain under the same conditions of pH. Several authors agree that neutral pH is the optimum value for growth of *X. campestris* (CADMUS et al., 1978; FLORES CANDIA; DECKWER, 1999; VUYST; LOO; VANDAMME, 1987). To others authors (GARCÍA-OCHOA; SANTOS; ALCÓN, 1995) the pH control have no effect on the xanthan production. However, in this study, was also observed that neutral pH improved the xanthan production by *X. arboricola* pv pruni.

The pH used in the fermentation process influences the rheological behavior. The aqueous solutions of the polymers at 1% (w/w) produced under the three conditions of pH showed pseudoplastic behavior, typical of xanthan (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; MCNELLY; KANG, 1973, GARCÍA-OCHOA et al., 2000; ROCKS, 1971).

Whereas, the polymers produced under conditions of controlled pH presented the highest viscosity. Xanthan synthesized at pH9 has a higher viscosity,

however, the neutral pH favors yield (Figure 1). The viscosity values for the xanthan produced under uncontrolled pH were lower than the viscosity of the xanthans produced at controlled pH conditions. Borges et al. (2009) found similar results, but the highest viscosity was reached at pH7. The viscosity and pseudoplasticity are influenced by conditions of fermentation (CADMUS et al., 1978; TAIT; SUTHERLAND; CLARKE-STURMAN, 1986), however this influence is strain dependent (MOREIRA et al., 2001). The rheological behavior of xanthan solutions can be taken as an indicator of xanthan quality and an important characteristic to be considered in the selection of strains and conditions for industrial production of polymer (NITSCHKE; THOMAS, 1995).

The two conditions of controlled pH presented good production, but the yield at pH7 was about 9% highest that at pH9. On the other hand, the xanthan obtained at pH9 had viscosity 32% highest at shear rate of 100s⁻¹. So, neutral condition favored yield and alkaline condition favored viscosity. Alkaline condition showed better results, with intermediary yield and high viscosity.

3.2 Nitrogen, ash and moisture content

Xanthans produced at different conditions of pH differed on the nitrogen content. Only Xa-pH7 and Xa-pH9 agree with the proposed to commercial xanthan (Table 1).

Analysis ⁻	Xanthan								
	Xa-pH uncontrolled	Xa-pH7	Xa-pH9	Superior Limits*					
Nitrogen	$1.90^{a} \pm 0.03$	$0.99^{b} \pm 0.01$	$0.85^{\circ} \pm 0.006$	1.5%					
Ash	$8.89^{c} \pm 0.08$	14.87 ^b ± 0.06	$15.60^{a} \pm 0.23$	16%					
Moisture	$4.40^{a} \pm 0.00$	$4.80^{a} \pm 0.20$	$4.67^{a} \pm 0.23$	15%					

Table 1 – Nitrogen, ash and moisture content (% w/w) of xanthan produced by different pH conditions

Values = means \pm SD; n = 6. Lines with different letters are significantly different by Tukey test (p<0.05). *Limits established by FAO (1999).

According García-Ochoa et al. (2000) the values of nitrogen contents are estimated between 0.3 and 1%, with a maximum establishes at 1.5% by Compendium of Food Additive Specification (FAO, 1999). The xanthan produced at uncontrolled pH presented discordant values with the literature. The nitrogen content

can be derived from inactived cells no removed or from media of production; however, all samples were produced in the same media and treated by the same process of post-fermentation.

All xanthan produced in the pH conditions studied showed ash content according with the limits specified by the literature. The maximum value of 16% is estimated by FAO (1999). The highest ash content was obtained in condition of pH9 and pH7. In these conditions, the control of pH is performed by NaOH addition and the highest ash contents coming from incorporation of Na in the xanthan.

In Table 1 are shown similar values of moisture for all conditions of pH and the results are below the expected. The xanthan must present final moisture content between 8 and 15% (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; BURDOCK, 1997; GARCÍA-OCHOA et al., 2000) and usually is about 10%, state in which the polymers are hygroscopic and undergo hydrolytic degradation; so it is important to make use of packings with low water permeability (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; SMITH; PACE, 1982).

3.3 Carboxyl, pyruvate and acetyl content

The xanthan produced at uncontrolled pH showed higher and significantly different values to the carboxyl content (Table 2) compared with the polymers produced under neutral and alkaline conditions. However, all xanthans showed lower values than reported by authors as Mohammed et al. (2007), which presented a carboxyl content of 6.6% (w/w) to a commercial xanthan from Kelco®. The low values found to carboxyl content can be explained by the results of ion exchange and addition of variables concentrations of these cations. These results will be discussed in Section 3.7. The cations content, such as Na⁺ and Ca²⁺ are related with carboxyl groups (MOHAMMED et al., 2007; ROCKS, 1971).

Analysis		Xanthan	
Allalysis	Xa-pH uncontrolled	Xa-pH7	Xa-pH9
Carboxyl	$3.44^{a} \pm 0.15$	2.97 ^b ± 0.15	$2.92^{b} \pm 0.08$
Pyruvate	$0.61^{\circ} \pm 0.01$	$1.52^{a} \pm 0.01$	$0.68^{b} \pm 0.03$
Acetyl	$4.94^{a} \pm 0.17$	$2.39^{b} \pm 0.07$	$0.19^{c} \pm 0.03$

Table 2 – Carboxyl, pyruvate and acetyl content (% w/w) of xanthan produced by different pH conditions

* Values = means \pm SD; n = 9. Lines with different letters are significantly different by Tukey test (p<0.05).

As it showed in Table 2, the highest pyruvate content was obtained under pH7, and the highest acetyl content was obtained at pH uncontrolled. Borges et al. (2009a) growing strain 106 under these conditions of pH found results in agreement with ours. According Burdock (1997) the commercial xanthan must to have pyruvate content not less than 1.5%. As can see, only xanthan produced at pH7 is in accordance with this specification. To the acetyl content all xanthans produced showed significantly different results. The concerning literature report values estimated between 1.9 and 6.0% (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). The polymer produced at pH9 presented acetyl content less than that established. The lowest content of acetyl that we found can be explained by deacetylation that can occur in this condition of pH (MCNEELY; KANG, 1973; UNITED STATES, SECRETARY OF AGRICULTURE. Method of producing an atypically salt-responsive alkalideacetylated polysaccharide. U. S., Patente n. 3 000 790, 19 set. 1961).

The influence of pyruvate and acetyl content in the xanthan rheological properties still is controversial. Some authors related that the pyruvate substituent influences the viscosity of xanthan solutions and is considered an indicator of the polymer properties (CADMUS et al., 1978; FLORES CANDIA; DECKWER, 1999; SANDFORD, 1977; SMITH; PACE, 1982; SMITH et al., 1981). According Sandford (1977), higher pyruvate content (>4%) increases viscosity of xanthan. Flores Candia and Deckwer (1999) studied the effects of the pyruvate content on the viscosity of xanthan solutions in the presence of 0.12M of KCI checking large effect on the rheological parameters. Similar results were found by Smith and Pace (1982). Nevertheless, some authors showed low or any correlation between the content of pyruvate and the thickening ability of the polymer (BORGES et al., 2009a; BRADSHAW et al., 1983; TORRESTIANA; FUCIKOVSKY; GALINDO, 1990). Our

results are in agreement with these authors. In this study, an increase in pyruvate content could not be correlated with the improvement of the xanthan solution viscosity.

According Sloneker and Jeanes (1962) and Smith and Pace (1982) the acetyl content can also influence the xanthan viscosity, which increase with decrease of acetyl degree (UNITED STATES, SECRETARY OF AGRICULTURE. Method of producing an atypically salt-responsive alkali-deacetylated polysaccharide. U. S., Patente n. 3 000 790, 19 set. 1961). Some authors did not observe influence in rheological properties by decrease of acetyl content (BORGES et al., 2009a; BRADSHAW et al., 1983; MCNEELY; KANG, 1973). Casas, Santos and García-Ochoa (2000), observed high viscosity with high content of acetate. Unlike, in this study, we observed that xanthan with lowest acetyl content showed higher viscosity.

3.4 Infrared Spectroscopy

In Figure 2 are illustrated the spectra of absorption of the xanthans produced at uncontrolled pH, pH7 and pH9.



Figure 2 – Infrared spectra, in KBr tablet of xanthans produced at uncontrolled pH, pH7 and pH9.

The technique of spectroscopic absorption vibration in the infrared was performed with the intention of proving the deacetylation that occurs in polymer produced in alkaline condition, by the absence of absorption bands characteristic of these functional groups.

The spectra of the xanthan samples present a strong and broad absorption band in 3424cm⁻¹, considering the hydroxyl group (OH) in hydrogen bond and at 2929cm⁻¹, in relation to the asymmetrical stretching of the group methylene (CH₂). The symmetrical stretching mode of the C-H links in the methyl (CH₃) group causes a band at 1375cm⁻¹. However, at 1257cm⁻¹ a band of symmetrical stretching of the esters C-O bond was verified, and at 1628cm⁻¹, for the asymmetrical stretching of the anion carboxylate.

The symmetrical stretching of the esters C=O bond is characterized by a band at 1730cm⁻¹ which is present in the spectra of the xanthans produced at uncontrolled pH and pH7. Moreover, in the spectrum of the xanthan produced at pH9 this band disappeared, proving the deacetylation in this condition. This also was verified in the chemical analysis of the xanthans where it was found a lower value for the acetyl content (0.19%). The methyl ester shows a band at 1250cm⁻¹. This band can also be observed in the spectra of the xanthans produced at uncontrolled pH and pH7; however, the intensity is decreased in xanthan at pH9. The infrared spectroscopic provided the confirmation of the removal of the acetyl groups from the xanthan, which was also detected through chemical analysis of the degree of acetyl groups (Table 2).

3.5 Sodium, potassium, calcium and magnesium content

As showed in Table 3, all cations analyzed differed by Tukey test (p<0.05) for xanthans produced in different pH conditions.

Analysis		Xanthan	
Analysis	Xa-pH uncontrolled	Xa-pH7	Ха-рН9
Sodium	$0.19^{c} \pm 0.03$	$4.00^{b} \pm 0.08$	$6.42^{a} \pm 0.78$
Potassium	$4.31^{a} \pm 0.13$	$3.01^{b} \pm 0.45$	$2.54^{\circ} \pm 0.24$
Calcium	< LD	< LD	< LD
Magnesium	$0.3^{a} \pm 0.08$	$0.17^{c} \pm 0.05$	$0.21^{b} \pm 0.03$

Table 3 – Sodium, potassium, calcium and magnesium content (% w/w) of xanthan produced by different pH conditions

* Values = means \pm SD; n = 9; LD= Limit of detection for Ca (0.45 mgg⁻¹). Lines with different letters are significantly different by Tukey test (p<0.05).

In the xanthan obtained under uncontrolled pH all the salts content has origin in the production medium, while in at the others polymers the sodium content coming from the control pH solutions.

All xanthans showed values for calcium less than limit of detection. Sodium content is mainly related with the condition used, since the control of pH was performed by addition of 2M NaOH. During fermentation process, 196mL of NaOH were added to maintain the pH at 7 and 625mL were added to maintain the pH at 9. As expected, the sodium content increased with volume of NaOH used. On the other hand, the potassium and magnesium content was reduced by NaOH used on pH control.

The commercial xanthan should have a content of monovalent salts from 3.6 to 14.3% (w/w) and bivalent salts between 0.085 and 0.17% (w/w) (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). All xanthans produced showed a value according the limits specified by the literature to monovalent salts, however, only the polymer produced at pH7 is in agreement with the values specified to bivalent salts; perhaps because the commercial xanthan is commonly produced at pH7 (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Xanthan is an anionic polysaccharide whose properties are influenced by concentration and nature of the salt. The viscosity is directly related to the conformation of the polymer (RINAUDO, 2001) and the ordered conformation of xanthan is stabilized by salts (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002, KATZBAUER, 1998); depending on the external salt concentration and composition, the electrostatic repulsion can cause an extension in the molecule and interchain interactions (RINAUDO, 2001).

The xanthan synthesized at pH9 presented the highest salt content and the highest viscosity; an increase in the rheological parameters can be induced by the presence of electrolytes, due to intermolecular associations that are facilitated by reducing the electrostatic repulsion and ordering of the chains, leading to the development of a three-dimensional network (PELLETIER et al., 2001); the presence of ionic material stabilizes the three-dimensional network of xanthan gum, thus promoting an additional stable viscosity (CHALLEN, 1994; JEANES; PITTSLEY; SENTI, 1961). To some authors, the increase in viscosity of xanthan solution due to presence of salt only occurs when the degree of pyruvate substitution is high enough to promote intermolecular associations (FLORES-CANDIA; DECKWER, 1999; SMITH et al., 1981).

3.6 Qualitative determination of monosaccharide and acid derivates

All xanthans produced under different pH conditions had glucose ($R_f 0.58$), manose ($R_f 0.59$), rhamnose ($R_f 0.70$) and glucuronic acid ($R_f 0.34$) (Figure 3) in the chemical composition, as expected for polymers produced by *X. arboricola* pv pruni differing from the commercial xanthan produced by *Xanthomonas campestris* pv campestris (MOREIRA et al., 2001).



Figure 3 – Comparative Thin Layer Chromatography of xanthans produced by Xanthomonas arboricola pv pruni strain 101 at pH7, pH9 and uncontrolled pH (pHunc.). Standards: P₁ glucuronic acid (GA), mannose (M); P₂ glucose (G), rhamnose (R). Eluted with trichloromethanemethanol-acetic acid-wather (40:40:10:10 v/v/v/v).

Quantitative variations of the components are suggested by differences in size and intensity of spots on the chromatograms. Xanthan produced at pH7 had apparently highest mannose (M) concentration while these produced at pH9 had the higher content of glucuronic acid (GA). The xanthans produced under pH7 and 9 had higher rhamnose content.

In the polymer produced at uncontrolled pH a higher content of glucose (G) and degraded glucose (DG R_f 0.93) than the others polymers was found. The highest salt content verified in the xanthans obtained at controlled pH can explain the minor degradation verified due to increment of thermally stability (KIERULF; SUTHERLAND, 1988; XIE; LECOURTIER, 1992).

The viscosity of polymers produced by *Xanthomonas arboricola* pv pruni can be influenced by sugar types and sugar concentration which composing the molecule. According Moreira et al. (2001) polymers with apparent higher mannose content showed higher viscosities; and an opposite effect is showed by polymers with higher glucose concentration. Other authors agree with these results (BORGES et al., 2008).

In our results, xanthan produced at pH7 showed apparent higher mannose content; however xanthan produced at pH9 showed higher viscosity. Others factors influence the xanthan viscosity such as bacterial strain used in fermentation, content of salts and substituents groups (CARRINGTON et al., 1996; MOREIRA et al., 2001; SMITH; PACE, 1982). Xanthan with higher glucose concentration showed the lowest viscosity, in agreement with reported previously by Moreira et al. (2001).

The glicuronic acid can also exert favorable influence in the viscosity of polymers produced by patovar pruni (ANTUNES, 2000). In our study, polymers with higher glucuronic acid content showed higher viscosity than others, in agreement with the previous findings of Antunes et al. (2003).

3.7 Ion-exchange

After investigating the influence of pH in yield and in rheological properties of the xanthan, Xa-pH7 and Xa-pH9 were selected for ion exchange to remove the salts content.

The table 4 shows the results of the resin efficiency to remove cations Na⁺, K⁺ and Mg²⁺.

Adminiant	sy ion exentinge	•	
Vonthon	C	ation Removed (%	6)
Addition	Na⁺	K⁺	Mg ²⁺
Xa-pH7	100 ^a	99.67 ^a	100 ^a
Xa-pH9	100 ^a	99.53 ^a	99.53 ^a

Table 4 – Per cent of sodium, potassium and magnesium removed of xanthan by ion exchange

*Columns and lines with different letters are significantly different by Tukey test (p<0.05) to each xanthan.

Total content of Na⁺ was removed by ion exchange to both xanthans. Xanthan produced at pH7 showed more removal of K⁺ and Mg²⁺, however showed not significantly difference by Tukey test.

To verify the influence of sodium and calcium ions in viscosity of xanthans, we added increasing amounts of Na⁺ and Ca²⁺ in xanthan solutions (1% w/v) after ion exchange. Subsequently the viscosity of solutions were measured and the polymers

recovered. Table 5 shows the variations of the xanthan recovery degree and cations incorporation in xanthans ion exchanged.

	_	Xanthan								
	(0/)		Xa-pH7		Xa-pH9					
Cation	(70)	Xanthan	Cation ²	Cation ³	Xanthan	Cation ²	Cation ³			
	Auueu	Recovery	Content	Incorporated	Recovery	Content	Incorporated			
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)			
	0.5	75 ^A	0.30 ⁿ	44	64 ^C	0.46 ^m	58			
	2.5	73 ^{AB}	0.93 ^j	27	64 ^C	1.04 ⁱ	26			
Na⁺	5.0	71 ^B	1.25 ^h	18	65 ^C	1.38 ⁹	18			
	10	73 ^{AB}	1.60 ^f	12	64 ^C	1.96 ^d	12			
	15	73 ^{AB}	2.11 ^c	10	64 ^C	2.42 ^b	10			
O -2+	0.5	74 ^{AB}	0.61 ¹	90	62 ^c	0.76 ^k	94			
Ca	2.5	75 ^A	1.59 ^f	48	64 ^C	1.76 ^e	45			
	5.0	74 ^{AB}	1.81 ^e	27	64 ^C	2.10 ^c	27			
	10	76 ^A	2.01 ^{cd}	15	66 ^c	2.60 ^a	17			

Table 5- Recovery of xanthan and sodium and calcium content after ion exchange

*Columns and lines with different letters are significantly different by Tukey test (p<0.05). Capital letters for xanthan recovery and small letters for cation content.

¹In relation to the xanthan content before recovery; ²In relation to the xanthan content after recovery; ³In relation to the cation content added.

The degree of recovery after addition of different amounts of Na⁺ and Ca²⁺ was slight low to Xa-pH7, and Xa-pH9 showed not significantly different results. As it can be observed, the xanthan Xa-pH9 provided lower values for xanthan recovery, with a considerable loss towards of 35% of xanthan; to Xa-pH7 the loss was of about 25%. Moreover, these losses were offset by increases in viscosity (Table 6), because when the viscosity is high, a lower concentration is required.

The highest percent of cations incorporated were reached on Xa-pH9 being 58% and 94% for sodium and calcium, respectively. The values of cations incorporated can be explained by the content of carboxyl, since the cations such as Na⁺ and Ca²⁺ are linked to these groups (LAMBERT; MILAS; RINAUDO, 1985; MOHAMMED et al., 2007; ROCKS, 1971). The xanthans produced at neutral and alkaline pH showed similar results of carboxyl content with values of approximately 2.9% (w/w) and the highest cation incorporation was close to this value.

In general the Ca²⁺ was more linked than Na⁺, with the highest percentage of incorporation for both xanthans. The order of effectiveness of counterions in promoting of associations increases through the order Na⁺ < K⁺ < Ca²⁺ (BORN;

LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; ROSS-MURPHY; MORRIS; MORRIS, 1983).

To explore the viscosity dependence of cations associated of xanthan, we investigated the influence of ions by viscosity measures of xanthans salt free and added of Na⁺ and Ca²⁺ before and after precipitation. The results are showed in Table 6.

	(%)	Xanthan Viscosity										
Cation			Xa-pH7 Shear rate (s ⁻¹)					Xa-pH9				
Callon	Added*							Shear rate (s ⁻¹)				
		10	30	60	100	1000		10	30	60	100	1000
	0	1790	644	340	214	44		2570	1010	578	369	64
Na⁺	5.0	1790	656	347	219	45		2170	844	499	327	57
	10	1710	641	350	218	44		1980	826	481	326	60
	15	1780	644	339	221	44		1770	691	427	282	52
	0	1790	644	340	214	44		2570	1010	578	369	64
Ca ²⁺	0.5	1790	633	342	216	45		2250	910	532	350	63
	2.5	1700	625	341	215	43		2000	808	480	326	60
	5.0	1680	621	335	210	42		1850	773	460	320	60
	10	1750	633	341	210	40		1750	692	425	296	54

Table 6 – Apparent viscosity (mPas) of 1% (w/v) aqueous solutions of xanthans after ion exchange and addition of Na⁺ and Ca²⁺ measures before recovery

*In relation to the xanthan content before recovery.

The viscosity of xanthans salt free solutions was not significantly changed, regardless of type and concentration of added salts.

The xanthan gum is an anionic polysaccharide whose properties are influenced by the concentration of the molecules in solution (SANDFORD et al., 1977). Thus the change in viscosity that occurs when an electrolyte is added is influenced not only by the nature and concentration of salt, but also by the concentration of polymer (CADMUS et al., 1976; RINAUDO, 2001). When the molecule is already in an ordered state, the structural characteristics and rheological properties are not affected by adding electrolytes (PELLETIER et al., 2001), until a super-concentration of these. This ordered conformation is adopted by xanthan on 1% solutions and 25°C (PELLETIER et al., 2001). As expected, ours results are in agreement with this proposal to xanthan Xa-pH7, since addition of increasing amounts of Na⁺ and Ca²⁺ affect slight the viscosity of solutions.

In opposition, a decrease in viscosity occurs with increase of cations concentrations added in xanthan Xa-pH9. This behavior can be related to the

composition of the polymer and stability of ordered conformation. Acetyl groups tend to stabilize the ordered form by promoting association of the side chains with the backbone through hydrogen bonding (PELLETIER et al., 2001). Xanthan Xa-pH9 has a lower content of acetyl. So, the effect of high concentrations of salts could be expected to be different to each xanthans. Some authors report that a decrease in the values of rheological parameters can occur with increased ionic strength in xanthan solutions still exhibit typical semidilute solution behavior (below critical concentration), because decrease the hydrodynamic volume with the change in conformation to a more compact coil (CARRINGTON et al., 1996; PELLETIER et al., 2001). The critical concentration is depends on the type of polymer, especially of molecular weight and intrinsic rigidity (LAUNAY; CUVELIER; MARTINEZ-REYES, 1997); so, is variable to each xanthan. Other possibility is that can occurs of a partial precipitation of xanthan, since addition of salts in higher concentration causes precipitation or coacervation due to ion-binding of the cations to the ionized groups on the polyanion (SMITH; PACE, 1982).

After recovery, drying and milling, solutions of xanthans at 1% were prepared and, the viscosities were again measured. Table 7 shows the variation of viscosity of xanthans recovered after addition of Na⁺ and Ca²⁺.

	(%)	Xanthan Viscosity										
Cotion		(%) Xa-pH7						Xa-pH9				
Callon	Added*		Shear rate (s ⁻¹)					Shear rate (s ⁻¹)				
		10	30	60	100	1000	10	30	60	100	1000	
	5.0	5330	2830	1880	1250	301	8900	4430	2500	1440	226	
Na⁺	10	4370	2120	1350	962	255	4090	2270	1640	1110	248	
	15	4940	2510	1540	953	171	5430	3140	2160	1490	242	
	0.5	9250	5030	2440	1290	185	-	12000	4590	1560	129	
Ca ²⁺	2.5	3450	1580	941	646	205	4200	2070	1200	768	154	
	5.0	3720	1490	909	624	196	3350	1500	903	626	161	
	10	3180	1190	667	454	135	3500	1510	888	610	161	

Table 7 – Apparent viscosity (mPas) of 1% (w/v) aqueous solutions of xanthans after ion exchange and addition of Na⁺ and Ca²⁺ measures after recovery

*In relation to the xanthan content before recovery.

An increase in the viscosities was observed when Na^+ concentrations of 5% or higher, and when all Ca^{2+} concentrations studied were added in solutions of xanthans salt free. The addition of higher concentrations of electrolytes reduces the electrostatic repulsion, leading to ordering of the chains, thus facilitating the intermolecular associations (PELLETIER et al., 2001). Intermolecular associations

and development of three-dimensional network increases the viscosity (PELLETIER et al., 2001). This effect is more important to Na⁺ because the Ca²⁺ can also promote intra or inter molecular binding due to his bivalent nature.

The presence of ionic material stabilizes the three-dimensional network, promoting thus an additional viscosity (CHALLEN, 1994).

To examine the influence of ionic concentration in the conformation reordering, the polymers salt free were precipitated and resuspended. The ion exchange resulted in xanthans insoluble in ultrapure water and this condition remained after addition of 0.5 and 2.5% of Na⁺. Some authors related that the ordered conformation is stabilized by salts incorporation (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002, KATZBAUER, 1998) and is responsible for its rheological properties (CAPRON; BRIGAND; MULLER, 1997). An alternative interpretation for insolubility of xanthans at lower salt concentration is the disordering of the conformation. The ordered structure like a helix would be modified to a compact random-coil by hydrogen bonds intra and intermolecular, decreasing polymer-solvent affinity of the hydrophilic parts of the polymer. Second Clarke-Sturman, Pedley and Sturla (1986), xanthan is more hydrophobic than some proteins such as collagen end ribonuclease, and the hydroxil groups on polysaccharides that enable the hydrophobic moieties to exist in such proximity in aqueous solutions. Mohammed et al. (2007) stabilizes the ordered conformation by incorporation of 10mN NaCl. We verified that when concentrations of 0.5 and 2.5% of Na⁺, in relation to the xanthan content before recovery were added the salt incorporation was not sufficient to ensure complete conformational reordering of xanthans and these polymers continued insoluble.

The xanthans Xa-pH7 and Xa-pH9 were purified (control) by resuspension and recovery without ion exchange and salts added. The xanthans controls presented a decrease in viscosities, as showed in Figure 4. So, the increase observed after ion exchange and addition of salts in xanthans recovered is not related with the possible purification of xanthans after dissolution and again recovery.



Figure 4 – Curves of viscosity (mPas) vs shear rate (s⁻¹) of 1% (w/v) aqueous solutions of xanthans Xa-pH7 and Xa-pH9 and their respective controls.

The increase in viscosity by addition of Ca⁺² can be due to intermolecular associations promoted by binding of Ca²⁺ between pairs of carboxil groups on separate helices (BERGMANN; FURTH; MAYER, 2008; LAMBERT; MILAS; RINAUDO, 1985; MOHAMMED et al., 2007; SMITH; PACE, 1982). Second Smith and Pace (1982), bivalent salts tend to require two binding sites on polyanion, thus, intra or inter chain bonding can occur, predominating at lower concentrations of bivalent salts. A single divalent cation is bound between the terminal ends of two side chains, leading to an intramolecular cross linking (BERGMANN; FURTH; MAYER, 2008). Ross-Murphy, Morris and Morris (1983) evaluated the behavior of xanthan samples modified by ion exchange to single-salt forms of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ and found that the Ca²⁺ form of xanthan, compared with the native form, shows the greater increase in viscosity.

Mohammed et al. (2007) explored the effect of calcium ions by observing the changes in rheology induced by the addition of increasing amounts of $CaCl_2$. The initial increase in the gel-like character with increasing concentration of Ca^{2+} is due to intermolecular associations; the reduction in gel-like character at Ca^{+2} concentrations between 100 and 200% stoichiometric equivalence to the carboxyl groups of the polymer, is attributed to the association of Ca^{+2} ions with individual carboxyl groups with reduction in the extent of cross linking.

The addition of salts has distinct effects in viscosity of different xanthans. These different effects, possible, are due to differences in molar mass, molecular conformation or chemical composition (NITSCHKE; THOMAS, 1995). Xanthan XapH7 showed the highest increase in viscosities. The stability in the presence of Ca⁺² depends on the xanthan sample nature, especially on the degree of pyruvate substitution (XIE; LECOURTIER, 1992). Second some authors addition of salts increase the viscosity of xanthan only when the degree of pyruvate substitution is high enough to promote the intermolecular associations (FLORES CANDIA; DECKWER, 1999; MULLER et al., 1986; SMITH et al., 1981; ROSS-MURPHY; MORRIS; MORRIS, 1983). Ours results show that a highest increment in viscosity, by addition of salts, occurs with higher degree of pyruvate (Xa-pH7), agreement with previous results.

The highest viscosity was provided by addition of 5% of Na⁺ and 0.5% of Ca²⁺ to both xanthans as showed in Table 7. These results are illustrated in Figure 5.



Figure 5 – Curves of viscosity (mPas) vs shear rate (s⁻¹) of 1% (w/v) aqueous solutions of (a) Xa-pH7 and (b) Xa-ph9 after ion exchange (IE) and addition of 5% of Na⁺ and 0.5% of Ca²⁺ measured after (Af) recovery.

Borges et al. (2009b) verified a decrease in viscosity and pseudoplasticity in commercial xanthans prepared in salts solutions at 6% (w/v), 0.02% (w/v) and 0.008% (w/v) of NaCl, CaCl₂ and MgCl₂, respectively. In ours study, a increase in salts concentration decreased the viscosity of xanthans solutions.

In absence of shear, the xanthans solutions showed a very high apparent viscosity. As the shear rate is increased, the viscosity decreased, so the xanthans solutions exhibit pseudoplastic behavior. This pseudoplastic property is very important in pumping systems for the food industry (KATZBAUER, 1998; ROCKS, 1971). The behavior with the addition of Na⁺ and Ca²⁺ was similar for both xanthans. Addition of Ca²⁺ resulted in xanthans with pseudoplastic behavior, which ensures a high degree of mixing, pumping and drainage capacity in the food industry (KATZBAUER, 1998). On the other hand, addition of Na⁺ resulted in xanthans more

pseudoplastic under shear exerted in the mouth (50-200s⁻¹) when a food product is eaten; the xanthan exhibit a much lower viscosity in this shear, thus enhances sensory qualities in foods, as flavor release and product taste (CHALLEN, 1994).

4 Conclusions

The pH condition used on production affected the yield and rheological characteristics of xanthan. Xanthans produced under neutral and alkaline pH showed higher yield and viscosity than these produced on uncontrolled pH; neutral condition favored yield, but alkaline condition favored viscosity with intermediary yield. Xanthan Xa-pH7 and Xa-pH9 were selected for post-fermentation process by ion exchange and their different characteristics affected the ion exchange. The removal of salts not changed the solutions viscosity of both xanthans that also is not changed by addition of salts in Xa-pH7; however addition of salts in Xa-pH9 decreased the viscosity. The losses by recovery were offset by improvement of viscosity of xanthans recovered added of increasing amounts of Na⁺ and Ca²⁺. The recovery of xanthans after addition of salts, to all concentrations, resulted in a increase of viscosity. The highest viscosity was provided by addition of 5% of Na⁺ and 0.5% of Ca²⁺ to both xanthans. The post-fermentative process here proposed is very simple and resulted in xanthans with differentiated rheological properties and possibility of applications. Raise the quality of a polymer through chemical modifications can be simpler and more effective than producing a new polymer.

Acknowledgements

We are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their research scholarship. We also thank the working team of Laboratory of Chemical Metrology and of Biopolymers Laboratory of UFPel by the support.

References

ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening of *Xanthomonas campestris* pv pruni strains according to their production of xanthan and its viscosity and chemical composition. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 317-322, 2003.

BERGMANN, D.; FURTH, G.; MAYER, C. Binding of bivalent cations by xanthan in aqueous solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 245-251, 2008.

BORGES,C. D.; MOREIRA, A. DA S.; VENDRUSCOLO, C. T.; AYUB M. A. Z. Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv pruni strain 101. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 40, p. 81-85, 2008.

BORGES, C. D.; PAULA, R. C. M. DE; FEITOSA, J. P. A.; VENDRUSCOLO, C. T. The influence of thermal treatment and operational conditions on xanthan produced by *X. arboricola* pv pruni strain 106. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 262–268, 2009a.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T.; MARTINS, A. L.; LOMBA, R. F. T. Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 2, p. 160-165, 2009b.

BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthan. In: STEINBÜCHEL, A.; VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S. **Biopolymers**. v. 5. Weinheim: Weley-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, n. 1, p. 23-38, 1983.

BURDOCK, G. A. Encyclopedia of Food and Color Additives. v. 3. New York: CRC Press, 1997. 3153p.

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, n. 7, p. 1003 -1014, 1978.

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

CAPRON, I.; BRIGAND, G.; MULLER, G. About the native and renatured conformation of xanthan exopolysaccharide. **Polymer**, v. 38, n. 21, p. 5289-5295, 1997.

CARRINGTON, S.; ODELL, J.; FISHER, L.; MITCHELL, J.; HARTLEY, L. Polyelectrolyte behaviour of dilute xanthan solutions: salt effects on extensional rheology. **Polymer**, v. 37, n. 13, p. 2871-2875, 1996.

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**, New York, Ed. Plenum Press, 1994. p. 135-140.

CLARKE-STURMAN, A. J.; PEDLEY, J. B.; STURLA, P. L. Influence of anions on the properties of microbial polysaccharides in solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 8, n. 6, p. 355-360, 1986.

FLORES CANDIA, J. L.; DECKWER, W. D. Effect of the nitrogen source on pyruvate content and rheological properties of xanthan. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 446-452, 1999.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. Compendium of food additives specifications, addendum 7. FAO/WHO, 1999.

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

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCÓN, A. Xanthan gum production: An unstructured kinetic model. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 3, p. 206-217, 1995.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, n.7, p. 549-579, 2000.

HAYWARD, A. C. Bacteriophage sensitivity and biochemical type in *Xanthomonas malvacearum*. Journal of General Microbiology, v. 33, p. 287-298, 1964.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 4ª Ed., v. 1, São Paulo: IMESP, 2004. p. 1032.

JANSSON, P. E., KENNE, 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 Science**, v. 5, p. 519-526, 1961.

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

KIERULF, C.; SUTHERLAND, I. W. Thermal stability of xanthan preparations. **Carbohydrate Polymers**, v. 9, n. 3, p. 185-194, 1988.

LAMBERT, F.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Sodium and calcium counterion activity in the presence of xanthan polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 7, n. 1, p. 49-52, 1985.

LAUNAY, B.; CUVELIE, G.; MARTINEZ-REYES, S. Viscosity of locust bean, guar and xanthan gum solutions in the Newtonian domain: a critical examination of the $log(n_{sp})_0 - logC[n]_0$ master curves. **Carbohydrare Polymers**, v. 34, p. 385-395, 1997.

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.

MCNELLY, W. H.; KANG, K. S. Xanthan and some other biosynthetic gums. In: WHISTLES, R. L; BEMILLER, J.N., Editors. **Industrial gums**, Academic Press, New York, 1973, p. 473-497.

MOHAMMED, Z. H.; HAQUE, A.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, E. R. Promotion and inhibition of xanthan 'weak-gel' rheology by calcium ions. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 38-45, 2007.

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, n. 4-6, p. 469-474, 2001.

MULLER, G.; AURHOURRACHE, M.; LECOURTIER, J.; CHAUVETEAU, G. Salt dependence of the conformation of a single-stranded xanthan. International Journal of Biological Macromolecules, v. 8, n. 3, p. 167-172, 1986.

NASH, W.; PINDER, D. N.; HEMAR, Y.; SINGH, H. Dynamic light scattering investigation of sodium caseinate and xanthan mixtures. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, p. 269-271, 2002.

NITSCHKE, M.; THOMAS, R. W. S. P. Xanthan gum production by wild-type isolates of *Xanthomonas campestris*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 502-504, 1995.

PELLETIER, E.; VIEBKE, C.; MEADOWS, J.; WILLIAMS, P. A. A rheologiacal study of the orderdisorder conformational transition of xanthan gum. **Biopolymers**, v. 59, p. 339-346, 2001.

RINAUDO, M. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 433-440, 2001.

ROCKS, J. K. Xanthan gum. Food Technology, v. 25, p.476-483, 1971.

ROSS-MURPHY, S. B., MORRIS, V. J., MORRIS, E. R. Molecular viscoelasticity of xanthan polysaccharide. **Faraday Symposium of the Chemical Society**, v. 18, p. 115-129, 1983.

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

SLONEKER, J. H.; JEANES, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B - 1459. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 40, n. 11, p. 2066-2071, 1962.

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

SMITH, I. H.; PACE, G. W. Recovery of microbial polysaccharides. Journal of Chemical Technology And Biotechnology, v. 32, n. 1, p. 119-129, 1982.

SMITH, I. H.; SYMES, K. C.; LAWSON, C. J.; MORRIS, E. R. Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 3, n. 2, p. 129-134, 1981.

SMITH, R. J. Characterization and analysis of starches. In: WHISTLER, R. L.; PASCHALL, E. F. Starch, **Chemistry and Technology**. New York: Academic Press, v. 2, p. 569-635, 1967.

SUTHERLAND, I. W. Microbial biopolymers from agricultural products: production and potential. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 38, n. 3-4, p. 249-261, 1996.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 41-46, 1998.

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

TORRESTIANA, B.; FUCIKOVSKY, L.; GALINDO, E. Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates. Letters in Applied Microbiology, v. 10, n. 2, p. 81-83, 1990.

UNITED STATES, SECRETARY OF AGRICULTURE. Allene R. Jeanes; James H. Sloneker. **Method of producing an atypically salt-responsive alkali-deacetylated polysaccharide**. U. S., Patente n. 3 000 790, 19 set. 1961.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS; EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. Claire Tondo Vendruscolo; João Luiz Silva Vendruscolo; Angelita da Silveira Moreira. **Process for preparing a xanthan biopolymer**. WO/2006/047845, 01 nov. 2005.

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, v. 1, p. 187-191, 2000.

VUYST, L. De.; LOO, J. V.; VANDAMME, E. J. Two-step fermentation process for improved xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 39, p. 263-273, 1987.

XIE, W. LECOURTIER, J. Xanthan behaviour in water-based drilling fluids. **Polymer Degradation and Stability**, v. 38, n. 2, p. 155-164, 1992.

XUEWU, Z.; XIN, L.; DEXIANG, G; WEI, Z.; TONG, X.; YONGHONG, M. Rheological models for xanthan gum. **Journal of Food Engineering**, v. 27, n. 2, p. 203-209, 1996.

CONCLUSÕES GERAIS

O procedimento proposto para mineralização de amostras de xantana utilizando-se ácido nítrico e ácido perclórico para determinação de cátions metálicos proporciona resultados reprodutivos e estatisticamente semelhantes aos obtidos através do método convencional de preparo de amostras por calcinação, portanto, é adequado para determinação destes analitos em amostras de xantana. O método de digestão ácida é de fácil execução, simples, rápido e requer menores quantidades de amostra.

O pH utilizado durante o processo fermentativo influencia o rendimento, composição química e características reológicas da xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni cepa 101, sendo que os pH neutro e alcalino resultam em maior rendimento e polímeros com maior viscosidade comparado ao pH livre.

O processo pós-fermentativo de troca iônica com subsequente adição de quantidades crescentes de sódio e cálcio resulta em pequena variação na viscosidade das soluções de xantana antes da recuperação, entretanto, proporciona um incremento na viscosidade das soluções dos polímeros recuperados. O maior incremento da viscosidade é obtido pela adição de 5,0% de sódio e de 0,5% de cálcio. Através do processo de troca iônica é possível obter polímeros com propriedades e aplicações diferenciadas.

REFERÊNCIAS GERAIS

ANTUNES, A. E. C. Produção, viscosidade e composição de xantana por *Xanthomonas campestris* pv pruni em meios convencionais e alternativos.
2000. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening of *Xanthomonas campestris* pv pruni strains according to their production of xanthan and its viscosity and chemical composition. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 317-322, 2003.

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

ASTM D1428-64. Annual Book of ASTM Standard, v. 10. Philadelphia, 1981.

AZUAJE, R. A.; SÁNCHEZ, J. A. Produccion de xantano por *Xanthomonas campestris* en un medio de cultivo no convencional. **Acta Científica Venezolana**, v. 50, p. 201-209, 1999.

BECKER, A.; KATZEN, F.; PÜHLER, A.; IELPI, L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 145-152, 1998.

BERGMANN, D.; FURTH, G.; MAYER, C. Binding of bivalent cations by xanthan in aqueous solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 245–251, 2008.

BORGES, C. D.; BASTOS, C. P.; VENDRUSCOLO, C. T. Avaliação das características físicas e químicas de gomas xantanas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n.2, p. 107-114, 2007.

BORGES,C. D.; MOREIRA, A. DA S.; VENDRUSCOLO, C. T.; AYUB M. A. Z. Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv pruni strain 101. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 40, p. 81-85, 2008.

BORGES, C. D.; PAULA, R. C. M. DE; FEITOSA, J. P. A.; VENDRUSCOLO, C. T. The influence of thermal treatment and operational conditions on xanthan produced by *X. arboricola* pv pruni strain 106. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 262–268, 2009a.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Xanthan synthesized by strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni: production, viscosity and chemical composition. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 4, p. 67-73, 2007.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T.; MARTINS, A. L.; LOMBA, R. F. T. Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 2, p. 160-165, 2009b.

BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthan. In: STEINBÜCHEL, A.; VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S. **Biopolymers**. v. 5. Weinheim: Weley-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, n. 1, p. 23-38, 1983.

BRASIL. Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. **D.O.U**-Diário Oficial da União de 09 de abril de 1965.

BURDOCK, G. A. Encyclopedia of Food and Color Additives. v. 3. New York: CRC Press, 1997. 3153p.

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, n. 7, p. 1003 -1014, 1978.

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

CAPRON, I.; ALEXANDRE, S.; MULLER, G. An atomic force microscopy study of the molecular organisation of xanthan. **Polymer**, v. 39, n. 23, p. 5725–5730, 1998.

CAPRON, I.; BRIGAND, G.; MULLER, G. About the native and renatured conformation of xanthan exopolysaccharide. **Polymer**, v. 38, n. 21, p. 5289-5295, 1997.

CAPRON, I.; BRIGAND, G.; MULLER, G. Thermal denaturation and renaturation of a fermentation broth of xanthan: rheological consequences. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 3, p. 215-225, 1998.

CARRINGTON, S.; ODELL, J.; FISHER, L.; MITCHELL, J.; HARTLEY, L. Polyelectrolyte behaviour of dilute xanthan solutions: salt effects on extensional rheology. **Polymer**, v. 37, n. 13, p. 2871-2875, 1996.

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: Structures, properties and finctions, New York, Ed. Plenum Press, 1994. p. 135-140.

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

CLARKE-STURMAN, A. J.; PEDLEY, J. B.; STURLA, P. L. Influence of anions on the properties of microbial polysaccharides in solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 8, n. 6, p. 355-360, 1986.

DIAZ, P. Avaliação comparativa das propriedades hidrodinâmicas de xantanas produzidas pelo pv pruni e clairana. 2008. 109f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

DIAZ, P. Influência de parâmetros físicos e químicos e da adição de íons no comportamento reológico de gomas xantana. 2002. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

DIAZ, P. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S. Reologia de xantana: uma revisão sobre a influência de eletrólitos na viscosidade de soluções aquosas de gomas xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 15-28, 2004.

FLORES CANDIA, J. L.; DECKWER, W. D. Effect of the nitrogen source on pyruvate content and rheological properties of xanthan. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 446-452, 1999.

FLORES, E. M. M.; KRUG, F. J.; BARIN, J. S.; ARRUDA, M. A. Z. **Decomposição de materiais orgânicos por via úmida**. In: KRUG, F. J. Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos Sobre Preparo de Amostras Orgânicas e Inorgânicas para análise elementar. 1^a Ed, Piracicaba, 2008. p. 252-275.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. Compendium of food additives specifications, addendum 7. FAO/WHO, 1999.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; PAIS, J.; COSTA, N.; OLIVEIRA, C.; MAFRA, L.; HILLIOU, L.; OLIVEIRA, R.; REIS, M. A. M. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 859-865, 2009.

FU, J. –F; TSENG, Y. –H. Construction of lactose-utiling *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 919-923, 1990.

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

GAMINI, A.; MANDEL, M. Physicochemical properties of aqueous xanthan solutions: static light scattering. **Biopolymers**, v. 34, p. 783-797, 1994.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCÓN, A. Xanthan gum production: An unstructured kinetic model. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 3, p. 206-217, 1995.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, n.7, p. 549-579, 2000.

HAYWARD, A. C. Bacteriophage sensitivity and biochemical type in *Xanthomonas malvacearum*. Journal of General Microbiology, v. 33, p. 287-298, 1964.

HEYRAUD, A.; SAYAH, B.; VOJNOV, A.; COLIN-MOREL, Ph.; GEY, C. GEREMÍA, R. A.; DANKERT, M. Structure of an extra cellular mannosylated cellulose produced by a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. **Cellular and Molecular Biology**, v. 44, p. 447-454, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 4ª Ed., v. 1, São Paulo: IMESP, 2004. p. 1032.

JANSSON, P. E., KENNE, 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 Science**, v. 5, p. 519-526, 1961.

KAMSEU, E.; LEONELLI, C.; BOCCACCINI, D. N.; VERONESI, P.; MISELLI, P.; PELLACANI, G.; MELO, U. C. Characterisation of porcelain compositions using two china clays from Cameroon. **Ceramics International**, v. 33, p. 851-857, 2007.

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

KEBBEKUS, B. B. **Preparation of samples for metals analysis**. In: MITRA, S. Samples Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Chemical Analysis, v. 162. New Jersey: Wiley-Interscience, 2003. p. 227- 270.

KIERULF, C.; SUTHERLAND, I. W. Thermal stability of xanthan preparations. **Carbohydrate Polymers**, v. 9, n. 3, p. 185-194, 1988.

KILIKIAN, B. V., PESSOA Jr., A. Purificação de Produtos Biotecnológicos.In: SCHMIDEL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. v. 2, São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001. p. 493-522. KONÍCEK, J.; KONICKOVÁ-RADOCHOVÁ, M. Use of whey for production of exocellular polysaccharide by mutant strain of *Xanthomonas campestris*. **Folia Microbiologica**, v. 37, n. 2, p. 102-104, 1992.

LAMBERT, F.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Sodium and calcium counterion activity in the presence of xanthan polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 7, n. 1, p. 49-52, 1985.

LAUNAY, B.; CUVELIER, G.; MARTINEZ-REYES, S. Viscosity of locust bean, guar and xanthan gum solutions in the Newtonian domain: a critical examination of the $log(n_{sp})_0 - logC[n]_0$ master curves. **Carbohydrare Polymers**, v. 34, p. 385-395, 1997.

LIJIMA, M.; SHINOZAKI, M.; HATAKEYAMA, T.; TAKAHASHI, M.; HATAKEYAMA, H. AFM studies on gelation mechanism of xanthan gum hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 701–707, 2007.

MAGALHÃES, C. E. C.; FLORES, E. M. M.; KRUG, F. J.; BARIN, J. S.; MESKO, M.
F. Decomposição de Materiais Orgânicos por Combustão. In: KRUG, F. J.
Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos Sobre Preparo de Amostras
Orgânicas e Inorgânicas para análise elementar. 1ª Ed, Piracicaba, 2008. p. 184-251.

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.

MCNELLY, W. H.; KANG, K. S. Xanthan and some other biosynthetic gums. In: WHISTLES, R. L; BEMILLER, J.N., Editors. **Industrial gums**, Academic Press, New York, 1973, p. 473-497.

MEDEIROS, I. S.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; CONCEIÇÃO, J.; VENDRUSCOLO, J. L. S. Influência do Método de Recuperação e Purificação de Xantana Produzida por Xanthomonas campestris pv pruni cepa 06. In: XVII

CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2000, Fortaleza. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza: CBCTA, 2000, v. 3, p. 929-929.

MOHAMMED, Z. H.; HAQUE, A.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, E. R. Promotion and inhibition of xanthan 'weak-gel' rheology by calcium ions. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 38-45, 2007.

MOREIRA, A.S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de Xanthomonas campestris pv pruni**. 2002. 73f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, UFPel, 2002.

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, n. 4-6, p. 469-474, 2001.

MORENO, J.; LÓPES, M.J.; VARGAS-GARCIA, C.; VÁZQUEZ, R. Use of agricultural wastes for xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 4-5, p. 242-246, 1998.

MORRIS, E. R. Molecular origin of xanthan solution properties. In: SANDFORD, P.A.; LASKIN, A. **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington: American Chemical Society, 1977. p. 83-89.

MORRIS, E. R. Reology of hydrocolloids. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. Ed. **Gums and Stabilizers for the food industry**. Oxford: Pergamon Press, p. 57-78, 1984.

MULLER, G.; AURHOURRACHE, M.; LECOURTIER, J.; CHAUVETEAU, G. Salt dependence of the conformation of a single-stranded xanthan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 8, n. 3, p. 167-172, 1986.

NASH, W.; PINDER, D. N.; HEMAR, Y.; SINGH, H. Dynamic light scattering investigation of sodium caseinate and xanthan mixtures. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, p. 269-271, 2002.

NITSCHKE, M.; THOMAS, R. W. S. P. Xanthan gum production by wild-type isolates of *Xanthomonas campestris*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 502-504, 1995.

OHLWEILER, O. A. **Química Analítica Quantitativa**. v. 1, 2.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S/A, 1976. 365p.

OVIATT Jr., H. W.; BRANT, D. A. Viscoelastic behaviour of thermally treated aqueous xanthan solutions in the semidilute concentration regime. **Macromolecules**, v. 27, p. 2402-2408, 1994.

ORENTAS, D. G.; SLONEKER, J. H.; JEANES, A. Pyruvic acid content and constituent sugars of exocellular polysaccharides from different species of the genus *Xanthomonas*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 427-430, 1963.

PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S. K.; BATSILAS, L.; PARAS, S. V.; KYRIAKIDIS, D. A.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 73–80, 2001.

PAZUR, J. H.; MISKIEL, F. J.; MARCHETTI, N. T. Properties and applications of antixanthan antibodies. **Carbohydrate Polymers**, v. 27, p. 85-91, 1995.

PELLETIER, E.; VIEBKE, C.; MEADOWS, J.; WILLIAMS, P. A. A rheologiacal study of the orderdisorder conformational transition of xanthan gum. **Biopolymers**, v. 59, p. 339-346, 2001.

PESSOA Jr., A. Cromatografia de troca iônica. In: PESSOA Jr., A.; KILIKIAN; B., V.
Purificação de Produtos Biotecnológicos. 1ª ed. Barueri, SP: Manole, 2005, p. 196-211.
PINTO, E. 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.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, São Paulo, 2006, p. 119.

PSOMAS, S.K; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D.A.. Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**. v. 35 p. 273–280, 2007.

RAIMANN, S.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Utilização de Sais e Solventes para Redução de Custos na Fase de Recuperação de Xantana Produzida por Fermentação Líquida. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2002, Porto Alegre. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre: CBCTA, 2002, p. 884-887.

RINAUDO, M. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 433-440, 2001.

ROCKS, J. K. Xanthan gum. Food Technology, v. 25, p.476-483, 1971.

ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 197-207, 2006.

ROSS-MURPHY, S. B., MORRIS, V. J., MORRIS, E. R. Molecular viscoelasticity of xanthan polysaccharide. **Faraday Symposium of the Chemical Society**, v. 18, p. 115-129, 1983.

ROSS-MURPHY, S. B.; SHATWEIL, K. P.; SUTHERLAND, I. W.; DEA, I. C. M. Influence of acyl substituents on the interaction of xanthans with plant polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 10, n. 1, p.117-122, 1996.

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

SLONEKER, J. H.; JEANES, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B - 1459. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 40, n. 11, p. 2066-2071, 1962.

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

SMITH, I. H.; PACE, G. W. Recovery of microbial polysaccharides. Journal of Chemical Technology And Biotechnology, v. 32, n. 1, p. 119-129, 1982.

SMITH, I. H.; SYMES, K. C.; LAWSON, C. J.; MORRIS, E. R. Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 3, n. 2, p. 129-134, 1981.

SMITH, R. J. Characterization and analysis of starches. In: WHISTLER, R. L.; PASCHALL, E. F. Starch, **Chemistry and Technology**. New York: Academic Press, v. 2, p. 569-635, 1967.

SMOLKA, L. B.; BELMONTE, A. Charge screening effects on filament dynamics in xanthan gum solutions. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 137, p. 103-109, 2006.

SPADARO, A. C. Cromatografia por troca iônica. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora UNICAMP, 2006. p. 103-137.

SUPELCO (1995). Boletim nº 882A. Mobile Phases for Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing. Disponível em: <www.sigmaaldrich.com/ etc/medialib/docs/Supelco/Bulletin/4520.Par.0001.File.tmp/4520.pdf> Acesso em 02 de março de 2009.

STEFFE, J. F. Rheological Methods in Food Process Engineering. 2^a Ed. Michigan: Freeman Press, 1996, 418p.

SUTHERLAND, I. W. Microbial biopolymers from agricultural products: production and potential. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 38, n. 3-4, p. 249-261, 1996.

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

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 41-46, 1998.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharides from microorganisms, plants and animals. In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S. **Biopolymers.** v. 5. Weinheim: Weley-VCH, 2002. p. 259-291.

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

TAKO, M.; NAKAMURA, S. Synergistic interaction between xanthan and guar gum. **Carbohydrate Research,** v. 138, n. 2, p. 207-213, 1985.

TAKO, M.; NAKAMURA, S. D-Mannose-specific interaction between xanthan and D-galacto-D-mannan. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 204, n. 1, p. 33-36, 1986.

TAYLOR K. C., NASR-EL-DIN H. A. Water-soluble hydrophobically associating polymers for improved oil recovery: A literature review. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 19, n. 3-4, p. 265-280, 1998.

TORRESTIANA, B.; FUCIKOVSKY, L.; GALINDO, E. Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates. **Letters in Applied Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 81-83, 1990.

UNITED STATES, SECRETARY OF AGRICULTURE. Allene R. Jeanes; James H. Sloneker. **Method of producing an atypically salt-responsive alkali-deacetylated polysaccharide**. U. S., Patente n. 3 000 790, 19 set. 1961.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS; EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. Claire Tondo Vendruscolo; João Luiz Silva Vendruscolo; Angelita da Silveira Moreira. Process for preparing a xanthan biopolymer. WO/2006/047845, 01 nov. 2005.

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, v. 1, p. 187-191, 2000.

VENDRUSCOLO, C. T.; RODRIGUES, S. A.; PEREIRA, E. R. B.; REDIES, C. R.; VENDRUSCOLO, J. L. Caracterization of blueberry topping using xanthan gum at thickening agent. In: IFT – Annual Meeting + Food Expo, 2006, Orlando. **IFT – Annual Meeting + Food Expo**, 2006.

VITURAWONG, Y.; ACHAYUTHAKAN, P.; SUPHANTHARIKA, M. Gelatinization and rheological properties of rice starch/xanthan mixtures: Effects of molecular weight of xanthan and different salts. **Food Chemistry**, v. 111 p. 106–114, 2008.

VUYST, L. De.; LOO, J. V.; VANDAMME, E. J. Two-step fermentation process for improved xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 39, p. 263-273, 1987.

VUYST, L. De.; VERMEIRE, A. Use of industrial medium components for xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 187-191, 1994.

XIE, W. LECOURTIER, J. Xanthan behaviour in water-based drilling fluids. **Polymer Degradation and Stability**, v. 38, n. 2, p. 155-164, 1992.

XUEWU, Z.; XIN, L.; DEXIANG, G; WEI, Z.; TONG, X.; YONGHONG, M. Rheological models for xanthan gum. **Journal of Food Engineering**, v. 27, n. 2, p. 203-209, 1996.